

Tierärztliche Hochschule Hannover

Physiologisches Institut

**Strukturelle und funktionelle Untersuchungen zum
intestinalen Calcium- und Phosphat-Transport beim Pferd**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Grades einer Doktorin der
Naturwissenschaften

- Doctor rerum naturalium -

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Lisa Solveiga Marholt

Göppingen

Hannover 2017

Wissenschaftliche Betreuungsgruppe: 1. Prof. Dr. med. vet. Gerhard Breves
Physiologisches Institut
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

2. Prof. Dr. rer. nat. Maren von Köckritz-
Blickwede
Institut für Physiologische Chemie
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

1. Gutachten: Prof. Dr. med. vet. Gerhard Breves

2. Gutachten: Prof. Dr. Annette Zeyner

Tag der mündlichen Prüfung: 13.11.2017

Gewidmet all denen die mir etwas bedeuten und die immer für mich da sind.

Danke, dass ihr an mich glaubt!!!

- In Gedenken an meinen Großvater -

Und aus dem Chaos sprach eine Stimme zu mir: "Lächle und sei froh, es könnte schlimmer kommen!" und ich lächelte und war froh - und es kam schlimmer.

(Otto Waalkes)

Teile dieser Arbeit wurden im Rahmen von Publikationen, Tagungen und Seminaren vorgestellt:

Publikationen:

AS Muscher-Banse, L. Marholt, N. Eigendorf, MR Wilkens, B. Schröder, G. Breves u. A. Cehak (2017):

Segmental diversity of phosphate transport along the intestinal axis in horses.

Journal of animal science 95, 165-172

MR Wilkens, L. Marholt, N. Eigendorf, AS Muscher-Banse, K. Feige, B. Schröder, G. Breves u. A. Cehak (2017):

Trans- and paracellular calcium transport along the small and large intestine in horses.

Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology 204, 157-163

Tagungen und Seminare:

L. Marholt, A. Cehak, AS. Muscher Banse, MR. Wilkens (2014):

Die funktionelle Bedeutung des trans- und parazellulären Ca²⁺ und P_i Transports entlang der Darmachse des Pferdes.

Physiologisches Kolloquium Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, 20.11.2014

L. Marholt, AS. Muscher-Banse, MR. Wilkens, G. Breves, A. Cehak (2015):

Mechanisms of Ca²⁺ and P_i transport in equine small intestine (Poster)

69th conference of the Society of Nutrition Physiology, 18th - 20th March 2014, Göttingen, Germany

Marholt, L., Cehak, A., Breves, G, (2015).

The equine intestine: A Ca²⁺ absorption machinery

4th Symposium of the Young Physiologists, 24th - 25th September 2015, Leipzig

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis.....	VII
1. Einleitung	15
2. Literatur.....	17
2.1 Bedeutung und Regulation der Ca ²⁺ Homöostase.....	17
2.1.1 Calcitriol.....	20
2.1.2 Parathormon	21
2.1.3 Calcitonin	21
2.2 Intestinaler Ca ²⁺ -Transport.....	22
2.2.1 Parazellulärer Transport	22
2.2.2 Transzellulärer Transport	23
2.3 Bedeutung und Regulation der Pi-Homöostase	26
2.4 Intestinaler P _i -Transport	28
2.4.1 Parazellulärer Transport	28
2.4.2 Transzellulärer P _i -Transport.....	29
3. Material und Methoden	32
3.1 Tiere und Haltung.....	32
3.1.1 Fütterung	33
3.1.2 Tötung und Probenentnahme	33
3.2 Funktionelle Untersuchungen	34
3.2.1 Prinzip der Ussing-Kammer-Technik	35
3.2.2 Bestimmung der unidirektionalen Fluxraten.....	36

3.2.3 Durchführung der Ussing-Kammer-Versuche	38
3.3 Präparative Methoden für molekularbiologische Untersuchungen	40
3.3.1 Rohmembran-Präparation für molekularbiologische Untersuchungen	40
3.3.2 Cytosol-Präparation für molekularbiologische Untersuchungen	40
3.3.3 Apikale Membran-Präparation	41
3.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration der Gewebe-Präparationen	41
3.3.5 RNA-Isolierung	42
3.3.6 Messung der RNA-Integrität	43
3.3.7 cDNA Synthese	44
3.4 Expressionsstudien	44
3.4.1 PCR für RNA- Nachweis	45
3.4.2 Herstellung einer Standardreihe anhand Klonierung	47
3.4.3 Quantitative real-time RT-PCR zum Nachweis der RNA-Expression	50
3.4.4 Western Blot Analysen.....	52
3.5 Immunhistochemie	56
3.6 Auswertung	57
4. Ergebnisse	59
4.1 Bestimmung der Blutparameter	59
4.2 Elektrophysiologische Basalwerte	60
4.3 Funktionelle und molekularbiologische Untersuchungen zum intestinalen Ca ²⁺ - und Pi-Transport	62
4.3.1 Funktionelle Untersuchungen zum Ca ²⁺ -Transport	62
4.3.2 Strukturelle Untersuchungen zum Ca ²⁺ -Transport.....	68
4.4.1 Funktionelle Untersuchungen zum Pi-Transport.....	75
4.4.2 Strukturelle Untersuchungen zum Pi-Transport	82
5. Diskussion	85

5.1 Bewertung des Versuchsansatzes und der angewandten Methoden	85
5.1.1 Auswahl der Tiere	85
5.1.2 Beurteilung der angewandten Methoden.....	86
5.1.3 Gemessene Blutparameter zur Beurteilung des Mineralstoffstatus der Tiere.....	89
5.2 Ca ²⁺ Transport entlang der Darmachse	91
5.2.1 Betrachtung des Ca ²⁺ -Transportes entlang der Darmachse unter Verwendung der Ussing-Kammer-Technik	91
5.2.2 Messungen zur Expression der Ca ²⁺ -transportierenden Strukturen TRPV6, CaBPD9K und PMCA sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene	94
5.3 P _i -Transport entlang der Darmachse	99
5.3.1 Messungen zum P _i -Transport mit funktionellen und strukturellen Versuchsansätzen	99
5.4 Schlussfolgerung	103
6. Zusammenfassung	105
7. Summary	107
8. Literaturverzeichnis.....	109
8. Anhang	131
9. Danksagung	143

Abkürzungsverzeichnis

Ag	Silber
AgCl	Silberchlorid
ANOVA	analysis of variance (Varianzanalyse)
Aq. Dest	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
ATP(ase)	Adenosintriphosphat(ase)
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BSMV	Bürstensaummembranvesikel
bzw.	beziehungsweise
Ca	Calcium
Ca ²⁺	ionisiertes Calcium
CaBPD9k	Calbindin D _{9k}
CaCl ⁻	Calciumchlorid
cDNA	<i>complementary DNA</i> = komplementäre DNA
Cl ⁻	Chlorid
CYP27B1	Cytochrom P 27B1 (1 α -Hydroxylase)
DAB	Diaminobenzidin
Dist.	distal
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> = Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FGF 23	<i>fibroblast growth factor 23</i> = Fibroblasten-Wachstumsfaktor 23
g	Vielfaches der Erd- oder Normalfallbeschleunigung ($g_n = 9,80665 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$)
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

h	<i>hour</i> = Stunde
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> = Meerrettichperoxidase
I	Stromstärke
IPTG	Isopropyl- β -D-Galaktopyranosid
IC50	<i>inhibitory concentration</i>
I. E.	Internationale Einheit
J_{ms}	Fluxrate von mukosal nach serosal
J_{net}	Nettofluxrate ($J_{net} = J_{ms} - J_{sm}$)
J_{sm}	Fluxrate von serosal nach mukosal
kDa	Kilo-Dalton
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
KM	Körpermasse
KO	knockout
LB	<i>lysogeny broth</i>
LM	Lebendmasse
min	<i>minute</i> = Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
NaPi-IIb	<i>sodium phosphate co-transporter type IIb</i>
μ l	micro Liter
μ A	micro Ampere
NCX	<i>Na⁺/Ca²⁺-exchanger</i> = Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher
Na ⁺	Natrium
p	<i>probability value</i> = Irrtumswahrscheinlichkeit
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PBST	<i>Phosphate Buffered Saline and Tween</i> = Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Polysorbat
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> = Polymerase-Kettenreaktion

P _i	Phosphat
PiT1	<i>Sodium-Dependent Phosphate Cotransporter</i>
PMCA	Plasma Membrane Calcium ATPase
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid
prox.	proximal
PTH	Parathormon
r	Korrelationskoeffizient
RIN	RNA Integritätsnummer
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
RR	Ruthenium Rot
RT	Raumtemperatur
qPCR	<i>real time PCR</i>
rpm	<i>rounds per minute</i> = Umdrehungen pro Minute
s	<i>second</i> = Sekunde
1,25(OH) ₂ D ₃	1 α ,25-Dihydroxycholecalciferol, Calcitriol
25-OHD ₃	25-Hydroxycholecalciferol, Calcidiol
SD	<i>standard deviation</i> = Standardabweichung
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfat</i> = Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> = Standardfehler
SGLT1	<i>sodium-D-glucose cotransporters</i>
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAP	2,4,6-Triaminopyrimidinium
TJ	<i>Tight junction</i>
TRPC	transient receptor potential canonical
TRPM	transient receptor potential melastatin
TRPV	transient receptor potential cation channel subfamily V member
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TS	Trockensubstanz
U	unit

VDR	Vitamin D-Rezeptor
Vit.	Vitamin
V _{max}	maximale Aufnahme rate
Vol	Volumen
\bar{x}	arithmetisches Mittel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Überblick über die Regulation der Ca^{2+} - und Pi -Homöostase	20
Abbildung 2: Schematische Darstellung des intestinalen Ca^{2+} -Transports im Darm.	23
Abbildung 3: Schematischer Aufbau einer Ussing-Kammer	35
Abbildung 4: Übersichtsdarstellung der Ussing-Kammer-Versuche	39
Abbildung 5: Abgeleitete Schmelzkurve der RNA-Expression von TRPV6 in Duodenum....	47
Abbildung 6: pGEM-T Vektorkarte	48
Abbildung 7: Verlauf des I_{sc} und der G_{t}	60
Abbildung 8: Darstellung des basalen I_{sc} entlang der Darmachse	61
Abbildung 9: Basale Nettofluxraten von Ca^{2+} entlang der Darmachse.....	63
Abbildung 10: Unidirektionale Ca^{2+} -Fluxraten.....	64
Abbildung 11: Zeitlicher Verlauf der unidirektionalen Ca^{2+} -Fluxraten.....	65
Abbildung 12: Zeitlicher Verlauf der unidirektionalen Ca^{2+} -Fluxraten.....	66
Abbildung 13: Zeitlicher Verlauf der unidirektionalen Ca^{2+} -Fluxraten.....	67
Abbildung 14: Zeitlicher Verlauf der unidirektionale Ca^{2+} -Fluxraten.....	68
Abbildung 15: RNA-Expression von TRPV6 entlang der Darmachse	69
Abbildung 16: Proteinnachweis von TRPV6 entlang der Darmachse	70
Abbildung 17: Proteinexpression von TRPV6 entlang der Darmachse	71
Abbildung 18: RNA-Expression von CaBPD _{9k} entlang der Darmachse	72
Abbildung 19: Proteinexpressionen von CaBPD _{9k} entlang der Darmachse	73
Abbildung 20: RNA-Expression von PMCA entlang der Darmachse	74
Abbildung 21: Proteinexpression von PMCA in Gesamtmembran entlang der Darmachse ...	74
Abbildung 22: Immunhistochemische Färbung der Enterozyten.....	75
Abbildung 23: Basale P_i Nettofluxraten entlang der Darmachse	76
Abbildung 24: Unidirektionale P_i Fluxraten.....	77
Abbildung 25: Zeitlicher Verlauf der unidirektionale P_i -Fluxraten.....	79
Abbildung 26: Zeitlicher Verlauf der unidirektionale P_i -Fluxraten.....	80
Abbildung 27: Zeitlicher Verlauf der unidirektionale P_i -Fluxraten.....	81
Abbildung 28: Zeitlicher Verlauf der unidirektionale P_i -Fluxraten.....	82

Abbildung 29: RNA-Expression von PiT1 entlang der Darmachse	83
Abbildung 30: RNA-Expression von NaPi-IIb entlang der Darmachse	84

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gruppeneinteilung, Rasse, Alter, Geschlecht und Gewicht der Versuchstiere.....	32
Tabelle 2: Ca ²⁺ - und P _i -Gehalte und Rohnährstoffgehalte.....	33
Tabelle 3: Protokoll für die Belegung der 24 Ussingkammern.....	38
Tabelle 4: Thermocycler-Inkubations-Protokoll für die cDNA Synthese	44
Tabelle 5: Pipettierschema für SYBR Green [®] qPCR.....	51
Tabelle 6: Inkubationsbedingungen SYBR Green [®] qPCR	51
Tabelle 7: Primersequenzen für SYBR Green [®] qPCR.....	51
Tabelle 8: Western Blot Analyse von PMCA und CaBPD _{9k}	54
Tabelle 9: Western Blot Analyse von TRPV6	55
Tabelle 10: Blutparameter Ca ²⁺ , Ca _t , P _i , 1,25-(OH) ₂ D ₃ und 25-OHD ₃	59
Tabelle 11: Basale unidirektionale Ca ²⁺ -Fluxraten	62
Tabelle 12: Korrelationen zwischen den unidirektionalen Ca ²⁺ -Fluxraten.....	64
Tabelle 13: Korrelationen zwischen den unidirektionalen P _i -Fluxraten	77

1. Einleitung

Beim Pferd finden sich im Vergleich zu anderen Spezies Besonderheiten im Calcium- (Ca^{2+}) und Phosphat- (P_i) Haushalt. Das Pferd weist vergleichsweise hohe Ca^{2+} -Plasmaspiegel, niedrige P_i -Plasmaspiegel, eine hohe renale Ca^{2+} -Exkretion, eine hohe intestinale Ca^{2+} -Absorption und niedrige Konzentrationen an Vitamin D Metaboliten auf (ELFERS et al. 1986; BREIDENBACH et al. 1998; R. E. TORIBIO 2007). Über die Lokalisation und Regulation des intestinalen Transports von Ca^{2+} und P_i beim Pferd ist im Vergleich zu anderen Spezies wenig bekannt.

Einige Studien zeigen, dass die Transportsysteme für den intestinalen Ca^{2+} -Transport beim Pferd, wie bei anderen monogastrischen Tieren, vorhanden sind (ROURKE et al. 2010; HWANG et al. 2011; SPREKELER et al. 2011; CEHAK et al. 2012). Allerdings ergibt sich aus der Literatur, dass das Pferd unterschiedliche Transportraten für Ca^{2+} und P_i entlang der Darmachse hat (SCHRYVER et al. 1970a; SCHRYVER et al. 1972; SCHRYVER 1975; CEHAK et al. 2012). Die Regulation der Ca^{2+} - und P_i -Homöostase beim Pferd erfolgt vermutlich nicht ausschließlich über den „klassischen“ Weg durch Parathormon (PTH) und Calcitriol (BREIDENBACH et al. 1998) sondern unterliegt wahrscheinlich weiteren, noch unbekanntem Regulationen.

Untersuchungen mit Hilfe der Ussing-Kammer-Technik haben ergeben, dass das Pferd im tierartspezifischen Vergleich, insbesondere im vorderen Dünndarm, sehr hohe Nettofluxraten für Ca^{2+} aufweist (SCHRYVER 1975; SCHRÖDER et al. 1997; SCHRÖDER et al. 1998; SPREKELER et al. 2011; CEHAK et al. 2012).

Über den intestinalen P_i -Transport beim Pferd ist bis zum heutigen Zeitpunkt wenig bekannt. Das Pferd scheint im Gegensatz zu anderen Spezies in der Lage zu sein P_i im Dünndarm und im Caecum zu sezernieren (SCHRYVER et al. 1972; CEHAK et al. 2012). Es ist allerdings bisher nicht bekannt, ob es sich vorwiegend um trans- oder parazelluläre Transportprozesse handelt und welche zugrundeliegenden Transportproteine daran beteiligt sind.

1. Einleitung

Ziel dieser Arbeit war es, den transzellulären und parazellulären Transport von Ca^{2+} und P_i entlang der Darmachse beim Pferd zu lokalisieren, funktionell zu charakterisieren und die beteiligten Strukturen auf mRNA- und Proteinebene identifizieren.

2. Literatur

2.1 Bedeutung und Regulation der Ca^{2+} Homöostase

Ca^{2+} gehört zu den Mengenelementen, ist zu 99% als Strukturelement, hauptsächlich in Knochen und Zähnen in Form von Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), zu finden und kommt zu einem geringen Anteil auch im Weichteilgewebe vor (ROOT u. HARRISON 1976a, b; BROWN 1991; FLYNN 2003; TORIBIO 2011a). Ca^{2+} spielt eine wichtige Rolle bei der Muskelkontraktion (SCHATZMANN et al. 1961; EBASHI et al. 1969), der Blutgerinnung (FURIE u. FURIE 2005), der neuronalen Signalübertragung, der Drüsensekretion, der Zellteilung und dem programmierten Zelltod (ENGLISH et al. 1989; TOMBES u. BORISY 1989; RAMASAMY 2006; KHANAL u. NEMERE 2008). Aber auch als intrazellulärer Signalüberträger, als „*second messenger*“, ist Ca^{2+} wichtig (RASMUSSEN et al. 1976).

Bei den meisten Säugetieren liegt die Plasmakonzentration von Gesamt- Calcium (Ca_t) zwischen 2,2 mmol/l und 2,5 mmol/l. Beim Pferd gibt es im Vergleich zu anderen Spezies einige Besonderheiten in der Ca^{2+} Homöostase. Die Plasmakonzentration von Ca^{2+} ist beim Pferd zum Beispiel deutlich höher als bei anderen Tierarten. Bei adulten Pferden liegt die Plasmakonzentration des Ca_t zwischen 2,5 mmol/l und 3,5 mmol/l. Die Plasmakonzentration des ionisierten Ca^{2+} liegt zwischen 1,45 mmol/l und 1,6 mmol/l (BREIDENBACH et al. 1998; VERVUERT et al. 2002; TORIBIO et al. 2003; BERLIN u. AROCH 2009).

Die scheinbare Verdaulichkeit von Ca^{2+} liegt bei Pferden mit bis zu 73% vergleichsweise hoch und auch die renale Exkretion von Ca^{2+} ist höher als bei anderen Spezies (SCHRYVER et al. 1970b; SCHRYVER 1975; TORIBIO 2007, 2011b). Die Ca^{2+} Homöostase hängt eng mit dem Vitamin D Haushalt zusammen. So spielen Vitamin D Metaboliten eine wichtige Rolle bei der Ca^{2+} Homöostase. Bei Pferden wurde gezeigt, dass die Plasmakonzentrationen der Vitamin D Metaboliten sehr niedrig sind im Vergleich zu anderen Spezies (BREIDENBACH et al. 1998). Beim Pferd führt die exogene Gabe von Cholecalciferol, einer Vorstufe des Calcitriols, zu einer

2. Literatur

Hyperphosphatämie und zu einer deutlichen Erhöhung der Ca^{2+} - und P_i -Spiegels im Plasma (HARMEYER u. SCHLUMBOHM 2004).

Für eine adäquate Ca^{2+} -Aufnahme spielt dabei, neben der bedarfsgerechten absoluten Ca^{2+} -Menge im Futter, auch das $\text{Ca}^{2+}/\text{P}_i$ -Verhältnis eine Rolle, wobei eine Erhöhung des Ca^{2+} -Anteils vom Pferd gut toleriert wird, solange eine ausreichende Phosphatversorgung gewährleistet ist (SCHRYVER et al. 1970; 1971; 1974). Dabei spielt die vorhandene Ca^{2+} -Menge im Futter für die gesamte Ca^{2+} -Aufnahme und die Lokalisation der Aufnahme im Darm eine bedeutende Rolle (HANSARD u. PLUMLEE 1954). Der Darm gehört neben der Niere und den Knochen zu den Organen die an der Regulation der Ca^{2+} -Homöostase beteiligt sind. Als Hauptlokalisierung für die intestinale Ca^{2+} -Absorption wird der Dünndarm angegeben (SCHRÖDER et al. 1997; JOOST G. J. HOENDEROP et al. 1999b; HOENDEROP et al. 2000). Bei Pferden wird das Duodenum als Hauptabsorptionsort für Ca^{2+} beschrieben (ROURKE et al. 2010; SPREKELER et al. 2011; CEHAK et al. 2012), wohingegen bei anderen Spezies, wie zum Beispiel beim Schaf, das Jejunum eine höhere Bedeutung für die Ca^{2+} -Absorption hat als das Duodenum (SCHRÖDER et al. 1997). Bei Ratten wurde anhand von *voltage-clamp* Versuchen eine Ca^{2+} -Aufnahme im Ileum beschrieben und eine Ca^{2+} -Absorption im Caecum postuliert (NELLANS u. GOLDSMITH 1981; KARBACH u. FELDMEIERS 1993).

Eine konstante extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ist für zahlreiche physiologische Funktionen im Gewebe von hoher Bedeutung und wird durch eine enge Regulation des Ca^{2+} -Haushaltes sichergestellt. Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ist im Vergleich zu der Konzentration im Extrazellularraum sehr gering und liegt bei ca. 100 nmol/l im Gegensatz zu einer Ca^{2+} -Konzentration von ca. 2,5 mmol/l im Extrazellularraum (BROWN 1991). Auch für die intestinale Ca^{2+} -Absorption ist dieses Verhältnis von Bedeutung. Im Darmlumen liegen deutlich höhere Ca^{2+} -Konzentration vor als in den Enterozyten (AUDRAN u. KUMAR 1985; KESSLER et al. 1986; CARAFOLI 1987; FULLMER 1992; BROWN u. MACLEOD 2001).

Das Parathormon (PTH), Calcitonin und Calcitriol sind drei bedeutende Hormone die an der Aufrechterhaltung der Ca^{2+} -Homöostase beteiligt sind (SCHRÖDER et al. 1997; HOENDEROP et al. 1999a; HOENDEROP et al. 2000; BARLEY et al. 2001). Eine Übersicht der Regulation der Ca^{2+} - sowie P_i -Homöostase ist in Abbildung 1 dargestellt und wird in Folge beschrieben.

2. Literatur

In einer Ca^{2+} -Mangelsituation kommt es unter Einfluss von PTH und Calcitriol zu einer verstärkten Ca^{2+} -Aufnahme aus dem Darmlumen, einer Freisetzung aus dem Knochen und einer verstärkten Rückresorption in der Niere. Über den Vitamin D-Rezeptor, ein Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor, wird unter anderem die genomische Wirkung von Calcitriol vermittelt. Durch die Interaktion des entstehenden Komplexes mit den *vitamin D responsive elements*, die sich in der Promotorregion der jeweiligen Gene befinden, kann sich dies sowohl positiv als auch negativ auf die Transkription von bestimmten Genen auswirken (BROWN et al. 1999).

Im Rahmen der Regulation des Ca^{2+} -Haushaltes spielt Calcitriol eine wichtige Rolle. Untersuchungen an anderen Spezies haben gezeigt, dass eine exogene Zufuhr von Vitamin D zu einer Steigerung der intestinalen Transportkapazität von Ca^{2+} führt indem die Expression von Ca^{2+} -transportierenden Proteinen, wie zum Beispiel dem apikalen Ca^{2+} Kanal TRPV6 (*transient receptor potential cation channel subfamily V member 6*) oder dem intrazellulären Transportprotein Calbindin D_{9k} , hoch reguliert werden. Zudem kann auch die parazelluläre Ca^{2+} -Aufnahme durch eine Vitamin D Supplementierung erhöht werden (JUNGBLUTH u. BINSWANGER 1989; WALTERS et al. 1990; HOENDEROP et al. 2002a; KUTUZOVA u. DELUCA 2004; FUJITA et al. 2008). In einigen Studien zum Vitamin D Stoffwechsel beim Pferd wurde allerdings gezeigt, dass beim Pferd im Gegensatz zu anderen Spezies nach einer Vitamin D Applikation die Plasmakonzentration von Ca^{2+} nicht oder nur geringfügig anstieg (HARRINGTON u. PAGE 1983; HARMEYER u. SCHLUMBOHM 2004). Berücksichtigt man weiterhin, dass die Plasmakonzentrationen der Vitamin D Metaboliten beim Pferd ebenfalls sehr niedrig sind, ist davon auszugehen, dass Vitamin D bei der Regulation des Ca^{2+} -Haushaltes beim Pferd nicht in dem Maße eine Rolle spielt wie das bei anderen Spezies dokumentiert ist. Es könnte sein, dass möglicherweise beim Pferd andere Vitamin D unabhängige Regulationsmechanismen eine Rolle spielen (BREIDENBACH et al. 1998). Untersuchungen an anderen Spezies, wie z.B. neugeborenen Schweinen, Ziegen und *vitamin D receptor* (VDR) knockout Mäusen, zeigten, dass vermutlich eine Vitamin D unabhängige intestinale Ca^{2+} -Absorption zu existieren scheint. Der zugrundeliegende Mechanismus dieser Regulation ist jedoch bis heute nicht bekannt (LACHENMAIER-CURRLE u. HARMEYER 1988; JUNGBLUTH u. BINSWANGER 1989; SCHRÖDER et al. 1993; KUTUZOVA u. DELUCA 2004).

2. Literatur

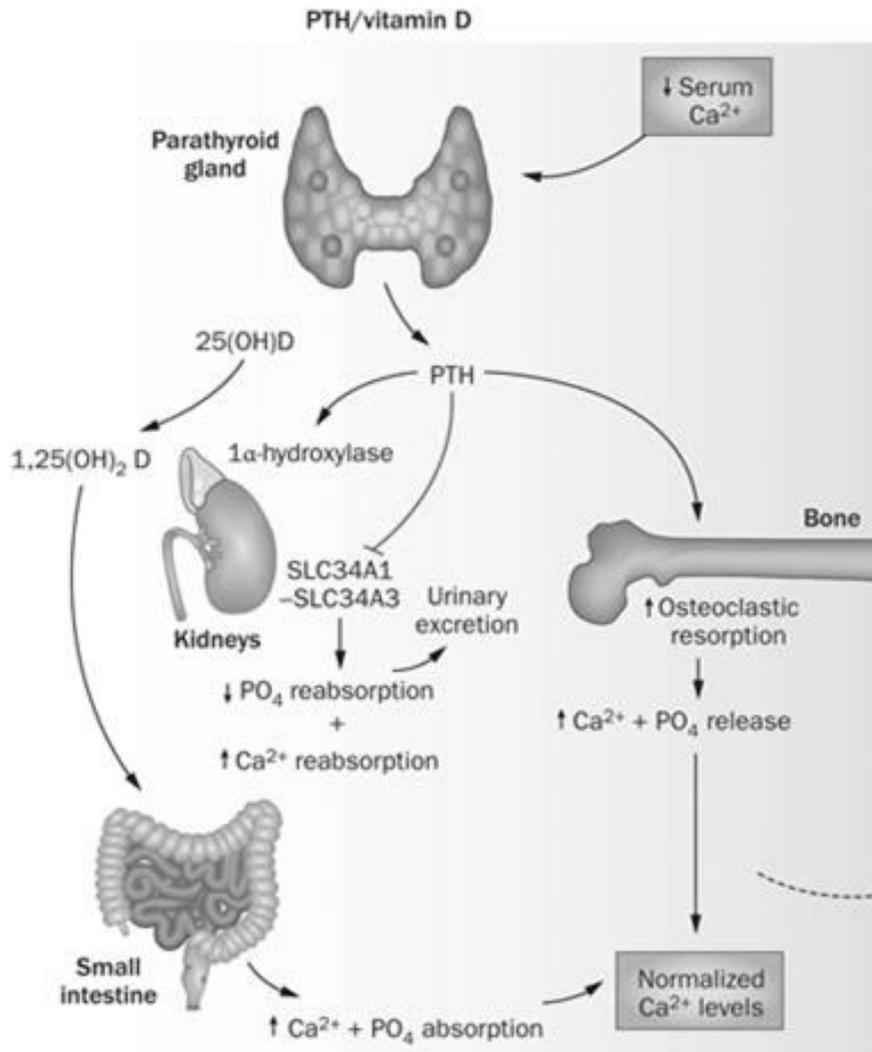


Abbildung 1: Die Abbildung zeigt einen Überblick über die Regulation der Ca²⁺- und P_i-Homöostase. Die Nebenschilddrüsen erkennen Änderungen des Plasma Ca²⁺-Spiegels mittels des Ca²⁺-sensing Rezeptors. Dieser passt in Folge die Sekretion von PTH an. Eine Abnahme des zirkulierenden Ca²⁺ stimuliert die Nebenschilddrüsen zur Produktion und Freisetzung von PTH. Zirkulierendes PTH sorgt schnell für eine Erhöhung des Ca²⁺-Spiegels, indem es die Resorption von Ca²⁺ und P_i aus dem Knochen durch Osteoklasten stimuliert. Zudem kommt es zur Ca²⁺-Reabsorption und P_i-Ausscheidung in der Niere indem die Natrium (Na⁺) -P_i-Co-Transporter SLC34A1-SLC34A3 herunterreguliert werden. Durch Hydroxylierung von 25-Hydroxycholecalciferol zu Calcitriol in der Niere wird im weiteren Verlauf die intestinale Ca²⁺ und P_i-Absorption erhöht (DIGIROLAMO et al. 2012).

Small intestine = Dünndarm, release = entlassen, normalized = normalisiert, urinary excretion = renale Ausscheidung, Parathyroid gland = Nebenschilddrüse, Kidney = Niere, Bone = Knochen

2.1.1 Calcitriol

Calcitriol aktiviert bei Säugetieren die intestinale Ca²⁺- und P_i-Absorption sowie die renale Resorption des Ca²⁺ (HOENDEROP et al. 2002b, 2005). Die noch inaktive Form, Vitamin D₃, wird über die Nahrung aufgenommen oder in der Haut durch ultraviolettes Licht bzw.

2. Literatur

Sonneneinstrahlung aus 7-Dehydrocholesterol generiert. Dabei durchläuft 7-Dehydrocholesterol einen Wechsel zu Provitamin D₃ über eine thermische Isomerisierung schließlich zu Vitamin D₃ (HOLICK et al. 1977; OKANO et al. 1977; HOLICK 1981). In der Leber erfolgt der erste Hydroxylierungsschritt. Hierbei wird aus Vitamin D₃ das 25-Hydroxyvitamin D₃, welches der am häufigsten zirkulierende Metabolit des Vitamin D₃ ist (PONCHON et al. 1969). Der zweite, für die hohe physiologische Wirkung, erforderliche Aktivierungsschritt findet in der Niere statt. Dort wird mit Hilfe des Enzyms 1 α -Hydroxylase aus 25-Hydroxyvitamin D₃ 1,25-dihydroxyvitamin D₃ gebildet (FRASER u. KODICEK 1970).

2.1.2 Parathormon

Das Peptidhormon Parathormon (PTH), wird in den Hauptzellen der Nebenschilddrüse gebildet und sorgt auch beim Pferd für die Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration im Blut durch direkte und indirekte Mechanismen. Zum einen fördert es direkt die Ca²⁺-Resorption in der Niere, indirekt stimuliert es die Bildung von Calcitriol und die Stimulation der Osteoklasten. Die Stimulation von Calcitriol sorgt für eine erhöhte Aufnahme von Ca²⁺ im Darm (TORIBIO et al. 2003; ROURKE et al. 2010). Ein Absinken des Ca²⁺-Spiegels sorgt für die Freisetzung von PTH wohingegen ein Anstieg über den Normalwert die PTH-Sekretion hemmt (negative Rückkopplung). Über Ca²⁺-Sensing Rezeptoren wird der Ca²⁺-Spiegel an den Nebenschilddrüsen gemessen (KHANAL u. NEMERE 2008). Calcitriol hemmt die Bildung von PTH über den VDR (Abbildung 1) (RAMASAMY 2006).

2.1.3 Calcitonin

Der Gegenspieler zu PTH, das Calcitonin, senkt die Ca²⁺-Konzentration im Blut, hemmt die Ca²⁺-Freisetzung aus den Knochen indem es über spezifische Rezeptoren direkt auf die Osteoklasten wirkt (NICHOLSON et al. 1986), fördert die Ca²⁺-Exkretion über die Niere und reduziert die Ca²⁺-Resorption im Darm (ROOT u. HARRISON 1976a). Die Existenz und Bedeutung des Calcitonins bei der Regulation einer Hypercalcämie wurde beim Pferd bereits dokumentiert (TORIBIO et al. 2003; ROURKE et al. 2010).

2.2 Intestinaler Ca^{2+} -Transport

2.2.1 Parazellulärer Transport

Unter dem parazellulären Transport versteht man einen passiven Transport von zum Beispiel Wasser, Ionen oder Nährstoffen über die *Tight Junctions*, der vom elektrochemischen Gradienten angetrieben wird und der als *solvent drag* bezeichnet wird (ULLRICH et al. 1979). Unter dem *solvent drag* wird der Lösungsmittelsog verstanden, der infolge des aktiven Transports von gelösten Teilchen und des daraus resultierenden osmotischen Gradienten parazellulär erfolgt (KARBACH 1992).

Der elektrochemische Gradient wird durch den Konzentrationsunterschied und durch die elektrische Potenzialdifferenz aufgebaut und kann den Ionentransport beeinflussen (KARBACH 1992; TUDPOR et al. 2008).

Die Permeabilität des parazellulären Transportes hängt direkt von den interzellulären Proteinstrukturen, den *Tight Junctions*, ab (BRONNER 1987), die eine primäre Barriere für diffundierende Ionen darstellen (ANDERSON 2001). Die Familie der Claudine erstreckt sich über 24 bekannte Mitglieder und weiter auch Occludine (GONZALEZ-MARISCAL et al. 2003; TANG u. GOODENOUGH 2003). Die Zusammensetzung hängt mit der Funktion des Gewebes zusammen (VAN ITALLIE u. ANDERSON 2006). Es gibt Hinweise darauf, dass Ca^{2+} auf der basolateralen Seite eine Erhöhung des parazellulären Widerstandes und eine Erniedrigung der Kationen-Selektivität bewirkt (BLEICH et al. 2012). Allerdings ist die Regulation des parazellulären Weges noch weitestgehend unklar.

Beim Pferd liegen derzeit noch keine Untersuchungen zur Lokalisation und Bedeutung des para- und transzellulären Transports von Ca^{2+} entlang der Darmachse vor. Bei Ratten wurde mit Hilfe der Ussing-Kammer Technik festgestellt, dass der parazelluläre Anteil im Dünndarm bei ca. 55% liegt (KARBACH u. FELDMIEIER 1993). Eine Ca^{2+} -Absorption tritt bei Ratten lediglich im Duodenum auf (KARBACH 1992).

Die Bedeutung des parazellulären Ca^{2+} -Transports wurde auch durch andere Studien dokumentiert. So konnte FUJITA et al. (2008) die *Tight Junctions* Proteine Claudin 2 und 12 als parazelluläre Ca^{2+} -Kanäle im Darm, die die intestinale Aufnahme von Ca^{2+} erleichtern, identifizieren.

2.2.2 Transzellulärer Transport

Der transzelluläre Transport ist ein sättigbarer, aktiver Prozess, der gegen einen Konzentrationsgradienten verlaufen kann (BRONNER 2003b).

Dieser aktive Transport wird über verschiedene Ca^{2+} -transportierende Proteine vermittelt. In Abbildung 2 wird der Transportweg von Ca^{2+} über die Membran beim monogastrischen Tier beschrieben. Es wird angenommen, dass der transzelluläre Ca^{2+} -Transport im Darm über ein mehrstufiges Verfahren verläuft. Dies beinhaltet die Aufnahme von Ca^{2+} im Dünndarm über die apikale Plasmamembran anhand eines Ca^{2+} -Kanal-Proteins (*transient receptor potential vanilloid receptor channel* (TRPV6) der für den intestinalen Transport von Ca^{2+} eine wichtige Rolle spielt (SCHOEBER et al. 2007), den intrazellulären Transport über Calbindin $\text{D}_{9\text{k}}$ und die Ausschleusung von Ca^{2+} an der basolateralen Seite über die Plasmamembran-ATPase (PMCA). Die Regulation wird hauptsächlich über Calcitriol, PTH und Calcitonin vermittelt (BRONNER 1987; VAN ABEL et al. 2003; HOENDEROP et al. 2005).

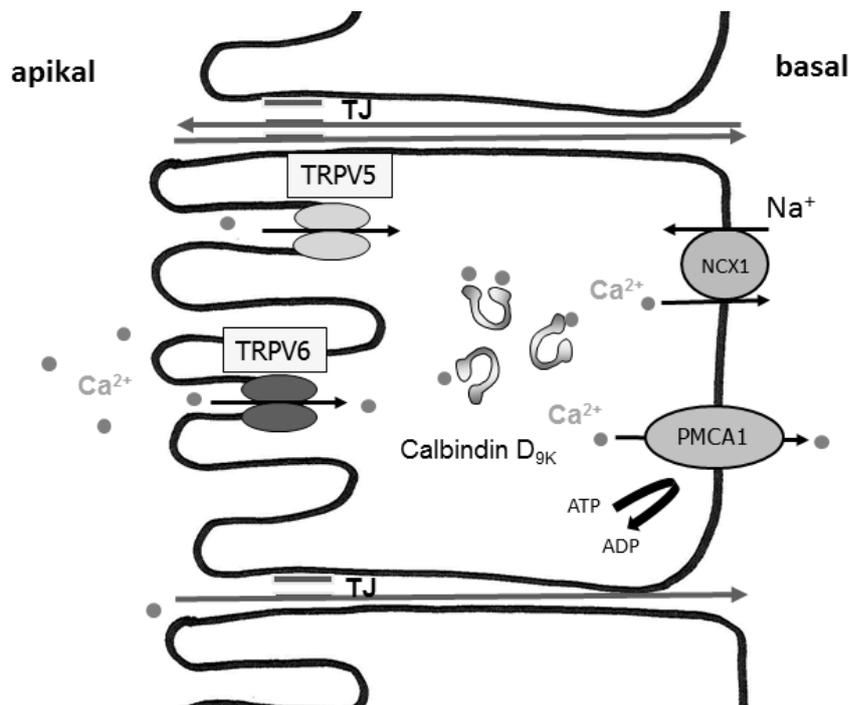


Abbildung 2: Schematische Darstellung des intestinalen Ca^{2+} -Transports im Darm. Der Transport verläuft sowohl parazellulär über *Tight Junctions* (TJ) als auch transzelluläre in drei Schritten: (1) apikaler Ca^{2+} -Einstrom über die Ca^{2+} -Kanäle TRPV5/6 (2) cytosolischer Transport durch Bindung an Calbindin $\text{D}_{9\text{k}}$ und (3) Ausschleusung des Ca^{2+} an der basolateralen Seite über die Plasmamembran ATPase (PMCA) und den $3\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ Austauscher (NCX1) (HOENDEROP et al. 2005; KHANAL u. NEMERE 2008; PEREZ et al. 2008).

2. Literatur

2.2.2.1 Eintritt von Ca^{2+} in den Enterozyt

Der TRPV6 wurde von PENG et al. (1999) am Dünndarm der Ratte zum ersten Mal identifiziert, zeitnah nachdem der *transient receptor potential cation channel subfamily V member 5* (TRPV5) an der Niere beschrieben wurde (HOENDEROP et al. 1999a). Seitdem wurden der TRPV5 und TRPV6 bei verschiedenen Spezies nachgewiesen (SCHRÖDER u. BREVES 2006; WILKENS et al. 2011). Auch beim Pferd wurden beide Kanäle am Darm beschrieben (ROURKE et al. 2010; CEHAK et al. 2012; SPREKELER et al. 2012).

Die Ca^{2+} -Kanäle weisen eine hohe Sequenzhomologie auf, wobei sie sich im Wesentlichen in den N- und C-terminalen Enden unterscheiden. Sie gehören beide zur TRPV-Unterfamilie die aus sechs Mitgliedern, TRPV1-6, besteht (GUNTHERPE et al. 2002).

Die TRPV-Unterfamilie wird den TRP-Kanälen zugeordnet, einer großen Plasmamembran-Kationen-Kanal-Familie mit rund 28 Genen, welche sowohl selektiv als auch nicht-selektiv, spezifisch und ubiquitär, in erregbaren und nicht erregbaren Zellen exprimiert sind (MONTELL et al. 2002). Die Familie der TRP-Kanäle besteht aus drei Haupt- und mehreren Unterfamilien auf der Basis der Sequenzhomologie; TRPC (*transient receptor potential canonical*), TRPM (*transient receptor potential melastatin*) und TRPV wobei die für den intestinalen Ca^{2+} -Transport bedeutenden der letztgenannten Gruppe zugeordnet werden (CLAPHAM 2003; CLAPHAM et al. 2003).

2.2.2.2 Transfer von Ca^{2+} durch den Enterozyt

Der Transfer von Ca^{2+} durch das Cytosol erfolgt mit Hilfe des Ca^{2+} -bindenden Proteins Calbindin (BRONNER 1987). Je nach Molekulargewicht unterscheidet man das Calbindin $\text{D}_{9\text{k}}$ und das Calbindin $\text{D}_{28\text{k}}$. Calbindin $\text{D}_{28\text{k}}$ besitzt vier Bindungsstellen für Ca^{2+} (JOHNSON u. KUMAR 1994) und ist überwiegend in der Niere, dem Knochen, der Plazenta, dem Gehirn und im Pankreas vorhanden (HOENDEROP et al. 2005). Im Darm wird bei den meisten Säugern Calbindin $\text{D}_{9\text{k}}$ exprimiert. Calbindin $\text{D}_{9\text{k}}$ transportiert je zwei Ca^{2+} -Ionen von der apikalen Seite der Plasmamembran zur basolateralen Seite. An der basolateralen Seite übergibt Calbindin $\text{D}_{9\text{k}}$ das Ca^{2+} an die Plasmamembran-ATPase (LARSSON u. NEMERE 2002). Der cytosolische Ca^{2+} -Transport ermöglicht einen deutlich schnelleren Transport des Ca^{2+} s zur basolateralen Seite der Membran als der passive Transport. Die Bedeutung der Calbindin-Konzentration für den transzellulären Ca^{2+} -Transport wurde bereits an anderen Spezies mit unterschiedlichen

2. Literatur

Ergebnissen untersucht (WASSERMAN et al. 1992; HONG u. JEUNG 2013). Unter Verwendung einer Durchflussdialysezelle konnte gezeigt werden, dass durch die Zugabe von Calbindin der Ca^{2+} -Flux signifikant verbessert wurde (FEHER et al. 1992). In Situationen des erhöhten Bedarfs, wie z.B. im letzten Drittel der Trächtigkeit, konnte beim Rind ein Anstieg von Calbindin D_{9k} sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in der Gebärmutterschleimhaut festgestellt werden (SPREKELER et al. 2012). Im Duodenum von Ratten wurde ein linearer Zusammenhang zwischen der Calbindin D_{9k} Menge und der Ca^{2+} -Transportrate dokumentiert (SLEPCHENKO u. BRONNER 2001). Beim Pferd wurde die Existenz von Calbindin D_{9k} an verschiedenen Darmsegmenten nachgewiesen (ROURKE et al. 2010), über die Bedeutung desselben liegen noch keine Ergebnisse vor.

2.2.2.3 Ausschleusung von Ca^{2+} aus Enterozyt

An der basolateralen Seite der Membran erfolgt die Ausschleusung des Ca^{2+} gegen einen elektrochemischen Gradienten. Die dafür notwendigen membranständigen Ca^{2+} -ATPasen sind Enzyme mit einer hohen Affinität und niedrigen Kapazität. Sie gehören zu der Familie der P-Typ ATPasen. Das Charakteristikum dieser ATPasen ist, dass sie ein Aspartyl-Phosphat Intermediat während des Reaktionszyklus ausformen (PEDERSEN u. CARAFOLI 1987). Es existieren mehrere Isoformen von PMCA, wobei im Darm überwiegend PMCA1b vorkommt (GUERINI 1998). Untersuchungen, unter anderem am Kaninchen, haben gezeigt, dass PMCA1b vorwiegend im vorderen Dünndarm exprimiert wird (FREEMAN et al. 1995). Auch beim Pferd konnte PMCA entlang der Darmachse und an der Niere auf mRNA Ebene nachgewiesen werden, doch seine Bedeutung ist bisher noch unklar (ROURKE et al. 2010). PMCA kann auf verschiedene Weise stimuliert werden, entweder durch direkte Interaktion mit Calmodulin am cytosolischen C-terminalen Ende oder durch Calbindin D_{9k} . PMCA spielt nicht nur am Darm eine wichtige Rolle, sondern ist auch für die intrazelluläre Ca^{2+} -Regulation an der glatten Muskulatur und zur Vermeidung von Apoptose wichtig (SASAMURA et al. 2002). Für PMCA sind zwei Konformationszustände beschrieben, E1 und E2 (KREBS et al. 1987). Im E1 Stadium des Enzyms wird eine hohe Bindungsaffinität des Ca^{2+} an der cytoplasmatischen Seite der Plasmamembran vermutet wohingegen das Ca^{2+} in der E2 Konformation der Pumpe in den extrazellulären Raum geschleust wird und die Bindungsaffinität für Ca^{2+} auf der intrazellulären Seite abnimmt. Die Konformationsänderung von E1 zu E2 geschieht durch

2. Literatur

Phosphorylierung über ATP. Nach Ausschleusung von Ca^{2+} zerfällt die E2 Konformation wieder in die E1 Konformation und Ca^{2+} kann erneut gebunden werden (Abbildung 3) (NIGGLI et al. 1982; VAN ABEL et al. 2003). Ein ähnlicher Mechanismus der Ausschleusung von Ca^{2+} wurde auch für die Niere gefunden (BORKE et al. 1989; HOENDEROP et al. 2002b).

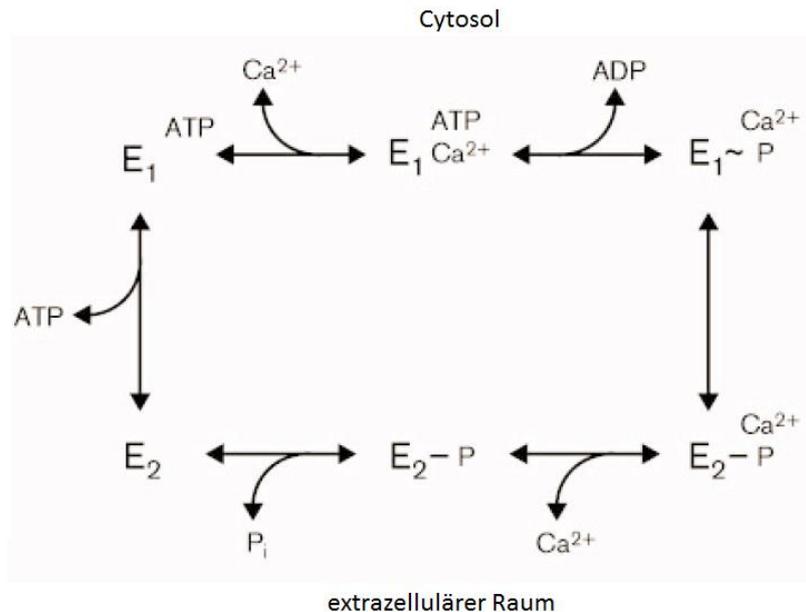


Abbildung 3: Dargestellt (nach (E. CARAFOLI u. BRINI 2000)) ist ein vereinfachtes Schema des Reaktionszyklus der Ca^{2+} Pumpe. Die Pumpe (E) besteht aus zwei verschiedenen Konformationen; die erste (E1) bindet Ca^{2+} mit einer hohen Affinität auf der Seite des Zytosols der Plasmamembran wohingegen die zweite Konformation (E2) eine geringe Affinität zu Ca^{2+} aufweist und diese in den extrazellulären Raum, folglich der anderen Seite der Plasmamembran, entlässt. ATP sorgt für eine Phosphorylierung eines Asparaginsäurerestes welches zu der vorherigen Translokation von Ca^{2+} führt.

2.3 Bedeutung und Regulation der P_i -Homöostase

P_i gehört, wie Ca^{2+} , zu den Mengenelementen und findet sich zu circa 85% als Strukturelement hauptsächlich in Knochen und Zähnen in Form von Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) und knapp 15% im Weichteilgewebe und im Blut wieder. Weniger als 1% werden der extrazellulären Flüssigkeit zugeschrieben (ROOT u. HARRISON 1976b, a; E. M. BROWN 1991; FLYNN 2003; RAMIRO E. TORIBIO 2011a). P_i spielt eine wichtige Rolle bei der Muskelkontraktion, der Synthese von Nukleinsäuren, im Energiemetabolismus und bei der

2. Literatur

Enzymaktivierung (KREBS u. BEAVO 1979; BRAIN et al. 1928; GAASBEEK u. MEINDERS 2005).

In der Blutbahn fungiert P_i als Puffer. Dort zirkuliert es zu circa 85% als freies P_i -Ion überwiegend als HPO_4^{2-} und verbindet sich bei einer Acidose mit den noch freien H^+ zu Dihydrogenphosphat ($H_2PO_4^-$). In einem Verhältnis von 4:1 liegen sie bei einem physiologischen pH-Wert vor (BRAIN et al. 1928, GAASBEEK und MEINDERS 2005). Diese P_i Verbindung kann nicht resorbiert werden und wird daher ausgeschieden. Durch die Resorption von HCO_3^- wird einer Acidose entgegengewirkt (ENGELHARDT 2015). P_i wird bei Wiederkäuern im endogenen P_i -Kreislauf recycelt. Über Sekretion in die Speicheldrüsen gelangt es als Puffer in das Vormagensystem und durch Absorption im Darm gelangt es erneut in die Blutbahn (KAY 1966).

Die P_i -Konzentration im Plasma ist abhängig von Tierart, Alter, Fütterung und Aktivität. Daher variiert sie je nach Individuum, hält sich aber in der Tierart relativ konstant und liegt zwischen 0,7 – 1,6 mmol/l beim adulten Hund und bis zu 2,1 – 3,3 mmol/l beim Schwein (SHIBER u. MATTU 2002; KRAFT 2005). Beim adulten Pferd liegen die Werte im Bereich von ca. 0,58-1,99 mmol/l (BREIDENBACH et al. 1998; R. E. TORIBIO 2011b), womit sie niedriger zu sein scheinen als bei anderen Spezies (ELFERS et al. 1986; DOORNENBAL et al. 1988; LACHENMAIER-CURRLE u. HARMEYER 1989).

Die Aufrechterhaltung der P_i -Konzentration im Plasma erfolgt durch Regulation der intestinalen Absorption und der renalen Exkretion. Der wichtigste Regulator bei der P_i Homöostase ist dabei die Niere. Im proximalen Tubulus der Niere werden ca. 60% bis 70% des P_i reabsorbiert (KNOX et al. 1977). Neben den Hormonen PTH und Calcitriol werden auch weitere endokrine Faktoren, wie z.B. *fibroblast growth factor 23* (FGF23), im Hinblick auf die Regulation der P_i -Homöostase diskutiert (EVERS et al. 1978; MURER et al. 1999). Untersuchungen an der Maus und am Menschen zeigten, dass FGF23 aus der Familie der Wachstumsfaktoren stammt (YAMASHITA 2005; KATOH u. KATOH 2006) und die renale P_i -Sekretion stimuliert und indirekt die intestinale Absorption von P_i reduziert, indem es die renale Calcitriol Produktion durch die Inhibitoren der 1α -Hydroxylase (*cytochrome P450 family 27 subfamily B member 1*) Expression vermindert (BAI et al. 2003; SAITO et al. 2003). Bei Ratten inhibiert FGF23 die Synthese und Sekretion von PTH direkt in der Nebenschilddrüse (BEN-DOV et al. 2007). Die höchste Expression von FGF23 ist im Knochen vorzufinden. In

2. Literatur

absteigender Reihenfolge folgt der Thymus, das Gehirn und das Herzgewebe (YAMASHITA et al. 2000; RIMINUCCI et al. 2003). Beim Pferd liegen derzeit noch keine Untersuchungen zur hormonellen Regulation der P_i -Homöostase vor.

Wie auch bei Ca^{2+} spielt die Menge des im Futter enthaltenen P_i für die Aufrechterhaltung der P_i -Homöostase eine wichtige Rolle (QUAMME 1985).

2.4 Intestinaler P_i -Transport

Der intestinale P_i -Transport über die Darmwand erfolgt transzellulär und parazellulär. Untersuchungen von SCHRYVER et al. (1972) ergaben erste Hinweise, dass beim Pferd P_i im Darm nicht nur absorbiert wird, sondern auch im Bereich des proximalen Dünndarms und im Caecum sezerniert wird. Er vermutete eine regulierte P_i -Sekretion sowie Absorption im Dickdarm auf Grund seiner Beobachtungen an Ponys. Untersuchungen beim Kaninchen haben ebenfalls deutliche Unterschiede in der Transportkapazität für P_i in den verschiedenen Darmsegmenten ergeben (SCHRYVER et al. 1972; DANISI et al. 1984).

FUCHS u. PETERLIK (1980) stellten an intestinalen Bürstensaummembranvesikeln von Hühnern einen Vitamin D abhängigen P_i Transport fest (FUCHS u. PETERLIK 1980). Interessanterweise wurde beim neugeborenen Schwein eine Calcitriol unabhängige P_i -Aufnahme festgestellt (SCHRÖDER et al. 1998).

2.4.1 Parazellulärer Transport

Wie schon in Kapitel 2.2 beschrieben wird unter einem parazellulären Transport ein passiver Transport von Teilchen verstanden, welcher von einem elektrochemischen Gradienten angetrieben wird (ULLRICH et al. 1979). Dieser Gradient wird durch den Konzentrationsunterschied und durch die elektrische Potenzialdifferenz aufgebaut und kann den Ionentransport beeinflussen (KARBACH 1992; TUDPOR et al. 2008).

Die Permeabilität des parazellulären Transportes hängt direkt von den interzellulären Proteinstrukturen, den *Tight Junctions*, ab (BRONNER 1987) die eine primäre Barriere für diffundierende Ionen darstellen (ANDERSON 2001). Die Regulation des P_i -Transportes

2. Literatur

entlang des parazellulären Weges ist bis heute weitestgehend unklar. Auch über die Mechanismen des parazellulären P_i -Transports ist bis heute noch wenig bekannt. Am Jejunum von Ratten konnte anhand von *Voltage-Clamp*-Versuchen gezeigt werden, dass die P_i -Aufnahme im Jejunum weitestgehend transzellulär verläuft und nur ein geringer Anteil parazellulär transportiert wird (ETO et al. 2006).

2.4.2 Transzellulärer P_i -Transport

Die treibende Kraft für den P_i -Transport ist der zelleinwärts gerichtete Natriumgradient entlang der Bürstensaummembran, der durch die Na^+/K^+ -ATPase an der basolateralen Seite aufrechterhalten wird (BERNER et al. 1976).

Im Rahmen von Untersuchungen beim Kaninchen, das wie das Pferd ein herbivorer Monogastrier mit Dickdarmfermentation ist, ergaben sich durch Messungen unidirektionaler P_i Fluxraten Hinweise für die Existenz eines Na^+ -abhängigen P_i -Transports im Duodenum. Im Jejunum und Ileum dagegen wurde eine P_i -Absorption über einfache Diffusion postuliert (DANISI et al. 1984; SHIRAZI-BEECHEY et al. 1988a, b). Beim Pferd liegen bisher nur wenige Untersuchungen vor. Diese postulieren eine P_i -Absorption vorwiegend im distalen Colon und eine P_i -Sekretion im proximalen Dünndarm und im Caecum (SCHRYVER et al. 1972; CEHAK et al. 2012). Eine nähere funktionelle Charakterisierung der zugrundeliegenden Transportstrukturen oder deren Identifizierung mittels molekularbiologischer Untersuchungen ist bisher beim Pferd nicht erfolgt. Als Hauptlokalisation der P_i -Absorption wurde beim Menschen und bei der Ratte das Jejunum identifiziert, gefolgt vom Duodenum und Ileum (SCHARRER 1985; LOGHMAN-ADHAM 1997).

Die Anzahl der *sodium phosphate cotransporter family* (SLC34) Proteine in der apikalen Membran bestimmt maßgeblich die P_i -Transportkapazität und wird durch verschiedene Faktoren und Hormone, z.B. dem P_i -Gehalt im Futter, Calcitriol, PTH, Dopamin, FGF23 und dessen Co-Rezeptor Klotho (ERBEN u. ANDRUKHOVA 2016) reguliert (BERGWITZ u. JUPPNER 2010; HUANG u. MOE 2011). Zu den Transportern der SLC34 gehören der NaPi-IIa sowie NaPi-IIb und NaPi-IIc. Der NaPi-IIb ist für den intestinalen P_i -Transport, vor allem im Dünndarm von Säugetieren, verantwortlich (MURER et al. 2004). Es handelt sich um einen pH-abhängigen, elektrogenen Transport mit einer 3:1 $Na^+ : P_i$ Stöchiometrie (FORSTER et al. 1999; MURER et al. 2004). Er wurde erstmals von HILFIKER et al. (1998) in Oozyten von

2. Literatur

Xenopus laevis beschrieben und am Dünndarm von Mäusen auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen (RADANOVIC et al. 2005). Der NaPi-IIb ist eine Isoform des renalen Typ II Na^+/P_i -Co-Transporters (HILFIKER et al. 1998). Die primäre Sequenz der Isoform der Säugetiere variiert zwischen 599 (NaPi-IIc) bis hin zu 640 Aminosäuren (NaPi-IIa und b) welche sich hauptsächlich in der intrazellulären C- und N-terminalen Region und der langen extrazellulären Linker-Region unterscheiden (FORSTER et al. 1999). Dabei spielt die C-terminale Region insbesondere bei der hormonellen Regulation und der Protein-Protein Interaktion eine Rolle (HERNANDO et al. 2001; KARIM-JIMENEZ et al. 2001).

Ein weiterer P_i -Transporter, der *type III sodium-dependent phosphate cotransporter* (PiT1), stammt aus der Familie der SLC20 Proteine und wurde erstmalig in Tumorzellen bei Gibbons detektiert (KAVANAUGH et al. 1994; OLAH et al. 1994). Der PiT1 wird ebenfalls im Dünndarm vorwiegend im Duodenum und Jejunum exprimiert. Des Weiteren haben Untersuchungen an Ratten gezeigt, dass der PiT1 im Ileum nahezu unbedeutend zu sein scheint (GIRAL et al. 2009).

Inwieweit diese P_i -Transporter beim Pferd exprimiert werden und welche Bedeutung sie im Hinblick auf den intestinalen P_i -Transport haben, ist bisher nicht untersucht.

So konnte im Duodenum bei Ziegen ein protonenabhängiger, Na^+ -sensitiver P_i -Transport festgestellt werden, der nicht zu der NaPi Typ II Familie gehört und weder von einer Ca^{2+} - noch einer P_i -restriktiven Diät beeinflussbar ist (HUBER et al. 2002). Dagegen wurde im Jejunum ein NaPi-IIb vermittelter Transport detektiert. Dies wurde anhand einer P_i -restriktiven Fütterung überprüft. Hier stellte sich heraus, dass die P_i -Restriktion die Expression des NaPi-IIb Proteins beeinflusst, indem es eine erhöhte P_i -Transportkapazität zeigt (HUBER et al. 2002). Vesikelstudien von Kaninchen zeigten für das Duodenum einen pH-Wert abhängigen P_i -Transport. Dabei konnte gezeigt werden, dass der pH-Wert bei der Aufnahme ebenfalls eine wichtige Rolle spielt (DANISI et al. 1984).

In Folge einer P_i -restriktiven Diät konnte im Bereich des Jejunums bei Ratten eine adaptive Antwort auf die Transportkapazität von P_i beobachtet werden. Hierbei erhöhte sich NaPi-IIb auf mRNA und Proteinebene. Eine Erhöhung des PiT1 konnte nicht gezeigt werden. Zudem zeigte die Studie auch, dass die Na^+/P_i -Transportaktivität und NaPi-IIb-Protein-Expression im Duodenum verglichen mit Jejunum unterschiedlich reguliert wurde (GIRAL et al. 2009).

2. Literatur

Bei Pferden konnte eine P_i -Sekretion, besonders im vorderen Dünndarmbereich sowie im Caecum und Teilen des Colons detektiert werden (SCHRYVER et al. 1972). Die Bedeutung und Funktion einer P_i -Sekretion ist bis heute noch unklar. Eine P_i -Sekretion in der Speicheldrüse ist bereits mehrfach in der Literatur beschrieben worden, doch bis heute sind die zu Grunde liegenden Mechanismen hierfür unbekannt. HUBER et al. (2003) wies erstmalig den NaPi Typ II-Transporter an der Speicheldrüse von Ziegen nach. Auch Untersuchungen an der Milchdrüse zeigten, dass die Expression des NaPi-IIb sowohl durch eine Reduktion des P_i in der Diät als auch durch Vitamin D beeinflusst werden konnte (HUBER et al. 2007; MUSCHER et al. 2009). Dies lässt die Vermutungen offen, ob eventuell ein Na^+ -gekoppelter P_i -Transport, vielleicht sogar der NaPi-IIb, eine Rolle bei der P_i -Sekretion spielt.

3. Material und Methoden

Die verwendeten Rezepte und Pufferlösungen sowie die Anschriften der unterschiedlichen Firmen sind zur besseren Übersichtlichkeit in alphabetischer Reihenfolge geordnet im Anhang zu finden.

3.1 Tiere und Haltung

Es standen neun Deutsche Warmblutpferde sowie ein Vollblut, ein Niederländisches Reitpferd und ein Französisches Warmblut im Alter zwischen drei und 22 Jahren zur Verfügung (Tabelle 1). Alle Pferde waren labordiagnostisch unauffällig, hatten ein ungestörtes Allgemeinbefinden und waren frei von gastrointestinalen Erkrankungen. Über einen Zeitraum von fünf Monaten wurden jeweils zwei Pferde zeitgleich für 21 Tage im institutseigenen Stall in Laufboxen mit Sägespänen eingestallt. Am Tag 22 erfolgte die Euthanasie und Probenentnahme.

Tabelle 1: Gruppeneinteilung, Rasse, Alter, Geschlecht und Gewicht der Versuchstiere.

S = Stute, W = Wallach, H = Hengst, Dt. = Deutsches

Versuchs Nr.	Datum der Euthanasie	Name	Rasse	Alter [Jahre]	Geschlecht	Gewicht [kg]
V01	25.11.2013	LadyPower	Dt. Warmblut	11	S	500
V02	26.11.2013	Lanci	Dt. Warmblut	3	S	395
V03	16.11.2013	Udo	Dt. Warmblut	5	W	590
V04	17.12.2013	Chacerto	Dt. Warmblut	5	H	560
V05	27.01.2014	Bertine	Niederländisches Reitpferd	21	S	461
V06	28.01.2014	Fama	Vollblut	19	S	548
V07	17.02.2014	Ambrella	Französisches Warmblut	12	S	528
V08	18.02.2014	Walenzia	Dt. Warmblut	20	S	624
V09	10.03.2014	CathaZ	Dt. Warmblut	11	S	570
V10	11.03.2014	Gwencona	Dt. Warmblut	18	S	570
V11	31.03.2014	Loniella	Dt. Warmblut	23	S	582
V12	01.04.2014	Leona	Dt. Warmblut	24	S	480

3. Material und Methoden

3.1.1 Fütterung

Die Pferde wurden im Erhaltungsbedarf mit Raufutter (Heu, 1,5 kg/100 kg Lebendmasse (LM)) und Kraftfutter (Hafer, 1 g Stärke/kg LM) gefüttert. Die Tagesration wurde auf zwei Einzelrationen (Morgen- und Abendfütterung) aufgeteilt. Wasser stand *ad libitum* zur Verfügung. Die Gehalte an Rohnährstoffen, Faserfraktionen sowie Ca^{2+} und P_i des Raufutters und des Kraftfutters sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Ca^{2+} - und P_i -Gehalte und Rohnährstoffgehalte nach der erweiterten Weender Analyse nach van Soest im Kraft- und Raufutter (Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg), TM = Trockenmasse

Rohnährstoffe	Hafer in [g/kg TM]	Heu in [g/kg TM]
Trockensubstanz	912,1	944,32
Rohasche	29,3	52,39
Ca^{2+}	0,73	3,52
P	3,80	2,31
Rohprotein	123,6	89,59
Rohfett	49,4	9,23
Rohfaser	124,4	348,66
Neutral-Detergenz-Faser	316,0	650,74
Säure-Detergenz-Faser	178,3	390,84
Säure-Detergenz-Lignin	31,2	46,7

3.1.2 Tötung und Probenentnahme

Am Tag der Euthanasie wurde den Pferden ein Venenverweilkatheter in die *Vena jugularis* gelegt, über den zunächst Blutproben genommen wurden. Die Proben wurden direkt nach der Entnahme auf Eis gelagert und unverzüglich der Analyse zugeführt (Bestimmung von Ca_t und ionisiertem Ca^{2+} bzw. zur Gewinnung von Serum und Plasma bei mindestens 1500g und mindestens 10 min zentrifugiert bei RT). Bis zur weiteren Analyse (P_i) wurden die Proben bei -20°C gelagert. Die Bestimmung der Ca^{2+} -Konzentrationen erfolgte in der Klinik für Pferde, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover.

Für die Euthanasie wurden die Tiere mit Romifidin (0,12 mg/kg KGW) sediert und anschließend mit Diazepam (0,05 mg/kg KGW) und Ketamin (2,2 mg/kg KGW) in Narkose gelegt. Anschließend erfolgte die Euthanasie mit Pentobarbital (60 mg/kg). Nach Feststellung des Todes (Herz- und Atemstillstand, Areflexie) wurde das obenliegende Hinterbein

3. Material und Methoden

ausgebunden und die Bauchhöhle entlang der *Linea alba* eröffnet. Die Gewebeproben wurden innerhalb von 5-10 min *post mortem* entnommen und mit eiskalter physiologischer Kochsalzlösung bis zur Reinheit gespült. Für die funktionellen Untersuchungen in den Ussing-Kammern wurden Gewebeproben des Duodenums, Jejunums, Caecums und rechten dorsalen Colons in eiskaltem Krebs-Henseleit Puffer mit Carbogen begast. Anschließend wurde die Tunica mucosa von der darunterliegenden Muskel- und Serosaschicht mit Hilfe von Pinzette, Schere und Metallschieber getrennt und in die Ussing-Kammern eingespannt.

Die Gewebeproben für die molekularbiologischen Untersuchungen (Duodenum, proximales Jejunum, distales Jejunum, Ileum, Caecum, rechtes dorsales Colon, linkes dorsales Colon und Niere) wurden ebenfalls unmittelbar nach Entnahme gespült und die Tunica mucosa nach Trennung von der Tunica serosa und der Tunica muscularis in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Für die immunhistologischen Untersuchungen wurden in Bouin-Lösung fixierte quadratische Gewebeproben des Jejunums (Kantenlänge 1,5cm) verwendet. Diese wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Funktionelle Histologie und Zellbiologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Ralph Brehm bearbeitet und bereitgestellt (Anatomisches Institut, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover).

3.2 Funktionelle Untersuchungen

Die funktionellen Untersuchungen zum transepithelialen Transport von Ca^{2+} und P_i wurden mit Hilfe der Ussing-Kammer-Technik durchgeführt. Neben den elektrophysiologischen Parametern wurden die unidirektionalen Fluxraten von Ca^{2+} , P_i und Mannit bestimmt. Die Ussing-Kammer-Technik ist ein In-vitro-System, das von Ussing und Zerahn (1951) erstmals beschrieben wurde und für transepitheliale Transportmessungen an verschiedenen Geweben verwendet wird.

3.2.1 Prinzip der Ussing-Kammer-Technik

Durch Einspannen der Mucosa in Plexiglaskammern mit einer exponierten serosalen Fläche von $1,13 \text{ cm}^2$ entstehen zwei Kompartimente, die zum einen die serosale Seite (ehemalige Blutseite) und zum anderen die mucosale Seite (ehemalige luminale Seite) des Gewebes repräsentieren. Beide Kompartimente werden jeweils mit einem serosalen bzw. mucosalen Puffer befüllt und mit Carbogen (95% O_2 und 5% CO_2) kontinuierlich begast. Mittels Wasserbad mit Umwälzfunktion wurden die Kompartimente mit den jeweiligen Pufferlösungen und dem eingespannten Gewebe auf einer physiologischen Temperatur von 37°C gehalten (Abbildung 3). Die Zusammensetzungen der Pufferlösungen sind im Anhang aufgeführt. An den Kammern sind zwei gewebe-nahe Agarbrücken sowie zwei gewebe-ferne Silberchlorid- (Ag/AgCl) Elektroden angebracht, die wiederum an eine computergesteuerte Strom-Spannungsklemmeinrichtung (Wissenschaftliche Geräte, K. Mußler, Aachen) angeschlossen sind.

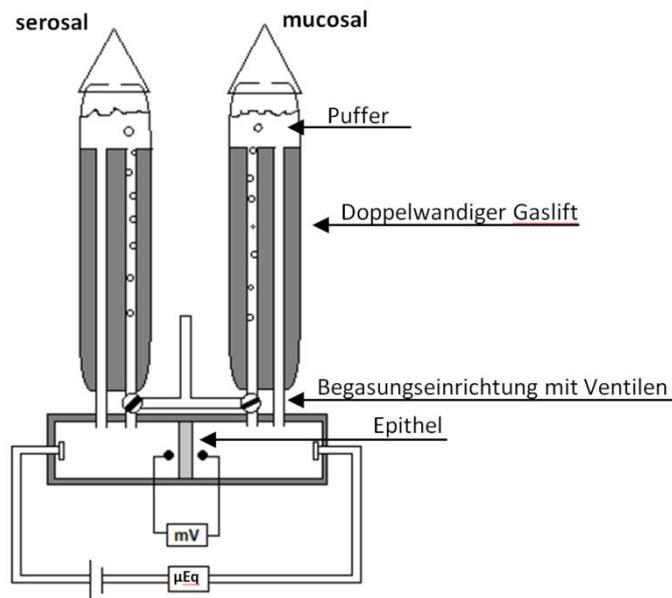


Abbildung 3: Schematischer Aufbau einer Ussing-Kammer mit Strom-Spannungsklemmeinrichtung

Die Agarbrücken wurden in eine 3 mol/l KCl-Lösung eingetaucht umso die Stromleitungsfunktion der Agarbrücken sicherzustellen. Die transepitheliale Potentialdifferenz (PD_t), die durch einen gerichteten Ionen-Nettotransport über das Gewebe entsteht, wird über die gewebe-nahen Agarbrücken im Abstand von je 6 Sekunden kontinuierlich gemessen und

3. Material und Methoden

aufgezeichnet. Die gewebefernen Agarbrücken dienen dazu, gezielte Stromimpulse von 100 μA auf das Epithel zu geben. Diese Strompulse induzieren eine vorübergehende Änderung der transepithelialen PD_t , aus der mit Hilfe einer Umformung des Ohmschen Gesetzes, nämlich ($R_t = \Delta\text{PD}_t / \Delta I$ (R_t = transepithelialer Gewebewiderstand), schließlich die Gewebeleitfähigkeit G_t ($G_t = 1/R_t$) bestimmt wird. Mit dieser Apparatur lassen sich je nach Fragestellung verschiedene Messverfahren durchführen. Die oben beschriebenen Messungen erfolgen unter Open-Circuit-Bedingung. Unter Short-Circuit-Bedingungen wird von den gewebefernen Elektroden ein Strom auf das Epithel gegeben. Dieser Klemmstrom (I_c) gleicht den Kurzschlussstrom (I_{sc}) des Gewebes aus ($I_{sc} = -I_c$), der durch elektrogenen Netto-Ionentransport des Gewebes entsteht. Da die resultierende Potentialdifferenz dann gleich 0 mV ist, kann unter Short-Circuit-Bedingungen ein elektrischer Gradient als potentielle Triebkraft für den transepithelialen Transport von Ionen ausgeschlossen werden. Wenn unter diesen Bedingungen auch kein chemischer Gradient angelegt wird, kann aus der Differenz zwischen den unidirektionalen Fluxraten auf die Existenz aktiver Transportsysteme geschlossen werden. Der Kurzschlussstrom wird als Ladungstransfer pro Zeit und Fläche angegeben [$\mu\text{Eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}$].

3.2.2 Bestimmung der unidirektionalen Fluxraten

Es wurden die unidirektionalen Fluxraten von Ca^{2+} , P_i und Mannit mit Hilfe der Radioisotopen-Tracer-Technik in Abwesenheit eines elektrochemischen Gradienten bestimmt. Hierzu wurden die radioaktiven Isotope $^{45}\text{Ca}^{2+}$ und $^{32}\text{P}_i$ sowie das [^3H]-markierte Mannit verwendet (Perkin Elmer LHS, 63110 Rodgau-Jügesheim). Mannit wurde bereits in mehreren Studien als ein Marker des parazellulären Weges beschrieben (SCHRÖDER et al. 1997). Die zu untersuchenden Darmabschnitte Duodenum, mittleres Jejunum, Caecum und rechtes dorsales Colon wurden nach dem in Tabelle 3 dargestellten Versuchsprotokoll in die Ussing-Kammern eingespannt. Eine definierte Menge der Radioisotope und des Tritium-markierten Mannits (159,5 kBq, 3,5 μCi) wurden in eines der beiden Kompartimente gegeben („heiße“ Seite). Proben aus der heißen Seite wurden zu Beginn und am Ende des Versuches entnommen (1. und 2. „heiße“ Probe) um daraus die spezifische Aktivität der Kammern zu berechnen. Aus dem Kompartiment der jeweils anderen Seite („kalte“ Seite) wurden drei Proben (Volumen: 500 μl) in 15-minütigen Zeitabständen entnommen. Um Volumen- und resultierende

3. Material und Methoden

Druckunterschiede am Gewebe zu vermeiden, wurde direkt nach der Probenentnahme die "kalte" Seite mit entsprechender Pufferlösung gleichen Volumens aufgefüllt.

Die entnommenen Proben wurden mit Szintillationsflüssigkeit auf ein Volumen von 4,75 ml (Rotiszint® eco plus LSC-Universalcocktail, ROTH) aufgefüllt und zur Bestimmung der Zählrate in einen Flüssigkeitsszintillationszähler (Wallac 1410, Pharmacia) gestellt. Die Berechnung der unidirektionalen Fluxraten von mucosal nach serosal (J_{ms}) und von serosal nach mucosal (J_{sm}) erfolgte anhand einer modifizierten Formel von SCHULTZ u. ZALUSKY (1964).

$$J = [\text{dpm}_n - (v_s - v_p) \cdot (v_s)^{-1} \cdot \text{dpm}_{n-1}] \cdot [(v_s \cdot M_i) \cdot (\text{dpm}_H \cdot t \cdot A)^{-1}]$$

Dabei gilt:

J = Fluxrate [$\text{nmol}/\text{cm}^2/\text{h}$]

dpm_n = Zerfälle pro min gemessen als Aktivität in Probe n [dpm]

dpm_{n-1} = Zerfälle pro min gemessen als Aktivität in Probe n-1 [dpm]

dpm_H = gemessene Aktivität der „heißen Seite“, berechnete Mittelwerte aus den Proben *H1* und *H2*, bezogen auf ein Volumen von einem Milliliter [dpm]

V_s = Volumen der Pufferlösung in Säule [ml]

V_p = Volumen der von „kalten“ Seite entnommenen Probe [ml]

M_i = Konzentration der unmarkierten zu untersuchenden Substanz im Puffer [mmol/l]

t = Zeitintervall zwischen Probe n-1 und Probe n [h]

A = serosale Fläche des transportierenden Epithels [cm^2]

Die Berechnung der Nettofluxrate J_{net} ergibt sich aus der Differenz der unidirektionalen Fluxraten:

$$J_{\text{net}} = J_{ms} - J_{sm}$$

3. Material und Methoden

Tabelle 3: Protokoll für die Belegung der 24 Ussingkammern (Nr. 1-24) zur Bestimmung der unidirektionalen Fluxraten von Ca^{2+} , P_i und Mannit (sm: Fluxrichtung serosal nach mucosal, ms: Fluxrichtung mucosal nach serosal, V01–V06: Versuche Pferd 1-6).

Gewebe	Fragestellung	Fluxrichtung	Kammer (Nr.)
Duodenum	Experimentelle Gruppe	sm	1 u. 3
		ms	2 u. 4
	Zeitkontrolle Pferd. V01 - V06	sm	5
		ms	6
mittleres Jejunum	Experimentelle Gruppe	sm	7 u. 9
		ms	8 u. 10
	Zeitkontrolle Pferd. V01 - V06	sm	11
		ms	12
Caecum	Experimentelle Gruppe	sm	13 u. 15
		ms	14 u. 16
	Zeitkontrolle Pferd. V01 - V06	sm	17
		ms	18
rechtes dorsales Colon	Experimentelle Gruppe	sm	19 u. 21
		ms	20 u. 22
	Zeitkontrolle Pferd. V01 - V06	sm	23
		ms	24

3.2.3 Durchführung der Ussing-Kammer-Versuche

Für die funktionellen Untersuchungen wurden 24 Ussing-Kammern des Physiologischen Institutes der Tierärztlichen Hochschule Hannover verwendet. Es wurden vier Darmabschnitte eines Pferdes zeitgleich untersucht. Dabei wurden pro Darmabschnitt sechs Kammern genutzt. In Versuch 1 (Pferd 1-6) wurden jeweils zwei von diesen sechs Kammern als Zeitkontrolle verwendet. Die Zeitkontrollen dienen zur Überprüfung eines Einflusses der Zeit auf das Gewebe. Die Bestimmung der unidirektionalen Fluxraten J_{ms} und J_{sm} erfolgte in Doppelbestimmung unter Short-Circuit-Bedingungen (Abbildung 4). Nach Einspannen der Mucosa erfolgte die Zugabe der Radiosotope $^{45}\text{Ca}^{2+}$ bzw. $^{32}\text{P}_i$ und des $[^3\text{H}]$ -markierten Mannits. Nach einer Äquilibrationsphase von 30 min wurden die basalen Fluxraten für Ca^{2+} bzw. P_i sowie für Mannit, wie unter 3.2.2 beschrieben, bestimmt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 20 mM 2,4,6-Triaminopyrimidinium (TAP) auf die mucosale Seite und die Bestimmung der unidirektionalen Fluxraten unter Einfluss von TAP. Nachfolgend wurde im Versuch 1 (Pferd 01 bis 06) der Effekt des Ca^{2+} -kanalblockers Ruthenium Rot (RR) auf die Ca^{2+} Fluxraten und im Versuch 2 (Pferd 07 bis 12) der Effekt von Na^+ -Arsenat auf die P_i Fluxraten untersucht.

3. Material und Methoden

Dafür wurden $5 \cdot 10^{-2}$ mM RR (bei Versuch 1) bzw. 5 mM Na^+ -Arsenat (bei Versuch 2) auf die mucosale Seite gegeben und anschließend die Fluxraten anhand einer Doppelbestimmung bestimmt.

Zur Überprüfung der Vitalität und der Integrität des Epithels wurde am Ende jedes Versuches 10 mmol/l Glucose (Merck, Darmstadt) (Duodenum und mittleres Jejunum) bzw. 10^{-2} mM Forskolin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) (Caecum, rechtes dorsales Colon) hinzugegeben. An den Dünndarmabschnitten wurde nach Zugabe von Glucose ein Anstieg des I_{sc} erwartet, da Glucose über den SGLT1 im elektrogenen Co-Transport mit zwei Na^{2+} Ionen transportiert wird. Forskolin stimuliert die Adenylatzyklase. Dies führt zur Bildung des zyklischen intrazellulären Adenosinmonophosphat (cAMP) (SEAMON u. DALY 1981a; SEAMON u. DALY 1981b), zur Aktivierung der Proteinkinase A und nachfolgender Stimulation des phosphorylierungsabhängigen CFTR-Kanals, über den Chlorid- und Bikarbonat sezerniert werden, was in einem Anstieg des I_{sc} resultiert (BRIDGES et al. 1983; POULSEN et al. 1994; SEIDLER et al. 1997; CLARKE u. HARLINE 1998; HUG et al. 2003; SPIEGEL et al. 2003).

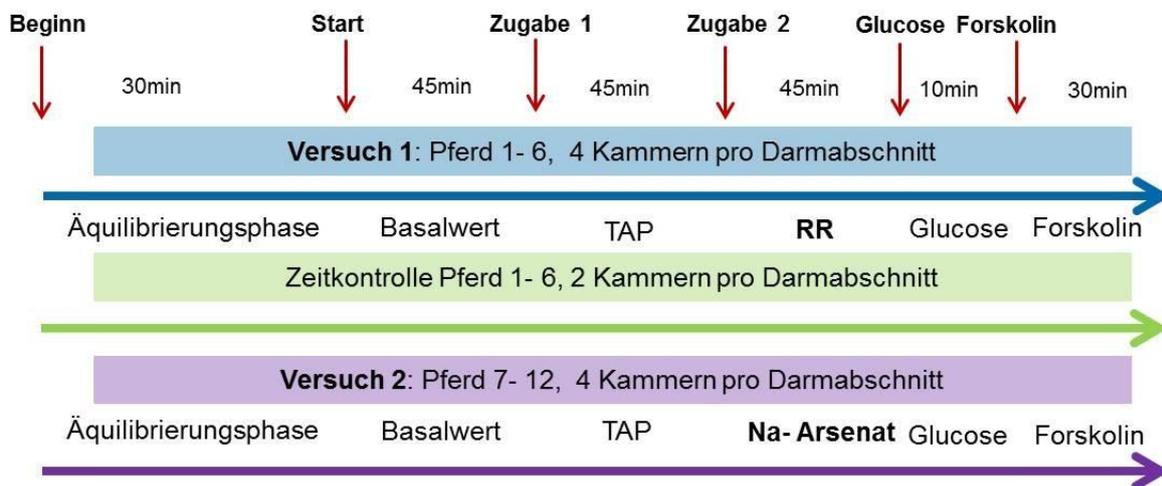


Abbildung 4: Idealisierte Übersichtsdarstellung der Ussing-Kammer-Versuche. Zugabe von Glucose und Forskolin im Dünndarm, ausschließlich Forskolin im Dickdarm. Die Zeitkontrollen dienen der Überprüfung eines Einflusses der Zeit auf das Gewebe.

3.3 Präparative Methoden für molekularbiologische Untersuchungen

Die für die Expressionsstudien notwendigen Gewebepreparationen erfolgten an vier Abschnitten des Dünndarms (Duodenum, proximales Jejunum, distales Jejunum und Ileum) und an drei Abschnitten des Dickdarms (Caecum, rechtes dorsales Colon, rechtes ventrales Colon). Alle verwendeten Puffer sowie Gebrauchslösungen sind unter 8. Anhang, B „Hergestellte Puffer und Lösungen“ zu finden. In Folge aufgelistete Firmen sind im Firmenverzeichnis unter 8. Anhang zu finden. Die Zentrifugationen, welche mit 1,5 ml Reaktionsgefäß zentrifugiert wurden, wurden mit einer Biofuge *pico* von Heraeus (Heraeus Holding GmbH, 63450 Hanau) durchgeführt.

3.3.1 Rohmembran-Präparation für molekularbiologische Untersuchungen

Die Präparation der Rohmembranen erfolgte nach einer modifizierten Methode nach Oswald et al. (2005). Es wurde 1 g der Mucosa mit 10 ml Homogenisierungspuffer und 50 µl PMSF (0,4 mol/l) mit Hilfe eines Elvehjem-Potters (Potter S30, 5 ml, B. Braun Melsungen, 34209 Melsungen) homogenisiert und anschließend für 20 min bei 4 °C und 2000 g zentrifugiert (Optima™ L-70K Ultrazentrifuge, Beckman Coulter®, Rotor 40 Ti). Durch die Zentrifugation sammelten sich Zelltrümmer, Zellkerne und Mitochondrien am Boden des Gefäßes und wurden durch Verwerfen der Pellets entfernt. Der Überstand wurde nachfolgend für 60 min bei 4 °C und 4000 g zentrifugiert, um die cytosolischen Proteine (Überstand) von den Rohmembranen (Pellet) zu trennen. Das Pellet wurde mit einem Resuspensionspuffer, der 1,5 µl eines Protease Inhibitor Cocktails, (Sigma-Aldrich, 89555 Steinheim) je 100 µl Resuspensionspuffer enthielt, resuspendiert, wobei 100 µl Resuspensionspuffer für ca. 0,1 cm Pelletdurchmesser verwendet wurden. Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentrationen anhand des Bio-Rad Proteinassays und die Aufteilung in Aliquots zu je 50 µg Protein. Die Aliquots und die Stammlösungen wurden bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

3.3.2 Cytosol-Präparation für molekularbiologische Untersuchungen

Die Cytosol-Präparation erfolgte nach einer Methode von SCHRÖDER et al. (2001). Dabei wurden 0,2 g der Mucosa mit Cytosolpräparationspuffer im Verhältnis 1:10 mit Hilfe eines

3. Material und Methoden

Elvehjem-Potters (Potter S30, 5 ml, B. Braun Melsungen, 34209 Melsungen) und nachfolgendem Aufziehen mit einer 1 ml-Einmalspritze und einer 0,45 x 0,23 mm großen Einmalkanüle (B. Braun Melsungen AG, 34209 Melsungen) homogenisiert. Durch Zentrifugation für 30 min bei 4 °C und 17 500 g (Megafuge 1.0R mit Rotor 3041, Heraeus Instruments, 63450 Hanau) erfolgte die Trennung der Zelltrümmer und –membranen (Pellet) von den cytosolischen Proteinen (Überstand). Nach Bestimmung der Proteinkonzentration der Cytosol-Präparationen wurden Aliquots mit 50 µg Proteingehalt hergestellt und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.3.3 Apikale Membran-Präparation

Es wurde 1 g der Mucosa sehr fein gemörsert, mit 1 ml Präparationspuffer (9 ml Homogenisierungspuffer und 50 µl PMSF (0,4 mol/l) gemischt und mit weiteren 4 ml Präparationspuffer in einem Pottergefäß (Potter S30, 5 ml, B. Braun Melsungen, 34209 Melsungen) homogenisiert. Anschließend wurden dem Homogenat weitere 4 ml des Präparationspuffers zugegeben und unter ständigem Rühren auf Eis tropfenweise CaCl₂ (100 mmol bis zu einer finalen Konzentration von 10 mmol·l⁻¹ versetzt). Das Homogenat wurde für 30 min inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 20 min bei 4 °C und 2000 g. Der Überstand wurde erneut für 30 min bei 4 °C und 25 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl Resuspensionspuffer versetzt, der 7,5 µl Protease Inhibitor (Sigma-Aldrich, 89555 Steinheim) in 500 µl Pufferlösung enthielt, und resuspendiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurden Aliquots mit je 50 µg Protein bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

3.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration der Gewebe-Präparationen

Die Proteinkonzentrationen der Gewebepreparationen wurden photometrisch unter Verwendung des Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories GmbH, 80939 München) bestimmt. Nach dem Auftauen der Proben auf Eis wurden diese durch wiederholtes Aufziehen mit Hilfe einer 1 ml-Einmalspritze und einer 0,45 x 0,23 mm großen Einmalkanüle (B. Braun Melsungen AG, 34209 Melsungen) homogenisiert und mit *aqua destillata* (A. dest.) im Verhältnis 1:5 bis 1:20 verdünnt. Es wurde eine Standardreihe mit γ -Globulin-Konzentrationen

3. Material und Methoden

von 0,144, 0,288, 0,432 und 0,576 mg/ml angesetzt. Sowohl die Standards, der Leerwert (50 µl A. dest.) und die Proben wurden im Doppelansatz mit 50 µl einer 1%igen Saponinlösung versehen und 20 min inkubiert. Das Saponin wird für die Verbesserung der Proteinbindungsstellen für das Farbreagenz verwendet. Nach der Inkubation wurden alle Proben mit 2,5 ml des BioRad Reagenz (Farbstoff Coomassie-Brilliant-blau G-250, Verdünnung 1:5 mit A. dest.) versetzt und mindestens 5 min, max. 60 min jedoch im Schnitt weitere 15 min inkubiert. Der Farbstoff bindet in sauren Lösungen an Proteinstrukturen und wechselt dabei von seiner kationischen in seine anionische Form, was in einem Farbumschlag von Rot (Absorptionsmaximum bei 465nm) nach Blau (Absorptionsmaximum bei 595nm) resultiert. Die Extinktion der Proben und der Standards wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen den Leerwert gemessen (Beckman DU[®] 640 Spectrophotometer, Beckman Coulter[®], 47807 Krefeld). Anhand der Standardreihe erfolgte computergestützt die Erstellung einer Regressionsgeraden, aus der die Proteinkonzentrationen der Proben berechnet wurden.

3.3.5 RNA-Isolierung

Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurde das RNeasy[®] Mini-Kit (250) (QIAGEN 40724 Hilden) verwendet. Es wurden 20 mg der Mucosa in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörsert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf AG, 22339 Hamburg) überführt, mit 600 µl RLT-Puffer versetzt und homogenisiert. Der RLT-Puffer war mit 1% β-Mercaptoethanol, das zur Spaltung der Disulfidbrücken diente, angereichert. Durch Zentrifugation für 3 min bei 10 000 g wurden Zelltrümmer abgetrennt. Der Überstand wurde auf eine gDNA-Eliminationssäule übertragen und 1 min bei 10 000 g zentrifugiert. Danach wurde die Säule verworfen und im Durchfluss die RNA mit 550 µl 70% Ethanol ausgefällt. In zwei Schritten wurde diese auf die RNeasy[®]-Säule übertragen und jeweils 1 min bei 10 000 g zentrifugiert. Dabei wurde die RNA in der Kieselgelmembran angereichert. Danach wurden drei Waschschrte durchgeführt. Der erste Waschschrte erfolgte mit 700 µl RW1 Puffer, die beiden nachfolgenden Waschschrte mit jeweils 500 µl RPE Puffer. Danach wurde die Säule 2 min bei 10 000 g bis zur vollständigen Trocknung zentrifugiert und die RNA mit 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert (Zentrifugation 1 min bei 10 000 g). Die RNA-Konzentrationen wurden zum einen photometrisch (Eppendorf Biophotometer[®], 22339 Hamburg) und zum anderen via

3. Material und Methoden

RNA Integrität mit dem Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Waldbronn) bestimmt. Die Gesamt-RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

3.3.6 Messung der RNA-Integrität

Die mRNA ist ein relativ instabiles Molekül. Um eine gute Qualität, welche auf einer intakten und nicht degradierten RNA beruht, der RNA für molekularbiologische Untersuchungen zu gewährleisten, ist eine Qualitätskontrolle der RNA sinnvoll und notwendig. Diese wurde anhand der Lab-on-Chip-Technologie mittels Kapillargelelektrophorese unter Verwendung des Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, 71034 Böblingen) in der Klinik für Rinder der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover durchgeführt. Die RNA-Integrität wurde durch Bestimmung der RNA-Integritätsnummer (RIN) ermittelt. Der RIN Wert beschreibt den Degradationszustand der RNA auf einer Skala von 1 (vollständig degradierte RNA) und 10 (vollständig intakte RNA). Als optimal für die molekularbiologische Untersuchung werden RIN-Werte zwischen 8 und 10 angesehen. Die RIN-Werte werden computergestützt aus dem Verhältnis der ribosomalen Untereinheiten der 18S- und 28S-RNA und den degradierten Abbauprodukten berechnet. Das optimale Verhältnis zwischen 18S-RNA und 28S-RNA beträgt 1:2.

Zunächst wurden die RNA Proben, die Gelmatrix-Aliquots, Marker und NanoDye auf Eis aufgetaut. Mit Hilfe eines dummy Chips wurden anhand von H₂O bzw. RNaseZAP die Elektroden dekontaminiert. Die Herstellung der benötigten RNA-Aliquots (Verdünnung 1:20) und des Gel-Dye Mix wurde im Vorfeld durchgeführt. Hierbei wurden für die Gel-Aliquots 550 µl Nano Gel Matrix auf den Spin-Filter pipettiert und 10 min bei 1520 g zentrifugiert. Danach wurden Aliquots zu je 65 µl bei -20 °C eingefroren. Zur Herstellung des Gel-Dye Mix wurden die 65 µl Aliquots gevortext, zentrifugiert und im Anschluss mit 1 µl NanoDye Konzentrat vermischt und erneut 10 min bei 13 730 g zentrifugiert. Anschließend wurden 9 µl des Gel-Mix auf dem Boden der Well-Platten (gekennzeichnet mit G+, schwarzer Kreis) pipettiert. Danach wurde der Chip auf die Priming Station gelegt und das Gel per Luftdruck über die gesamte Platte gleichmäßig verteilt. Es wurde erneut 9 µl des Gel-Mix auf die gekennzeichneten Flächen des Chips gegeben.

3. Material und Methoden

Für die Analyse wurden 5 µl des Nano Markers in jedes der 12 Proben-Wells und in die Standard-Wells pipettiert um Drift-Effekte zu kompensieren. Daraufhin wurde jeweils 1 µl Probe aufgetragen, der Chip 1 min gevortext und in den Bioanalyzer eingelegt. Nach der Messung wurde der Chip entnommen und verworfen sowie die Elektroden mit dem RNaseZAP und H₂O gereinigt.

3.3.7 cDNA Synthese

Mit Hilfe des Taqman Reverse Transcription Reagents Kits (Applied Biosystems, Roche Molecular Systems) wurde aus isolierter Gesamt-RNA cDNA synthetisiert. Hierfür wurden 200 ng der RNA bis zu einem Gesamtvolumen von 9,6 µl mit RNase-freiem H₂O aufgefüllt. Es wurde ein *Master Mix* mit 2,5 µl 10-fach Puffer, 5,5 µl MgCl₂ (25mM), 5 µl dNTPs (10mM), 0,625 µl Oligo(dT)-*Primer* (500 µg/ml), 0,625 µl Random-hexamer-*Primer* (500 µg/ml), 0,5 µl RNase-Inhibitor (40 U/µl) und 0,68 µl Reverser Transkriptase (50U/µl) je Probe hergestellt. Zu jeder Probe von 9,6 µl à 200 ng RNA wurden 15,4 µl *Master Mix* hinzugegeben. Die cDNA Synthese erfolgte durch Inkubation im *Thermocycler* (Mastercycler gradient, 22339 Hamburg) unter folgenden Bedingungen: 10 min bei 25 °C, 45 min bei 48 °C, 5 min bei 95 °C und Abkühlung auf 4 °C und Lagerung (store) bei diesen (Tabelle 4). Die synthetisierte cDNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

Tabelle 4: Thermocycler-Inkubations-Protokoll für die cDNA Synthese

Zeit [min]	Temp. [°C]
10	25
45	48
5	95
Store	4

3.4 Expressionsstudien

Die Expression der Transportproteine für Ca²⁺ (TRPV6, CaBP_{D9k} und PMCA) und P_i (PiT1 und NaPi-IIb) sowie GAPDH entlang der Darmachse wurden auf Transkriptionsebene anhand der *Real Time* PCR (Polymerase-Kettenreaktion) durchgeführt. Auf Translationsebene wurden anhand von Western-Blot Analysen Ca²⁺ transportierende Strukturen untersucht. Für die *Real*

3. Material und Methoden

Time PCR wurde die cDNA (Kapitel 3.3.7) verwendet. Für die Western-Blot Analysen der Ca²⁺-transportierenden Strukturen wurden für die Untersuchung des CaBPD_{9k} die Cytosol-Präparationen (Kapitel 3.3.2), für die Untersuchung des TRPV6 die apikale Membran-Präparation (Kapitel 3.3.3) und für die Proteinexpression von PMCA die Rohmembran-Präparation (Kapitel 3.3.1) verwendet.

3.4.1 PCR für RNA- Nachweis

Die *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) dient dem Nachweis spezifischer mRNA *in vitro*. Als Ausgangsstoff werden hierfür die Produkte vorangegangener Zyklen für die jeweils nächsten Zyklen verwendet. Damit wird eine exponentielle Vervielfältigung ermöglicht. Diese Reaktion wird meist in drei Phasen unterteilt, die sich dann zyklisch wiederholen. Zunächst erfolgt die Denaturierung, bei der die Proben auf 95 °C erhitzt werden, um die Wasserstoffbrücken aufzubrechen, so dass die DNA einzelsträngig vorliegt. Es folgt die Primerhybridisierung (Annealing), bei der die Temperatur auf 55-65 °C abgekühlt wird, um die Anlagerung der Primer an die Matrizenstränge zu ermöglichen. Primer sind kurze Oligonucleotidsequenzen welche komplementär zu den jeweiligen Anfangs- und Endsequenzen des gesuchten DNA-Abschnittes sind. Diese binden spezifisch an die Einzelstränge in 3'-Richtung. Je nach Basenzusammensetzung der Primer variiert die optimale Aneling-Temperatur. Während der Elongationsphase wird die Temperatur auf 72 °C angehoben, um optimale Bedingungen für das Enzym Taq-Polymerase zu schaffen, das vom Primer aus in 5'-3'-Richtung den komplementären Strang aus den hinzugefügten dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphate) synthetisiert. Nach Abschluss der Enlongationsphase startet erneut die Denaturierungsphase. Dieses Protokoll wird bis zu 32-mal durchlaufen, um eine ausreichende Menge an DNA Fragmenten zu erhalten (BUSTIN 2000).

Die *quantitative real-time* RT-PCR (qPCR) (WIEDEMANN et al. 2004) beruht auf dem Prinzip der klassischen PCR. Der Unterschied zur klassischen PCR besteht darin, dass eine Quantifizierung mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen während eines PCR-Zyklus in Echtzeit durchgeführt wird, indem die Anzahl der Amplifikate während der PCR gemessen und anhand einer Schmelzkurve sichtbar gemacht werden kann (Abbildung 5). Durch Mitführen einer

3. Material und Methoden

Standardreihe mit einer bekannten Anzahl an DNA Fragmenten kann auf die Menge der amplifizierten Ausgangsmenge der cDNA geschlossen werden (BUSTIN 2000).

Die qPCR wurde mit Fluoreszenz-Messungen unter Verwendung des Fluoreszenz Farbstoffs SYBR[®] Green I durchgeführt. Dieser Farbstoff lagert sich an der doppelsträngigen DNA an. Eine Quantifizierung der DNA ist möglich, da die Zunahme der doppelsträngigen DNA mit der Stärke des Fluoreszenzsignals korreliert. Da die Fluoreszenz nur in der Phase der exponentiellen Vermehrung proportional zur Ausgangsmenge ist, kann nur in dieser Phase die Messung korrekt erfolgen. Der Beginn der exponentiellen Phase wird mit dem jeweiligen Ct-Wert (Cycle treshold) ermittelt, indem dieser angibt, ab welchem Zyklus die gemessene Fluoreszenz die der Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Mit Hilfe einer Standardkurve, die aus der Beziehung zwischen dem Logarithmus der bekannten cDNA-Menge, der Standardreihe und dem Ct-Wert besteht, kann der ursprüngliche Gehalt der cDNA der untersuchten Proben ermittelt werden. Da dieses Verfahren eine geringe Spezifität aufweist, ist es sinnvoll nach Ablauf der PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchzuführen. Bei dieser Analyse wird die DNA bei einer kontinuierlichen Temperaturerhöhung von 50 °C auf 95 °C aufgeschmolzen. Dabei denaturiert die doppelsträngige DNA fragmentspezifisch zur einfachsträngigen DNA, wobei der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt und die Änderung der Fluoreszenz registriert wird. Die Unterscheidung zwischen fehlgepaarten Nukleotidenpaaren und erwünschter DNA-Fragmente kann anhand des Kurvenverlaufs sichtbar gemacht werden, indem die Intensität des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit von der Temperatur aufgetragen wird (Abbildung 5) (BUSTIN 2000).

3. Material und Methoden

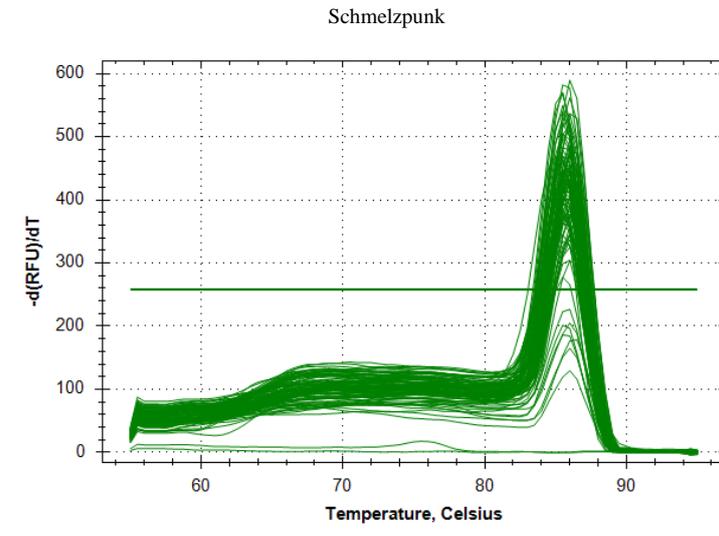


Abbildung 5: Abgeleitete Schmelzkurve der RNA-Expression von TRPV6 in Duodenum, prox. Jejunum, dist. Jejunum, Ileum, Caecum, rechtem dorsalem Colon, rechtem ventralen Colon und der Niere (Pferd V03, V05 und V07) sowie der Standardreihe. Die Veränderung der Fluoreszenz ist gegen die Temperatur aufgetragen.

3.4.2 Herstellung einer Standardreihe anhand Klonierung

Die PCR-Produkte wurden vor Beginn der Klonierung unter Verwendung des MinElute PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Die PCR-Produkte entstammen vorhergehender Untersuchungen mit jeweils spezifischen Primern.

Hierzu wurde dem PCR-Produkt ein Fünffaches seines Volumens an PB-Puffer hinzugegeben und auf eine MinElute Säule aufgetragen. Die Säule wurde 1 min bei 10 000 g zentrifugiert (Biofuge[®] pico, Heraeus instruments), um die DNA-Fragmente in der Säule zu sammeln. Der Durchfluss wurde verworfen, und die DNA wurde mit 750 µl PE-Puffer, welcher zuvor mit 100%igem Ethanol versetzt worden war, gewaschen, indem der Puffer auf die Säule pipettiert und danach 1 min bei 10 000 g zentrifugiert wurde. Nach erneutem Verwerfen des Durchflusses erfolgte die Trocknung der Säule bei einer Zentrifugation von 1 min bei 10 000 g. Um die DNA-Fragmente aus der Säule zu gewinnen, wurde auf diese 33 µl hochreines Wasser (Rotipuran[®] Low organic, ROTH) pipettiert und für 1 min inkubiert. Nach Inkubation wurde die Säule in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 1 min bei 10 000 g zentrifugiert. Die DNA-Fragmente wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

3. Material und Methoden

3.4.2.2 Klonierung

Die Klonierung dient der Vervielfältigung einzelner gewünschter Genabschnitte oder ganzer Gene. Die Klonierung umfasst drei Schritte: die Ligation, die Transformation und die Plasmidpräparation.

Für die Ligation wurden 3 μl des Amplifikats, 5 μl des zweifach-Puffers, 1 μl der T4 Ligase und 1 μl des Vektors (pGEM[®]-T Easy Vector System II, Promega) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Der Vektor verfügt über eine Ampicillin-Resistenz (Amp^r) und mehrere unterschiedliche Schnittstellen in der *Multiple Cloning Region*, in der auch das lacZ-Gen liegt. Das lacZ-Gen codiert die Fähigkeit des Abbaus von Galactose durch β -Galactosidase und wird zur Überprüfung einer erfolgreichen Ligation genutzt.

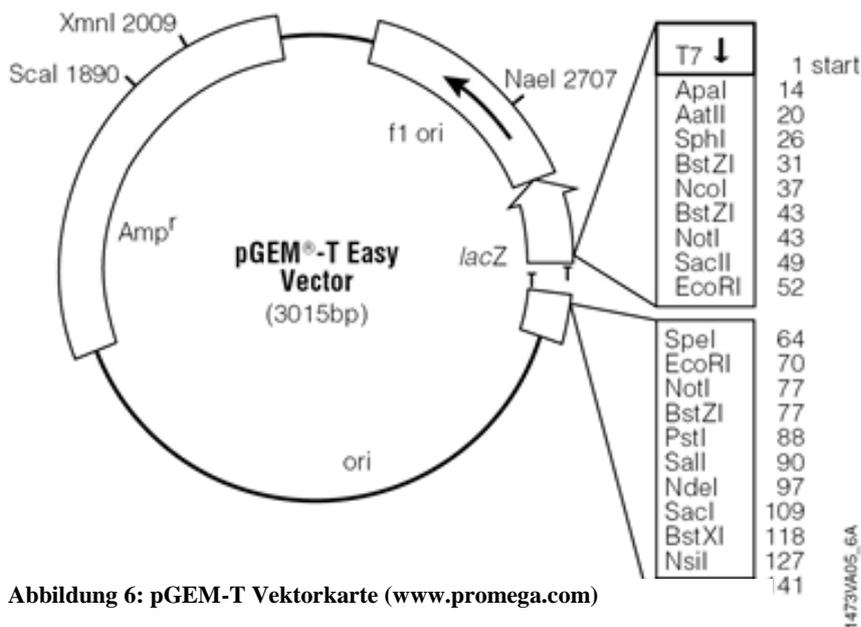


Abbildung 6: pGEM-T Vektorkarte (www.promega.com)

Für die Transformation wurden E. coli Zellen (JM109 Competent Cells von Promega (pGEM[®]-T Vector System II, 68199 Mannheim) auf Eis aufgetaut. Danach wurden 2 μl des Ligationsansatzes mit 30 μl E. coli Zellen versetzt und 20 min auf Eis inkubiert. Die nachfolgende Transformation durch Hitzeschock erfolgte bei 42 °C für 45 s in einem Heizblock (Thermomixer 5436, Eppendorf) und anschließender Inkubation für 2 min auf Eis. Zur Regeneration der Zellen und besserem Auftragen auf LB-Agar-Platten wurde zu der

3. Material und Methoden

Zellsuspension 570 μ l LB-Flüssigmedium hinzugegeben. Die Suspension wurde 2 h bei 37 °C und 150 rpm im Schüttelinkubator (GFL 3031) inkubiert. Während der Inkubation wurden die Ampicillin-haltigen (25 μ g/ml) LB-Agar-Platten mit 60 μ l Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)-Lösung (100mM Isopropyl- β -D-Galaktopyranosid) und 40 μ l XGal (50mg/ml 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- β -D-Galaktopyranosid) bestrichen. Nach der Inkubation wurden 100 μ l dieser Suspension gleichmäßig auf den LB-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Auf dem Selektivnährboden wuchsen nur Bakterienkolonien, die über das AMP^r verfügten. Zudem konnte anhand der Färbung der Kolonien differenziert werden, in welche der Bakterienkolonien der ligierte Vektor erfolgreich transformiert worden war. Eine Blaufärbung zeigte an, dass die Bakterienkolonie ein intaktes LacZ-Gen aufwies, wodurch XGal, eine Verbindung zwischen Galaktose und Indoxyl, aufgespalten werden konnte und das dadurch frei gewordene Indoxyl mit Luftsauerstoff zu dem Farbstoff Indigo reagierte. Zellen, die ein Plasmid ohne das PCR Produkt in der *multiple cloning region* aufgenommen hatten, verfügten über ein intaktes LacZ-Gen. Bei erfolgreicher Ligation des Inserts in die Vektorplasmide dagegen wurde das LacZ-Gen zerstört, wodurch die Fähigkeit Galactose abzubauen, verloren ging und diese Bakterienzellen weiße Kolonien bildeten. Das IPTG dient hierbei der Aktivierung des Lac Operons durch Bindung an das inhibitorische LacI Protein. Zur Herstellung von Subkulturen wurden zwei weiße Kolonien ausgewählt, gepickt und über Nacht bei 37 °C und 150 rpm im Schüttelinkubator in 3 ml LB-Flüssigmedium mit 6 μ l Ampicillin inkubiert. Für die Plasmidpräparation wurde das QIAGEN Plasmid Mini Kit (QIAGEN, Hilden) verwendet. Hierzu wurde die über Nacht inkubierte Kultur in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 6000 g zentrifugiert (Biofuge[®] pico, Rotor 3325) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 300 μ l des P1-Puffers resuspendiert. Die Zellwände wurden durch Zugabe des P2-Puffers lysiert und durch Zugabe von 300 μ l P3-Puffer und Inkubation von 5 min auf Eis wurde eine Fällung der bakteriellen DNA erreicht. Durch anschließende Zentrifugation bei 10 000 g und 10 min wurden Zelltrümmer und bakterielle DNA abgetrennt. Das bakterielle Plasmid befand sich aufgrund seiner geringen Größe im Überstand. Nach der Equilibrierung der Qiagen-Säule durch 1 ml QBT-Puffer, wurde der Überstand auf die Säule gebracht. Es folgten zwei weitere Waschschrte mit je 2 ml QC-Puffer. Danach konnte das Plasmid durch Beladen der Säule mit 800 μ l QF-Puffer in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Es wurden 560 μ l Isopropanol zur Fällung der DNA hinzugegeben und 30 min bei 10

3. Material und Methoden

000 g zentrifugiert, um die Plasmid DNA am Boden des Reaktionsgefäßes zu pelletieren. Das Pellet wurde luftgetrocknet und anschließend in 50 µl TE-Puffer gelöst.

Die Reinheit und Konzentration der DNA wurde photometrisch bestimmt (BioPhotometer, Eppendorf AG). Anschließend erfolgte die Lagerung bei -20 °C.

3.4.2.3 Verdünnungsreihe

Anhand der photometrischen Bestimmung der Konzentration der Plasmide in der Lösung konnte, unter Berücksichtigung der Größe des Vektors und des Amplifikats, errechnet werden, wie viel DNA notwendig war, um 50 µl einer Lösung herzustellen, bei der in 2 µl 10^{10} Kopien des Amplifikats enthalten sind. Diese wurde zur Herstellung einer Verdünnungsreihe durch weitere Verdünnungsschritten von je 1:10 bis zu einer Verdünnung von 10^2 Kopien / 2 µl unter Verwendung von hoch reinem Wasser (Rotipuran® Low organic) (Carl ROTH) genommen. Die Verdünnungsreihe wurde als Standardreihe in der qPCR eingesetzt.

3.4.3 *Quantitative real-time* RT-PCR zum Nachweis der RNA-Expression

Die Expressionen des TRPV6, CaBPD_{9k}, PMCA1b, NaPi-IIb und PiT1 wurden unter Verwendung der SYBR Green® qPCR mit dem Puffersystem der KAPA™ SYBER® FAST Universal PCR Master Mix 2x (KAPA™ Biosystem, PEQLAB) untersucht. In Tabelle 5, Tabelle 6 und 7 sind die notwendigen Inkubationsansätze, Inkubationsbedingungen und Primersequenzen aufgeführt. Als Housekeeping Gen wurde GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Pi-Dehydrogenase) als interner Standard zur Normalisierung verwendet. Die PCR wurde im Doppelansatz durchgeführt. Hochreines Wasser diente als Negativkontrolle.

3. Material und Methoden

Tabelle 5: Pipettierschema für SYBR Green® qPCR

Gebrauchslösungen	Konzentration der Gebrauchslösung [µmol/l]	Volumen im Reaktionsansatz [µl]
H ₂ O (Rotipuran®)		7,2
KAPA™ MM-Puffer	1-fach	10
<i>Primer sense</i>	10	0,4
<i>Primer antisense</i>	10	0,4
cDNA bzw. H ₂ O (Rotipuran®)		2
Gesamtvolumen		20

Tabelle 6: Inkubationsbedingungen SYBR Green® qPCR

Aktivität	Zeit [s]	Temperatur [°C]
Aktivierung DNA-Polymerase	180	95
PCR-Zyklen	10	95
Wiederholung 39x	30	60
Schmelzkurve	alle 10 Erhöhung von	0,5 55 bis 95

Tabelle 7: Primersequenzen für SYBR Green® qPCR (PMCA1b WILKENS et al. 2011, PiT1 ELFERS et al. 2015, TRPV6 CEHAK et al. 2012)

Gen	sense	antisense
GAPDH	atgcctcctgcaccacca	agtccctccacgatgccaa
TRPV6	gatctcaaccagcagcgact	gtgctgctacgggaggtact
CaBPD_{9k}	gagcgtgaaaaagtctcctga	ctccatctccgttctgtcc
PMCA1b	ggtattgctggaactgatgtagctaa	cgtccccacataactgcttt
NaPi-IIb	tcgtccatcattgtcagcat	acggagagccagttgaagaa
PiT1	attcatcctcgttaaggcagatc	cagcaatggtgctccagtataca

3. Material und Methoden

3.4.4 Western Blot Analysen

Für die semiquantitative Bestimmung der Proteinexpression wurde eine definierte Menge des Proteingemisches auf ein Gel aufgetragen und die Proteine elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt. Die entstandenen Proteinbanden werden in einem anschließenden Blot elektrophoretisch aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mittels spezifischer Antikörper und Chemilumineszenz unter Zuhilfenahme eines *Gel Imagers* (ChemiDoc™ BioRad) detektiert.

3.4.4.1 *Sodium Dodecyl Sulfat* (SDS)-Page

Die Auftrennung der Proteingemische in verschiedenen Mengen, je nach Fragestellung (siehe Tabelle 8 und 9) erfolgte mittels diskontinuierlichen SDS-Page nach LAEMMLI (1970). Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proteinproben mit einem Denaturierungspuffer behandelt, um eine Linearisierung der Proteine zu erzielen, damit diese unabhängig von ihrer Sekundär- und Tertiärstruktur aufgetrennt werden konnten. Anschließend wurden die Proteingemische auf ein SDS-Sammelgel mit 4,75% Acrylamid und einem darauffolgenden Trenngel mit 8,5% Acrylamid aufgetragen. Dabei wurde zusätzlich ein Größenmarker (Thermo Scientific PageRuler™ Prestained Protein Ladder) pro Gel hinzugegeben, um bei der Auswertung die Größe der Proteine bestimmen zu können. Die Auftrennung des Proteingemisches erfolgte durch Elektrophorese in einem abgeschlossenen System unter Verwendung von Elektrophoresepufferlösungen (siehe Anhang), wobei zuerst für 30 min eine Spannung von 60 V angelegt wurde, um die Proteine im Sammelgel zu sammeln. Anschließend wurde eine Spannung von 120 V für 90 min eingestellt, um die Proteine aufzutrennen.

3.4.4.2 Blotting

Für die Übertragung der Proteine von dem Gel auf die Nitrocellulosemembran (GE Healthcare Amersham Hybond-ECL) wurde das Gel in einer speziellen Kassette direkt auf die Membran gelegt und durch Blottingpapier und Kokosplatten geschützt. Diese Kassette wurde mit eiskaltem Blottingpuffer (siehe Anhang) gefüllt und durch Anlegen eines elektrischen Feldes (100 V für 1,5 h) wurden Proteine auf die Membran transferiert.

Um die gelungene Übertragung der Proteine auf die Membran zu überprüfen, wurde diese aus der Kassette entnommen und für 5 min mit Ponceau Rot-Lösung auf einem Schwenker

3. Material und Methoden

inkubiert. Ein gleichmäßiges Bandenmuster konnte nach erfolgreicher Übertragung gesehen werden.

3.4.4.3 Gelfärbung und Vorarbeiten für die Massenspektrometrie

Für die Durchführung einer massenspektrometischen Untersuchung zur Überprüfung und Identifizierung der Proteinsequenz des equinen TRPV6 wurde ebenfalls ein Western Blot durchgeführt mit Ausnahme der Proteinübertragung auf eine Membran. Dabei wurden 25 µg der Proteinprobe von Pferd 07 und Pferd 09 (jeweils Duodenum und proximales Jejunum) 30 min bei 10 000 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das entstandene Pellet mit 10 µl 1-2fach Hannover Puffer (5% DTT und 1% Proteaseinhibitor) sowie 1 µl Acrylamid versetzt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Gel wurde anschließend über Nacht auf einem Schüttler in einer Coomassie-Färbelösung gefärbt um die Proteinbanden identifizieren zu können. Für eine verbesserte Identifikation und klarere Bandengebung wurde das Gel Stück für Stück bis zur gewünschten Bandenstärke anhand einer Färbelösung entfärbt. Anschließend wurde das Gel mit dem *Gel Imager* (ChemiDoc™ BioRad, München) fotografiert, der gewünschte Bereich für die Sequenzierung ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Probengefäß mit A. dest. überführt und zur Analyse weggeschickt.

3.4.4.4 Blockierung

Vor der Detektion der Zielproteine mittels spezifischer Antikörper wurden unspezifische Proteinbindestellen auf der Membran blockiert. Dies erfolgte durch Inkubation der Membran in *Phosphate Buffered Saline with Tween* (PBST) mit Magermilchpulver in verschiedenen Konzentrationen über Nacht bei 4 °C.

3.4.4.5 Immundetektion von Proteinen

Die Immundetektion der Zielproteine erfolgte im Anschluss an die Blockierung. Die für die jeweilige Detektion notwendigen Proteinmengen, Aufbereitungsschritte, Konzentrationen und Inkubationszeiten der verwendeten primären und sekundären Antikörper sind in Tabelle 8 und 9 beschrieben. Im Allgemeinen erfolgte nach der Blockierung zunächst ein Waschschriff, bei der das Magermilchpulver mit PBST abgespült wurde. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem spezifischen Primärantikörper, gefolgt von mehreren Waschschriffen mit PBST, um

3. Material und Methoden

ungebundenen Antikörper von der Membran zu entfernen. Nach Inkubation mit dem Sekundärantikörper, der mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP = Horseradish Peroxidase) gekoppelt ist, erfolgte ein weiterer Waschschrift mit PBST. Zur Vorbereitung auf die Immundetektion wurde die Membran mit PBS und *A. dest.* gespült. Um die Proteinbanden zu detektieren wurde die Membran getrocknet und anschließend 5 min mit dem Substrat der Meerrettichperoxidase SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrat (Thermo Scientific, USA) inkubiert. Mit dem *Gel Imager* (ChemiDoc™ BioRad, München) wurden die entstandenen Banden detektiert. Die Auswertung der Proteinbanden erfolgte mit der Quantifizierungssoftware ImageLab (Bio-Rad Laboratories, München), die die optische Dichte als Produkt der Fläche unter der Kurve (mm²) und der Pixeldichte in Form einer dimensionslosen Größe angibt.

Tabelle 8: Western Blot Analyse von PMCA und CaBPD_{9k}, RT = Raumtemperatur, β-ME = β-Mercaptoethanol, DTT = Dithiothreitol

	PMCA (5F10 Santa Cruz)	CaBPD _{9k} (Cb ₉ Swant)
Proteinmenge [µg]	20 Gesamtmembran-Präparation	10 Cytosol-Präparation
Proben-Bearbeitung	Zentrifugation 5 min, 10000 g Pellet versetzen mit 8 µl 1-2fach Denaturierungspuffer („Hannover“) + 10% DTT	Zelllysate mit 2fach Lämmli+ 2% β-ME mischen Hitzenaturierung 5min, 95°C
Elektrophorese	SDS-PAGE 8,5% 60 V, 120 V,	Tricine-SDS-PAGE 16% 60 V, 150 V
Blotting	Nitrocellulosemembran, 100 V, 90 min	
Blockierung	ü.N. bei 4°C in 5% Milch-PBST, abspülen PBS	1h, 10% Milch-PBST, abspülen PBST
Primär Antikörper	Maus Antikörper (5F10) von Santa Cruz 1:400 1% Milch-PBST Inkubation 2h bei RT	Kaninchen Antikörper von Swant 1:2500 in 5% PBST-Milch Inkubation 1h bei RT
Waschen	4x 10 min PBST	
Sekundär Antikörper	HRP-anti Maus (SIGMA A2304) 1:10000, 2% Milch-PBST Inkubation 1h bei RT	HRP-anti Kaninchen (SIGMA 9169) 1:20000, 5% Milch-PBST Inkubation 1h bei RT
Waschen	4x 10 min PBST	

3. Material und Methoden

Tabelle 9: Western Blot Analyse von TRPV6, RT = Raumtemperatur

TRPV6 (ACC-036 Alomone labs)	
Proteinmenge [µg]	25 apikale Membran-Präparation
Proben-Bearbeitung	Zentrifugation 5min, 10000 g Pellet versetzen mit 8 µl 1-2fach Denaturierungspuffer („Hannover“) + 5% DTT+ 1% Proteaseinhibitor Inkubation 15 min bei RT
Elektrophorese	SDS-PAGE 8,5% 60 V, 120 V
Blotting	Nitrocellulosemembran, 100 V
Blockierung	ü.N. bei 4°C in 5% Milch-PBST, abspülen mit PBST
Primär Antikörper	Kaninchen Antikörper (ACC-036) von Alomone 1:600 PBST Inkubation 3h bei RT
Waschen	4x 10min PBST
Sekundär Antikörper	HRP-anti rabbit (SIGMA 9169) 1:10000, 2% PBST-Milch Inkubation 1h bei RT
Waschen	4x 10min PBST

3.4.4.6 Normalisierung der Proteine

Die Stärke des chemilumineszierenden Signals und damit die detektierbare Proteinmenge hängen von zahlreichen Faktoren, wie eingesetzter Proteinmenge und deren Integrität, ab. Um eine Vergleichbarkeit der Werte zu ermöglichen, ist deshalb eine Normalisierung notwendig. Herkömmlich werden hierfür *Houskeeping-Gene* verwendet. Ein weiteres Verfahren ist die Normalisierung auf das aufgetragene Gesamtprotein. Dies kann, unter Verwendung von verschiedenen Farbstoffen wie zum Beispiel Indian Ink oder Ponceau-Rot, geschehen. Bei Ponceau-Rot wird die Membran direkt nach dem Blotten für 5 min in eine Gebrauchslösung überführt und inkubiert. Danach werden die Banden mit dem *Gel Imager* (ChemiDoc™ BioRad) ausgewertet. Nach dem Auswaschen der Farbe mit PBST steht die Membran für die Antikörperdetektion zur Verfügung.

3. Material und Methoden

Die Färbung mit „Indian Ink“ ist nicht reversibel und kann daher erst nach der Detektion erfolgen.

3.5 Immunhistochemie

Die immunhistologischen Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit und mit freundlicher Unterstützung durch die Arbeitsgruppe Funktionelle Histologie und Zellbiologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Ralph Brehm des Anatomischen Instituts der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover durchgeführt.

Unmittelbar nach Entnahme der Gewebeproben aus dem Tier wurden die zu untersuchenden Darmabschnitte in Bouin-Lösung (gesättigte wässrige Pikrinsäure, Formalin und Eisessig) fixiert. Dieses Fixativ dringt schnell in das Gewebe ein und fixiert auf Grund von Quervernetzungen durch Hydroxymethylenbrücken und Reaktion mit basischen Aminosäuren. Anschließend wurden die Proben in kleine Paraffinblöcke gegossen, ausgehärtet und danach mit einem Schlittenmikrotom (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH Mikroskopie und Histologie, Wetzlar) in Dünnschnitte von 4-6 µm geschnitten. Diese Schritte wurden freundlicherweise von Marion Langeheine aus dem Anatomischen Institut der Tierärztlichen Hochschule übernommen. Die Schnitte wurden in einen Wärmeschrank bei 60 °C gestellt, um das Paraffin zu entfernen. Anschließend wurden sie zum vollständigen Entparaffinieren und zum Rehydrieren in eine absteigende Alkoholreihe überführt (2 x 10 min in Xylol, 2 x 2 min in 99,9%igem Ethanol, 30 min in 80%igem Ethanol versetzt mit 30%igem H₂O₂ zur Blockierung der endogenen Peroxidase, 3 min in 70%igem Ethanol). Zur thermischen Antigen-Demaskierung erfolgte eine 20 min Vorbehandlung in heißer Citratpufferlösung (96-99°C, pH 6). Nach dem Abkühlen auf 60 °C erfolgten Waschschrte mit *Tris-buffered saline with Tween20* (TBS-T).

Für das 20-minütige Blockieren wurde NGS (*normal goat serum*) in einer Verdünnung von 1:5 verwendet. Der Antikörper gegen PMCA (ALX-804-049, Enzo®) wurde 1:10 000 mit PBS + 1% BSA (Bovines Serumalbumin) verdünnt, auf den Schnitt aufgebracht und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Anschließend wurden die Schnitte mit PBS gewaschen. Ein sekundärer Antikörper von EnVision (Dako Deutschland GmbH, Hamburg) anti Maus HRP (*Horseradish Peroxidase*),

3. Material und Methoden

wurde auf die Schnitte aufgetragen und nach 30 min mit PBS abgewaschen. Die Färbereaktion erfolgte durch Diaminobenzidin (DAB) (Dako Deutschland GmbH, Hamburg) welches von der HRP oxidiert wird und ein unlösliches, braunes Präzipitat bildet, gefolgt von einem Waschschrift mit PBS und einer Kernfärbung nach Delafield (Hämalaun, pH 3-4). Hämalaun bindet an das Substrat durch Chelatbildung an mehrwertigen Kationen mit anionischen Strukturen und färbt somit alle sauren Strukturen, wie zum Beispiel den Zellkern oder die Ribosomen. Durch eine Erhöhung des pH-Wertes (Waschen für mindestens 10 min unter fließendem Leitungswasser bei pH 6,8-7,0) erscheint die blaviolette Färbung.

Die Schnitte wurden durch eine aufsteigende Alkoholreihe (Eintauchen für je 2 Minuten in 70%, 80% und absoluten Ethanol sowie Isopropanol, zwei Mal für 5 min in Xylol) dehydriert und fixiert, was sie für weitere Untersuchungen unempfindlich machte, und mit EUKITT® (ORSAtec GmbH, Bobingen) eingedeckt.

Die mikroskopischen Auswertungen wurden mit einem Zeiss Axioskop (Carl Zeiss, Oberkochen) und einer DP70 Digital Kamera (Olympus, Hamburg) durchgeführt.

3.6 Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten sowie die Darstellung der Ergebnisse in den einzelnen Diagrammen erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms GraphPad Prism® Version 6 (GraphPad Software, San Diego, USA). Dabei kennzeichnete N die Anzahl der Pferde. Zunächst erfolgte, wenn möglich, mittels Kolmogorov-Smirnov Test eine Überprüfung der Werte auf Normalverteilung. Die funktionellen Daten (I_{sc} , G_t , unidirektionale Fluxraten) wurden mittels One Sample t-test daraufhin überprüft, ob sie sich von dem hypothetischen Wert Null unterschieden. Durch diesen Test kann gezeigt werden, dass ein chemischer Gradient, entstanden durch die Zusammensetzung der mucosalen und serosalen Puffersysteme, als Triebkraft ausgeschlossen werden kann. Der Vergleich der G_t und des I_{sc} vor und nach Zugabe verschiedener Substanzen erfolgte mit einem gepaarten T-Test nach Student. Hierbei wurden Kammern, die keine Reaktion auf den Vitalitätstest lieferten, aus der Auswertung genommen. Unterschiede in den Fluxraten entlang der Darmachse und die Expression der Transportproteine der verschiedenen intestinalen Segmente wurden mit der einfaktoriellen Varianzanalyse (One-way ANOVA) verglichen.

3. Material und Methoden

Ein möglicher linearer Zusammenhang zwischen den unidirektionalen Ca^{2+} - bzw. P_i -Fluxraten und den Mannit-Fluxraten wurde durch Berechnung des Pearson-Korrelationskoeffizienten überprüft.

Die Effekte der Faktoren „Inhibitor“ und „Zeit“ auf die Fluxraten wurden mit der zweifaktoriellen Varianzanalyse (Two-way-ANOVA) untersucht und nach Sidak korrigiert.

Die Ergebnisse der PCR Auswertung wurden mit dem arithmetischen Mittel (\bar{x}) und entsprechenden Standardfehlern (SEM) angegeben. Eine Normalisierung wurde anhand von Tukey's durchgeführt. Die Ergebnisse der Western Blot Analyse wurden ebenfalls mit dem arithmetischen Mittel (\bar{x}) und entsprechenden Standardfehlern (SEM) angegeben. Eine Normalisierung wurde anhand von Tukey's durchgeführt.

Für die Signifikanzangaben gilt:

n.s. nicht signifikant,

$P < 0,05$ * schwach signifikant,

$P < 0,01$ ** signifikant,

$P < 0,001$ *** hoch signifikant.

4. Ergebnisse

4.1 Bestimmung der Blutparameter

Die Entnahme der Blutproben erfolgte unmittelbar vor Euthanasie der Tiere. Aufgrund fehlerhafter Probenentnahme oder -verarbeitung konnten einzelne Blutparameter hauptsächlich bei Pferden V04 nicht korrekt bestimmt werden. Infolge werden die Werte als Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) angegeben. Die Ca^{2+} -Konzentration im Vollblut des ionisierten Ca^{2+} lag bei $1,47 \pm 0,12$ mmol/l, die Plasmakonzentrationen von Ca_t lag bei $3,012 \pm 0,08$ mmol/l und von P_i bei $1,02 \pm 0,13$ mmol/l. Die 25-OHD₃ Konzentration lag bei $10,35 \pm 3,60$ nmol/l. Bei der Bestimmung der Calcitriol-Konzentration lag der Wert bei Pferd V04 unter der Nachweisgrenze. Das Pferd V10 wies einen Wert von >200 pg/ml auf, bei allen übrigen Tieren wurde eine 1,25-(OH)₂D₃-Konzentration von $7,51 \pm 1,63$ pg/ml gemessen. Die Blutparameter der einzelnen Pferde sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Blutparameter Ca^{2+} , Ca_t , P_i , Calcitriol (1,25-(OH)₂D₃) und Calcidiol (25-OHD₃), MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, - =keine Bestimmung möglich

Pferd Nr.	Alter in Jahren	Ca^{2+} [mmol/l]	Ca_t [mmol/l]	P_i [mmol/l]	1,25-(OH) ₂ D ₃ [pg/ml]	25-OHD ₃ [nmol/l]
V01	11	1,42	3,13	1,05	7,4	11,9
V02	3	1,51	3,11	1,10	9,4	17
V03	5	1,53	3,12	0,87	9,3	8,8
V04	5	-	-	0,93	<NWG	14,1
V05	21	1,51	3,02	0,90	7,7	-
V06	19	1,47	2,9	0,87	9,9	-
V07	12	1,48	2,99	0,97	7,3	8,8
V08	20	1,41	2,96	1,16	6,6	4,4
V09	11	1,38	2,95	1,11	5,3	9,6
V10	18	1,23	3,01	1,12	>200	7,2
V11	23	1,51	2,95	1,26	5,2	9,3
V12	24	1,72	2,99	0,90	7,0	12,4
MW \pm SD	14,33 \pm 7,13	1,47 \pm 0,12	3,012 \pm 0,08	1,02 \pm 0,13	7,51 \pm 1,63	10,35 \pm 3,60

4. Ergebnisse

4.2 Elektrophysiologische Basalwerte

Im Rahmen der funktionellen Untersuchungen mittels Ussing-Kammer-Technik wurden die elektrophysiologischen Parameter Kurzschlussstrom (I_{sc}) und Gewebeleitfähigkeit (G_t) kontinuierlich während des gesamten Versuchszeitraums aufgezeichnet. Am Ende der jeweiligen Versuchsphase wurde zur Überprüfung der Gewebevitalität Glukose (Dünndarm) bzw. Forskolin (Dickdarm) hinzugegeben. Typische Zeitverläufe des I_{sc} und der G_t sind in Abbildung 7 dargestellt.

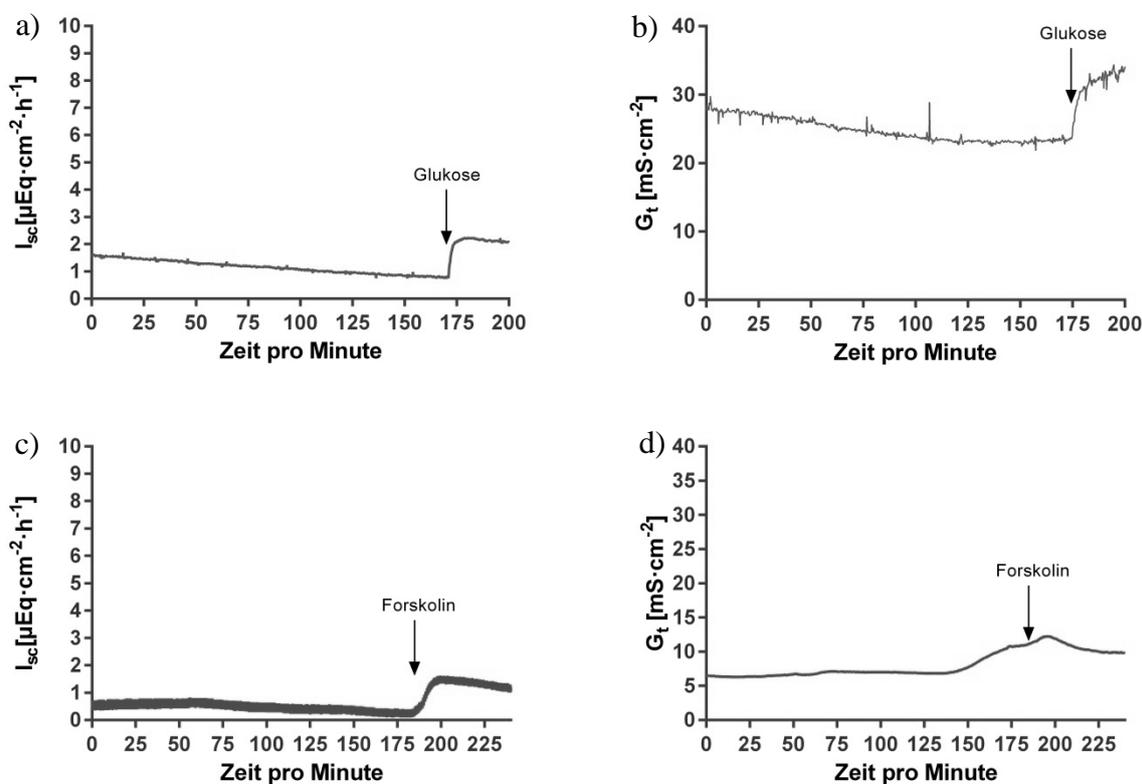


Abbildung 7: Beispielhafter Verlauf des I_{sc} (a/c) und der G_t (b/d) im Duodenum (a/b) des Pferdes V04 und Caecum (c/d) des Pferdes V01 (Zeitkontrolle). Am Ende der Versuchsphase wurde durch Zugabe von Glukose (Dünndarm) bzw. Forskolin (Dickdarm) ein Anstieg im I_{sc} bzw. G_t induziert. Ein Anstieg im I_{sc} nach der Gabe von Glukose bzw. Forskolin kann als Hinweis für eine ausreichende Gewebevitalität gewertet werden.

Sowohl der I_{sc} als auch die G_t der verschiedenen Darmsegmente waren signifikant voneinander verschieden (One-way ANOVA, $p < 0,05$) (Abbildung 8) und werden in Folge mit $\text{MW} \pm$ Standardfehler (SEM) beschrieben.

Der mittlere I_{sc} war im Duodenum mit $1,69 \pm 0,24 \mu\text{Eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ am höchsten, gefolgt vom mittleren I_{sc} im Caecum ($0,64 \pm 0,13 \mu\text{Eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$). Der mittlere I_{sc} im Jejunum lag bei

4. Ergebnisse

$0,23 \pm 0,24 \mu\text{Eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ und der mittlere I_{sc} des Colons bei $0,22 \pm 0,14 \mu\text{Eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ (Abbildung 8a).

Die mittlere G_{t} war im Duodenum am höchsten ($30,12 \pm 2,63 \text{mS}\cdot\text{cm}^{-2}$), gefolgt von der mittleren G_{t} im Jejunum ($20,31 \pm 0,75 \text{mS}\cdot\text{cm}^{-2}$), im rechtem dorsalen Colon ($11,73 \pm 0,93 \text{mS}\cdot\text{cm}^{-2}$) und im Caecum ($6,64 \pm 0,61 \text{mS}\cdot\text{cm}^{-2}$).

Der ΔI_{sc} , d.h. die Differenz zwischen dem maximalen I_{sc} Anstieg nach Zugabe und dem basalen I_{sc} vor Zugabe, betrug nach Glukose-Zugabe im Duodenum $1,15 \pm 0,15 \mu\text{Eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ und im Jejunum $1,07 \pm 0,3 \mu\text{Eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$. Der ΔI_{sc} nach Zugabe von Forskolin betrug im Caecum $0,83 \pm 0,07 \text{mS}\cdot\text{cm}^{-2}$ und im Colon $0,69 \pm 0,09 \text{mS}\cdot\text{cm}^{-2}$. Die ΔI_{sc} sowohl nach Glucose-Zugabe als auch nach Forskolin-Zugabe waren signifikant vom hypothetischen Wert Null verschieden.

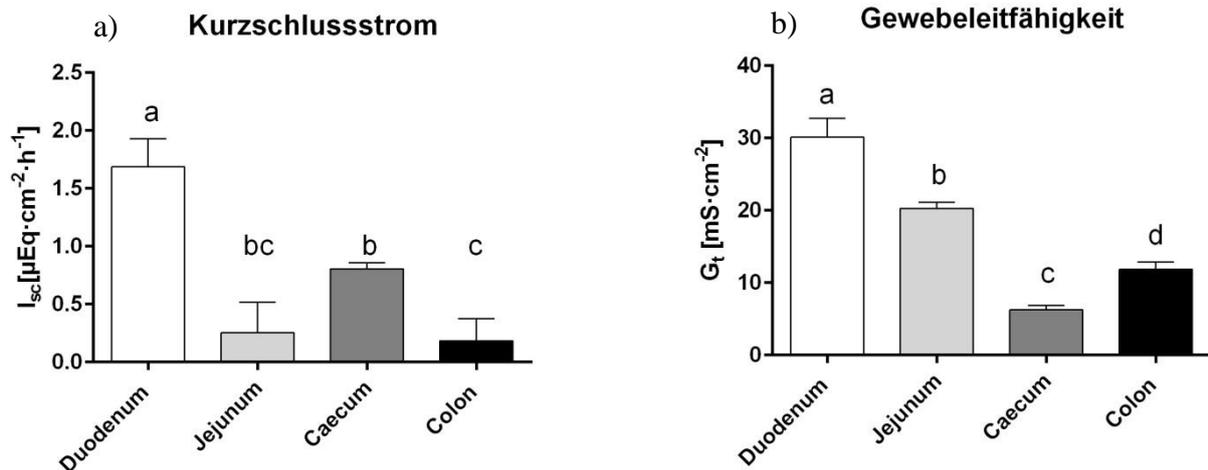


Abbildung 8: a) Darstellung des basalen I_{sc} entlang der Darmachse $\text{MW} \pm \text{SEM}$, Duodenum $N=9$, Jejunum $N=10$, Caecum und Colon $N=12$, one-way ANOVA; a, b, c und d sind signifikant voneinander verschieden, $P<0,05$

b) Darstellung der basalen Gewebeleitfähigkeit entlang der Darmachse $\text{MW} \pm \text{SEM}$; Duodenum $N=9$, Jejunum $N=10$, Caecum und Colon $N=12$, one-way ANOVA; ungleiche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Segmenten

Die I_{sc} und G_{t} der verschiedenen Darmsegmente waren signifikant voneinander verschieden (One-way ANOVA, $p<0,05$).

Der mittlere I_{sc} war im Duodenum mit $1,69 \pm 0,24 \mu\text{Eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ am höchsten, gefolgt vom mittleren I_{sc} im Caecum ($0,64 \pm 0,13 \mu\text{Eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$). Der mittlere I_{sc} im Jejunum lag bei $0,23 \pm 0,24 \mu\text{Eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ und der mittlere I_{sc} des Colons bei $0,22 \pm 0,14 \mu\text{Eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ (Abbildung 8a).

4. Ergebnisse

Die mittlere G_t war im Duodenum am höchsten ($30,12 \pm 2,63 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-2}$), gefolgt von der mittleren G_t und im Caecum ($6,64 \pm 0,61 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-2}$), im Jejunum ($20,31 \pm 0,75 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-2}$) und rechtem dorsalen Colon ($11,73 \pm 0,93 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-2}$).

4.3 Funktionelle und molekularbiologische Untersuchungen zum intestinalen Ca^{2+} - und Pi-Transport

4.3.1 Funktionelle Untersuchungen zum Ca^{2+} -Transport

4.3.1.1 Basale Fluxraten von Ca^{2+} entlang der Darmachse

Die basalen unidirektionalen und Nettofluxraten von Ca^{2+} sind in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Basale unidirektionale Ca^{2+} -Fluxraten von mukosal nach serosal (J_{ms}) und von serosal nach mukosal (J_{sm}) entlang der Darmachse, MW \pm SEM, N = 9

	$J_{ms} [\text{nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}]$	$J_{sm} [\text{nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}]$
Duodenum	$254,6 \pm 49,20$	$21,02 \pm 1,21$
mittleres Jejunum	$58,69 \pm 13,96$	$23,15 \pm 0,73$
Caecum	$17,98 \pm 1,86$	$10,92 \pm 1,14$
rechtes dorsales Colon	$19,60 \pm 2,70$	$16,20 \pm 1,60$

Im Duodenum betragen die basalen Nettofluxraten $233,5 \pm 49,1 \text{ nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$, im Jejunum $61,22 \pm 26,17 \text{ nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$, im Caecum $7,05 \pm 2,12 \text{ nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ und im Colon $5,3 \pm 2,8 \text{ nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$. Die Nettofluxraten von Ca^{2+} der verschiedenen Darmsegmente waren signifikant voneinander verschieden (One-way ANOVA, $p < 0.05$) (Abbildung 9).

4. Ergebnisse

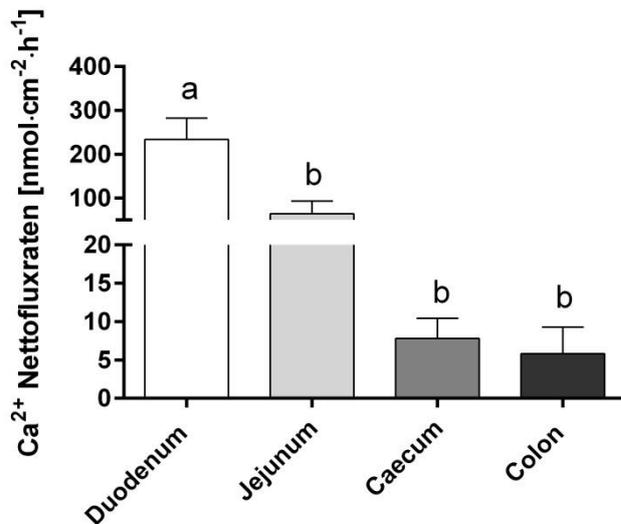


Abbildung 9: Basale Nettofluxraten von Ca²⁺ entlang der Darmachse. N=9, MW ± SEM, One-way ANOVA, p<0,05, ungleiche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Darmsegmenten

4.3.1.2 Differenzierung zwischen para- und transzellulärem Ca²⁺-Transport

Die unidirektionalen Fluxraten von Ca²⁺ und Mannit wurden simultan in Abwesenheit eines elektrochemischen Gradienten bestimmt. Durch Korrelation der Ca²⁺-Fluxraten mit den entsprechenden Mannit-Fluxraten wurde überprüft, ob Ca²⁺ vorwiegend parazellulär oder transzellulär transportiert wurde.

Für die J_{sm}-Fluxraten aller Darmsegmente bestand ein linearer Zusammenhang zwischen den Ca²⁺- und Mannit-Fluxraten. Im rechten dorsalen Colon konnte auch bei den J_{ms}-Fluxraten ein linearer Zusammenhang festgestellt werden. Für J_{ms}-Fluxraten von Ca²⁺ und Mannit in beiden Dünndarmabschnitten und im Caecum dagegen bestand keine Korrelation (Abbildung 10 und Tabelle 12).

4. Ergebnisse

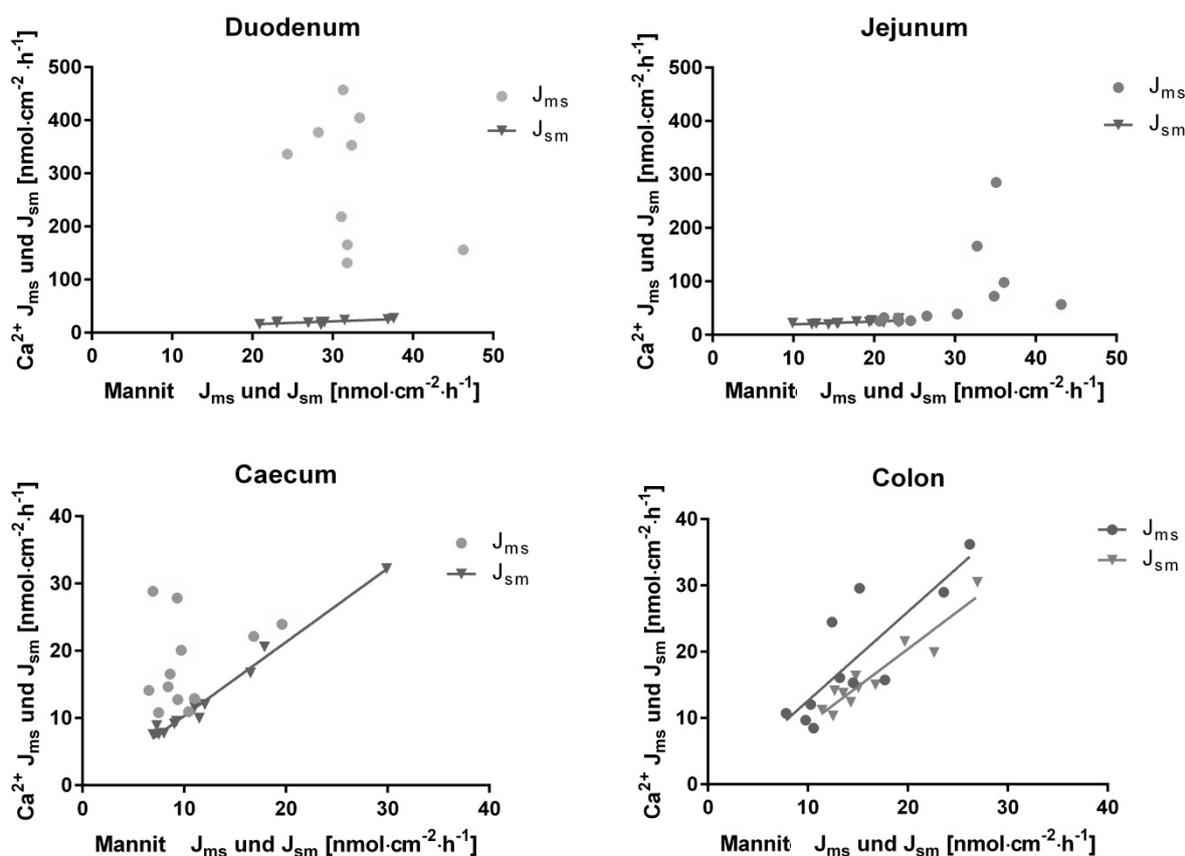


Abbildung 10: Unidirektionale Ca^{2+} -Fluxraten von mukosal nach serosal (J_{ms}) und von serosal nach mukosal (J_{sm}) in Abhängigkeit von den entsprechenden Mannit-Fluxraten, Duodenum N=9, Jejunum N=10, Caecum und Colon N=12

Tabelle 12: Korrelationen zwischen den unidirektionalen Ca^{2+} -Fluxraten von mukosal nach serosal (J_{ms}) und von serosal nach mukosal (J_{sm}) und den dazugehörigen unidirektionalen Mannit-Fluxraten im Duodenum, Jejunum, Caecum und rechten dorsalen Colon

	Korrelationskoeffizient nach Pearson r^2		Signifikanzwert p		Lineare Regression
	J_{ms}	J_{sm}	J_{ms}	J_{sm}	
Duodenum	-0,42	0,80	n.s.	<0,01	$\text{Ca}^{2+} J_{sm}: Y = (0,54 \pm 0,14) \cdot X + (5,01 \pm 4,13)$
Jejunum	0,5	0,72	n.s.	<0,01	$\text{Ca}^{2+} J_{sm}: Y = (0,53 \pm 0,16) \cdot X + (14,26 \pm 2,83)$
Caecum	0,28	0,99	n.s.	<0,001	$\text{Ca}^{2+} J_{sm}: Y = (1,10 \pm 0,05) \cdot X - (0,62 \pm 0,63)$
Colon	0,83	0,95	<0,01	<0,001	$\text{Ca}^{2+} J_{ms}: Y = (1,34 \pm 0,30) \cdot X - (0,83 \pm 4,76)$ $\text{Ca}^{2+} J_{sm}: Y = (1,14 \pm 0,13) \cdot X - (2,28 \pm 2,21)$

4.3.1.2.1 Effekt von 2,4,6-Triaminopyrimidin (TAP) auf den Ca^{2+} -Transport

Die unidirektionalen Ca^{2+} -Fluxraten vor und nach Zugabe von TAP in den verschiedenen Darmsegmenten sind in den Abbildungen 11 und 12 dargestellt. Die statistischen Auswertungen der unidirektionalen Fluxraten im Duodenum ergaben weder im Dünndarm noch

4. Ergebnisse

im Dickdarm signifikante Unterschiede vor und nach Zugabe von TAP. Auch die leichte, kontinuierliche Abnahme der J_{ms} Fluxraten nach TAP-Zugabe im Duodenum, die in der Zeitkontrolle nicht beobachtet wurde, konnte statistisch nicht abgesichert werden.

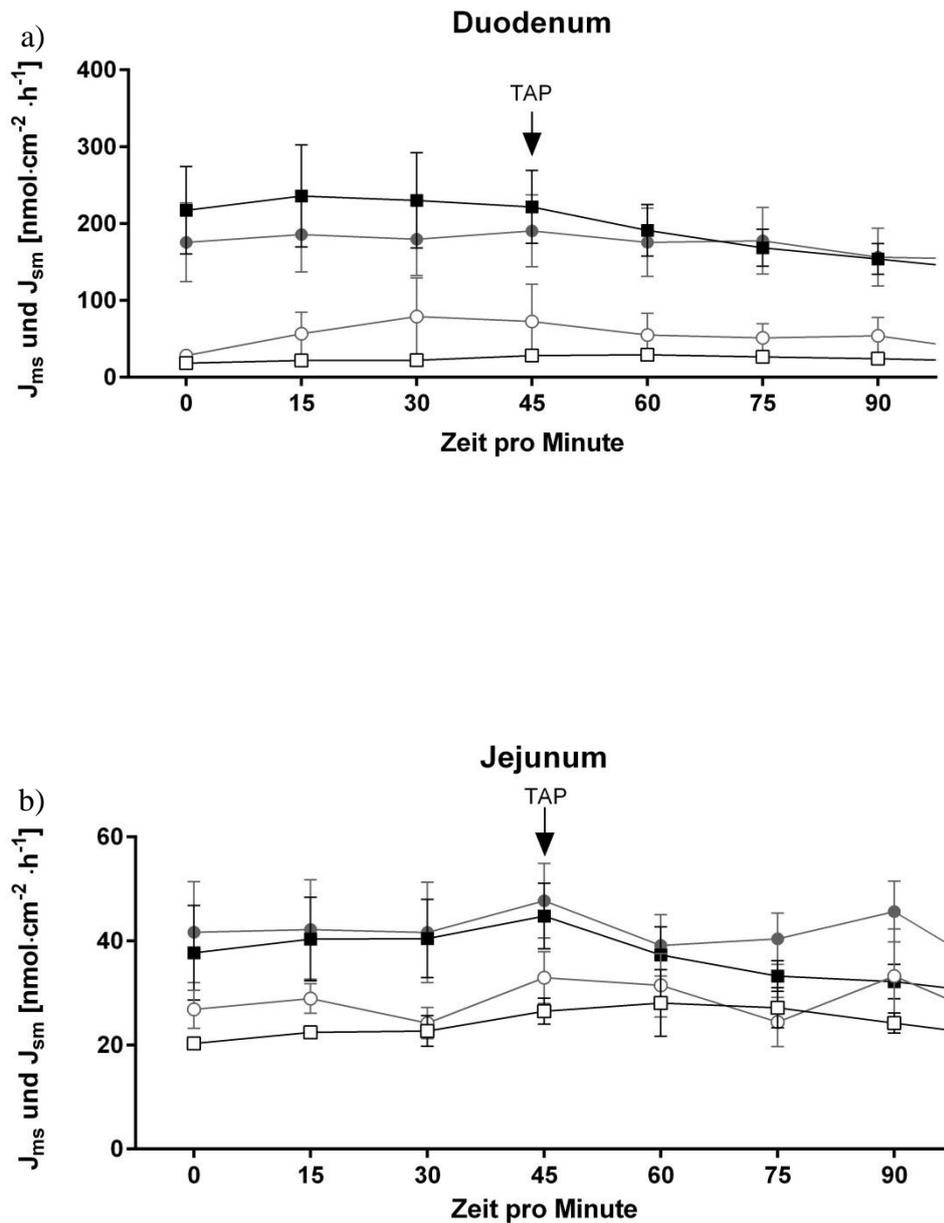


Abbildung 11: Zeitlicher Verlauf der unidirektionalen Ca^{2+} -Fluxraten von mukosal nach serosal (J_{ms}) (■) und von serosal nach mukosal (J_{sm}) (□) im Duodenum (a) und im Jejunum (b) vor und nach der Zugabe von TAP im Vergleich zur Zeitkontrolle (Ca^{2+} J_{ms} ● und Ca^{2+} J_{sm} ○), bei der kein TAP zugegeben wurde. Two-way ANOVA, Multiple comparisons nach Sidak, $*=P<0,05$.

4. Ergebnisse

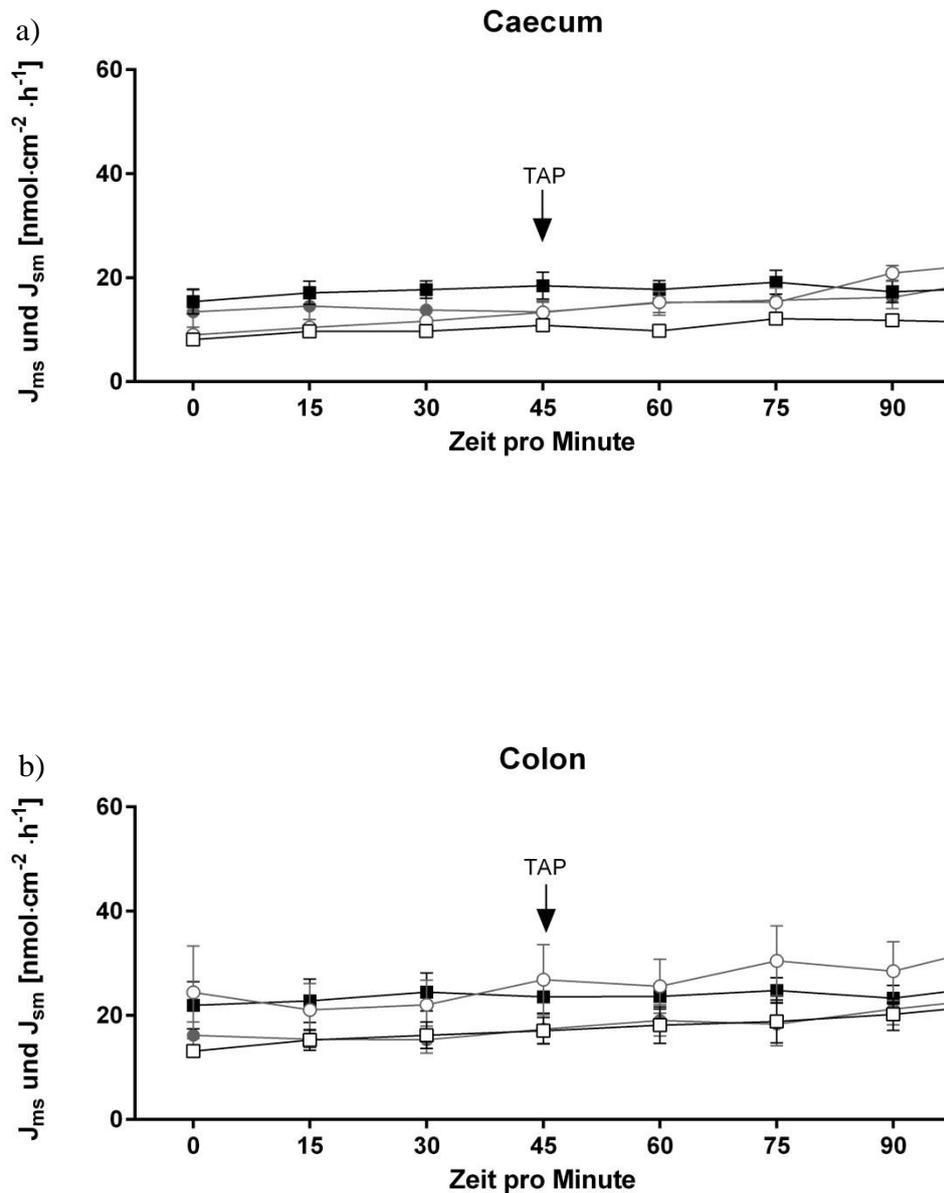


Abbildung 12: Zeitlicher Verlauf der unidirektionalen Ca^{2+} -Fluxraten von mukosal nach serosal (J_{ms}) (■) und von serosal nach mukosal (J_{sm}) (□) im Caecum (a) und im Colon (b) vor und nach der Zugabe von TAP im Vergleich zur Zeitkontrolle (Ca^{2+} J_{ms} ● und Ca^{2+} J_{sm} ○), bei der kein TAP zugegeben wurde. Two-way ANOVA, Multiple comparisons nach Sidak, $*=P<0,05$.

4.3.1.2.2 Effekt von Ruthenium Rot auf den Ca^{2+} -Transport

Die unidirektionalen Ca^{2+} -Fluxraten vor und nach Zugabe von Ruthenium Rot in den verschiedenen Darmsegmenten sind in den Abbildungen 13 und 14 dargestellt. Ruthenium Rot hatte weder im Dünndarm noch im Dickdarm einen Effekt auf die unidirektionalen Ca^{2+} -Fluxraten (Two-way ANOVA, $p<0,05$).

4. Ergebnisse

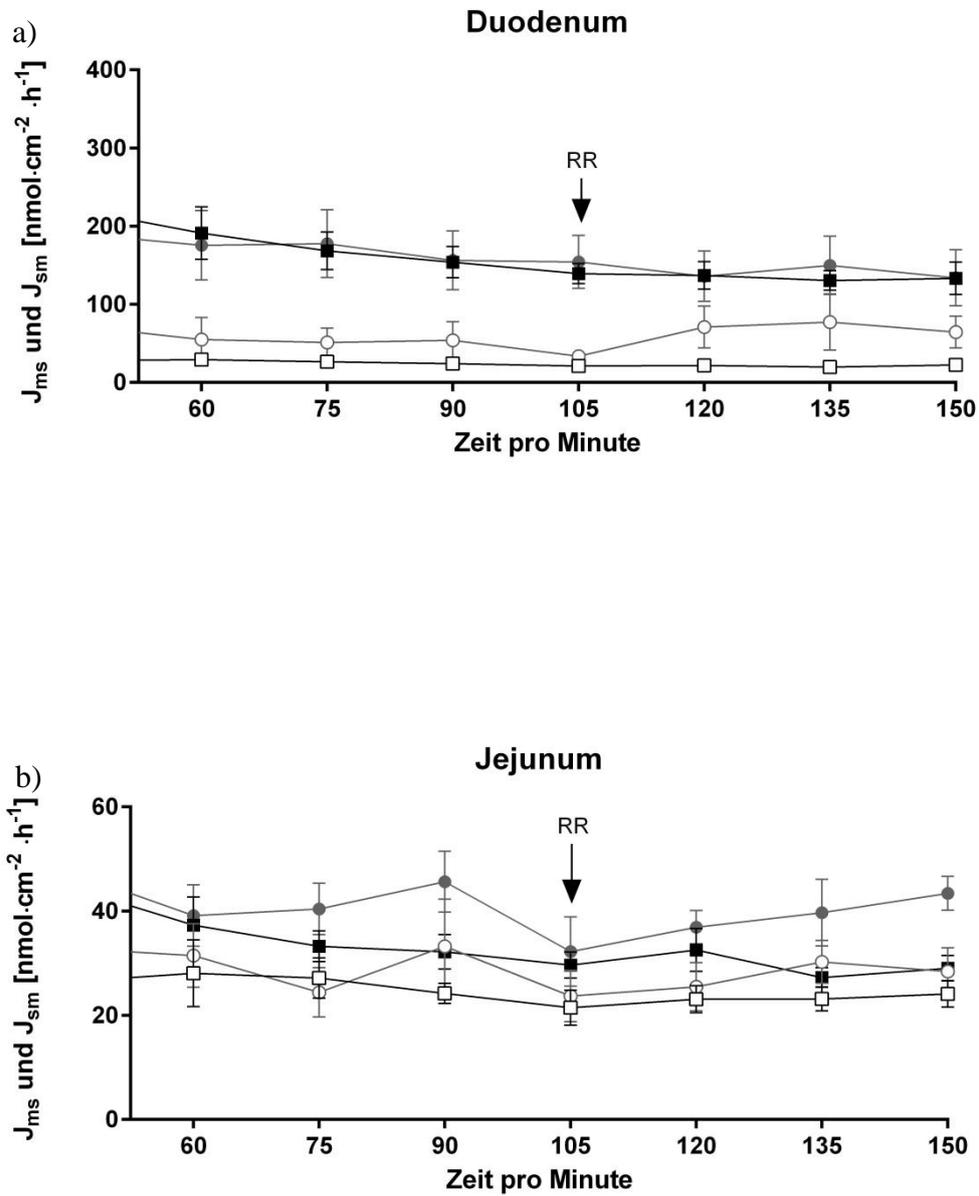


Abbildung 13: Zeitlicher Verlauf der unidirektionale Ca^{2+} -Fluxraten J_{ms} (■) und Ca^{2+} J_{sm} (□) im Duodenum (a) und im Jejunum (b) vor und nach der Zugabe von RR im Vergleich zur Zeitkontrolle (Ca^{2+} J_{ms} ● und Ca^{2+} J_{sm} ○, keine Zugabe von RR) Two-way ANOVA, Multiple comparisons nach Sidak, $*=P<0,05$.

4. Ergebnisse

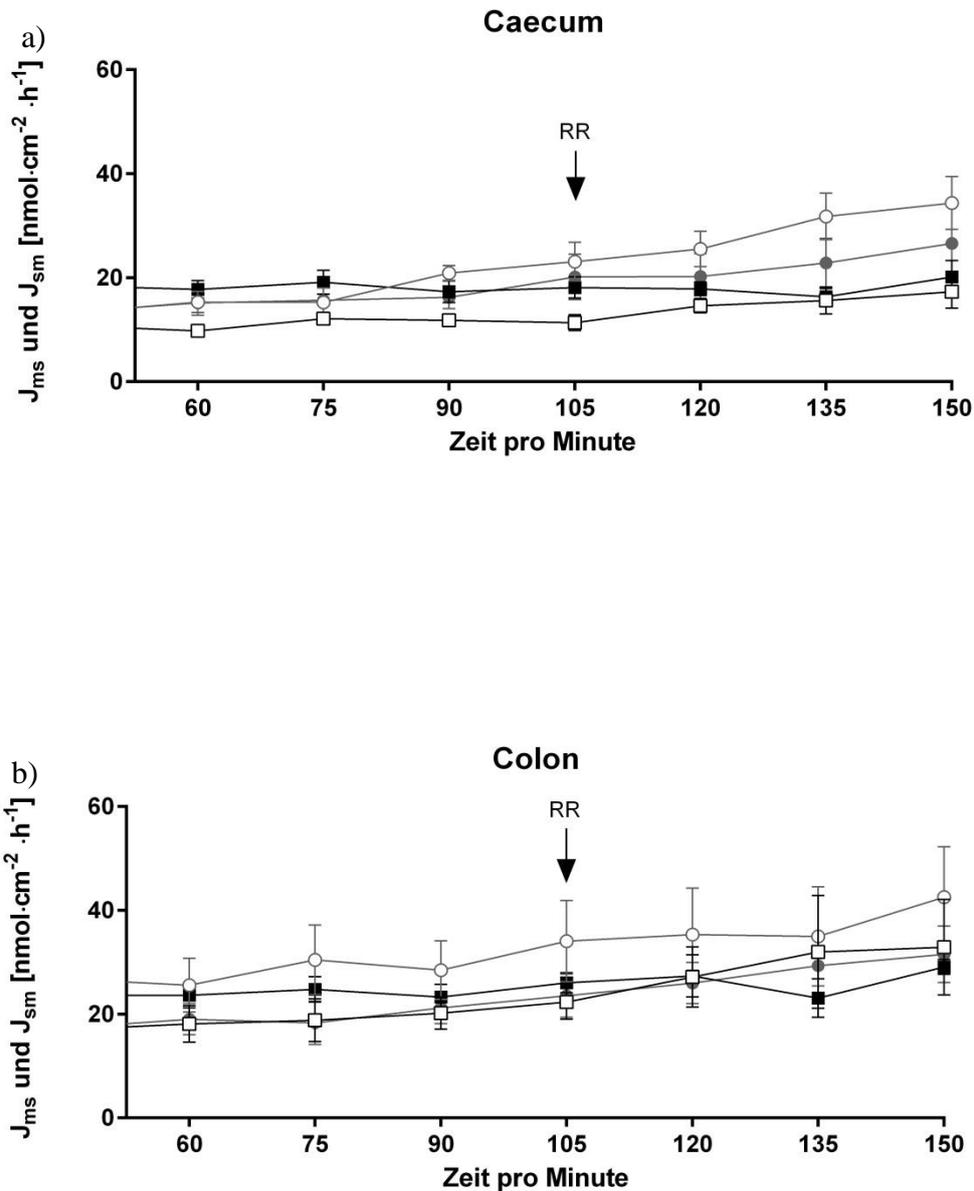


Abbildung 14: Zeitlicher Verlauf der unidirektionale Ca^{2+} -Fluxraten J_{ms} (■) und Ca^{2+} J_{sm} (□) im Duodenum (a) und im Jejunum (b) vor und nach der Zugabe von RR im Vergleich zur Zeitkontrolle (Ca^{2+} J_{ms} ● und Ca^{2+} J_{sm} ○, keine Zugabe von RR) Two-way ANOVA, Multiple comparisons nach Sidak, $*=P<0,05$.

4.3.2 Strukturelle Untersuchungen zum Ca^{2+} -Transport

Im Folgenden wurde mittels qPCR und Western Blot Analyse die Expression der Ca^{2+} -transportierenden Strukturen TRPV6, CaBPD_{9k} und PMCA im equinen Intestinaltrakt untersucht.

4. Ergebnisse

4.3.2.1 TRPV6

4.3.2.1.1 qPCR

Die RNA-Expressionen von TRPV6 entlang der Darmachse sind in Abbildung 15 dargestellt. Die Expression des TRPV6 war im Duodenum am höchsten, gefolgt vom proximalen und distalen Jejunum. In allen Darmsegmenten distal des Jejunums war die RNA-Expression sehr niedrig und unterschied sich signifikant von den RNA-Expressionen der proximalen Darmabschnitte.

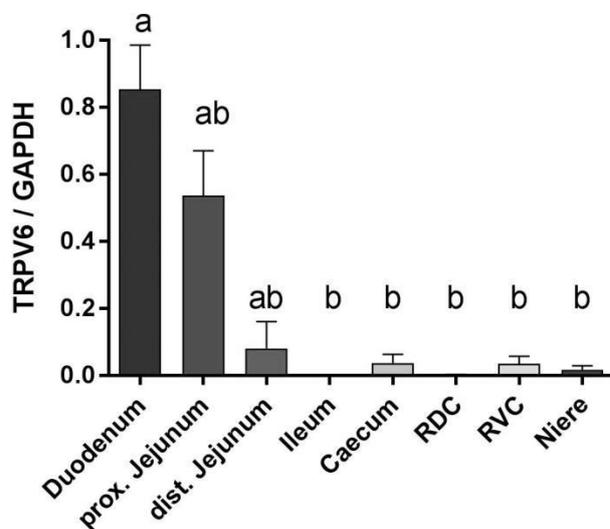


Abbildung 15: RNA-Expression von TRPV6 entlang der Darmachse normiert auf GAPDH, prox. = proximal, dist. = distal, RDC = rechtes dorsales Colon, RVC = rechtes ventrales Colon, MW ± SEM, N=6, One-way ANOVA korrigiert nach Tukey's, ungleiche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Darmsegmenten. Die Niere dient zur Kontrolle.

4.3.2.1.2 Western Blot Analyse

Mit Hilfe des Antikörpers des Herstellers Alomone Labs (Jerusalem) war ein klares Bandenmuster zu detektieren, wobei alle Banden deutlich unter der 72 kDa Markierung verliefen. Unter Berücksichtigung der Proteinsequenz des equinen TRPV6 wäre ein durchschnittliches Molekulargewicht von mindestens 83kDa zu erwarten gewesen.

4. Ergebnisse

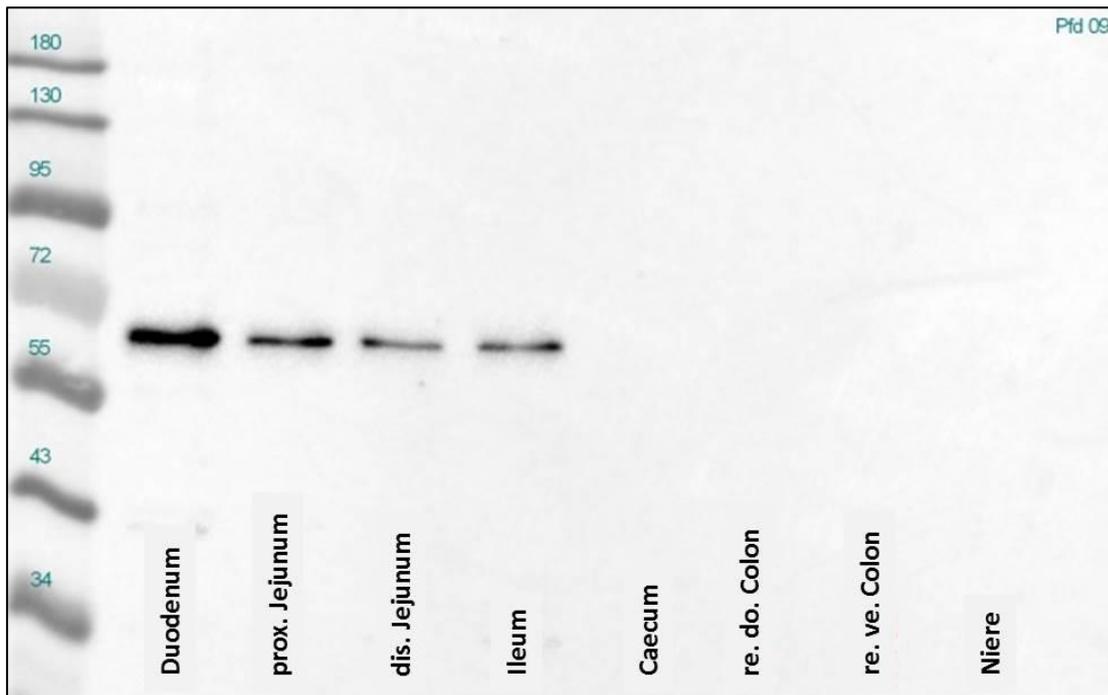


Abbildung 16: Proteinnachweis von TRPV6 entlang der Darmachse (Pferd V09) mit dem primären Antikörper (ACC-036 alomone labs). Die für den TRPV6 erwartete spezifische Bande sollte bei ca. 83 kDa liegen.

Ein densitometrischer Proteinnachweis konnte im Dünndarm (Duodenum, proximale Jejunum, distale Jejunum und Ileum), nicht aber im Dickdarm erbracht werden (Abbildung 16 und 17). Die Normierung auf das Gesamtprotein ergab signifikante Unterschiede zwischen dem Duodenum und dem distalen Jejunum sowie dem Ileum.

4. Ergebnisse

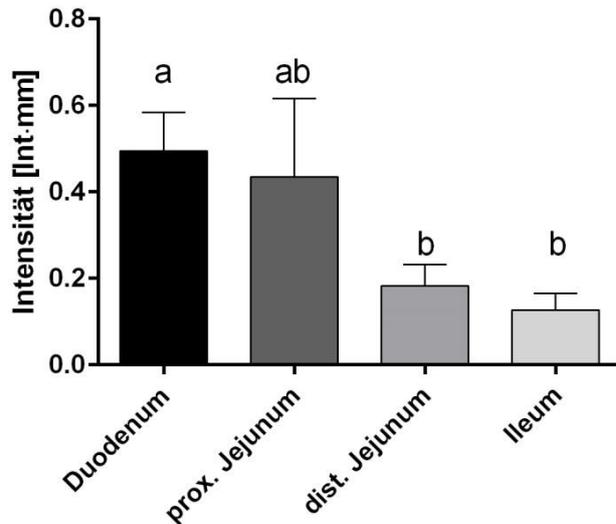


Abbildung 17: Proteinexpression von TRPV6 (ACC-036 Alomone Labs) entlang der Darmachse normiert auf Gesamtprotein, $MW \pm SEM$, $N=6$, One-way ANOVA korrigiert nach Tukey's, ungleiche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Darmsegmenten

Zur Abklärung, ob es sich bei dem detektierten Protein mit einer Größe unter 72 kDa möglicherweise doch um den equinen TRPV6 handelte, wurde die mittels ACC-036 Alomone Labs (Jerusalem) Antikörper identifizierte Bande aus dem Duodenum isoliert und zur Proteinsequenzierung zu Herrn Prof. A. Pich, Institut für Toxikologie der Medizinische Hochschule Hannover als auch zu Proteom Factory AG Berlin gesandt. Die Analyse mittels Massenspektrometrie beider Institute ergab, auch nach wiederholter Anfertigung der Bande mit zusätzlich durchgeführter Aufreinigung des Proteins keine eindeutige Aussage.

4.3.2.2 CaBPD_{9k}

4.3.2.2.1 qPCR

Die RNA-Expressionen von CaBPD_{9k} entlang der Darmachse sind in Abbildung 18 dargestellt.

4. Ergebnisse

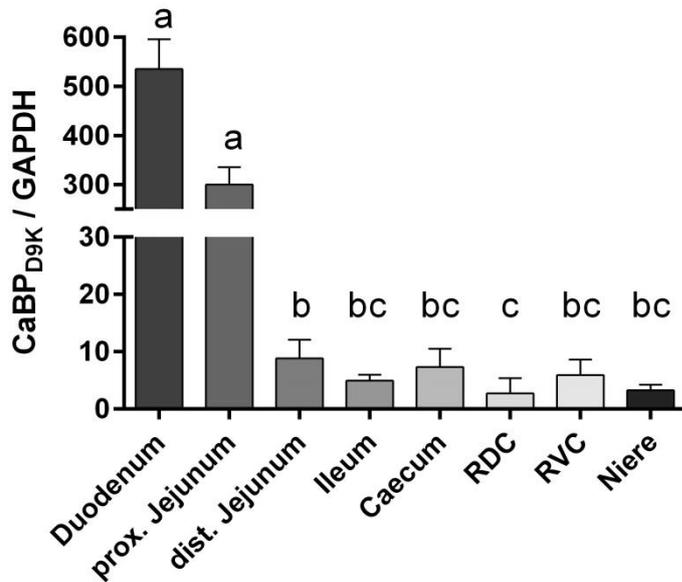


Abbildung 18: RNA-Expression von CaBP_{D9k} entlang der Darmachse normiert auf GAPDH, RDC = rechtes dorsales Colon, RVC = rechtes ventrales Colon, MW ± SEM, N=6, One-way ANOVA korrigiert nach Tukey's, ungleiche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Darmsegmenten. Die Niere dient zur Kontrolle.

Die RNA-Expression von CaBP_{D9k} war im proximalen Dünndarm (Duodenum und proximales Jejunum) signifikant höher als in den weiter aboral lokalisierten Darmsegmenten. Im rechten dorsalen Colon war die RNA-Expression am niedrigsten und unterschied sich signifikant von der im Duodenum, proximalen und distalen Jejunum.

4.3.2.2.2 Western Blot Analyse

Die Proteinexpressionen von CaBP_{D9k} sind in Abbildung 19 dargestellt. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen auf RNA-Ebene, war die höchste Proteinexpression von CaBP_{D9k} im Duodenum und proximalen Jejunum zu detektieren. Sie unterschied sich signifikant von der CaBP_{D9k} Expression aller weiter aboral gelegenen Darmabschnitten. Im rechten dorsalen Colon war die Protein-Expression am niedrigsten und unterschied sich signifikant von der im Duodenum, proximalen und distalen Jejunum.

4. Ergebnisse

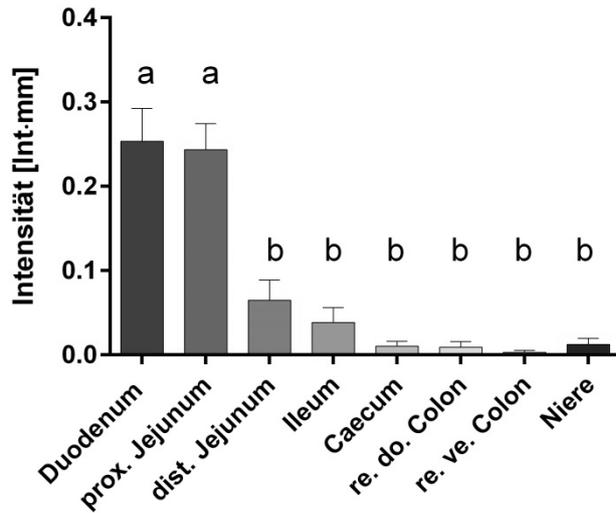


Abbildung 19: Proteinexpressionen von CaBPD_{9k} (CB₉ swant[®]) entlang der Darmachse normiert auf Gesamtprotein, MW ± SEM, N=6, One-way ANOVA korrigiert nach Tukey's, ungleiche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Darmsegmenten. Die Niere dient zur Kontrolle.

4.3.2.3 PMCA

4.3.2.3.1 qPCR

Die RNA-Expressionen von PMCA entlang der Darmachse zeigten signifikante Unterschiede zwischen den Darmsegmenten, wobei die Unterschiede nicht so deutlich ausgeprägt waren wie bei der RNA-Expression von TRPV6 und CaBPD_{9k} (Abbildung 20). Die RNA-Expression im Duodenum war signifikant höher als im Ileum und im rechten dorsalen Colon.

4. Ergebnisse

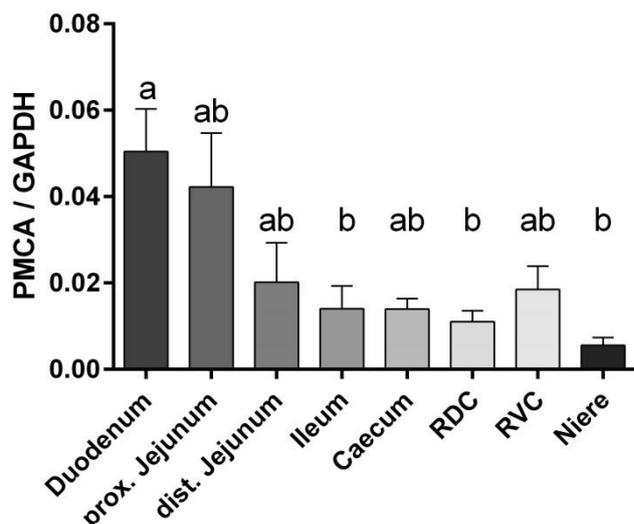


Abbildung 20: RNA-Expression von PMCA entlang der Darmachse normiert auf GAPDH, RDV = rechtes dorsales Colon, RVC = rechtes ventrales Colon, MW \pm SEM, N=6, One-way ANOVA korrigiert nach Tukey's, ungleiche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Segmenten. Die Niere dient zur Kontrolle.

4.3.2.3.2 Western Blot Analyse

Die Proteinexpression von PMCA zeigte, vergleichbar mit der RNA-Expression, signifikante Unterschiede entlang der Darmachse (Abbildung 21). Auch hier schien sich der proximale Dünndarm von den weiter aboral liegenden Darmsegmenten zu unterscheiden. Statistisch ließ sich ein Unterschied zwischen dem Duodenum und dem Ileum bzw. rechten ventralen Colon bzw. zwischen dem proximalen Jejunum und folgenden aboralen Darmsegmenten feststellen.

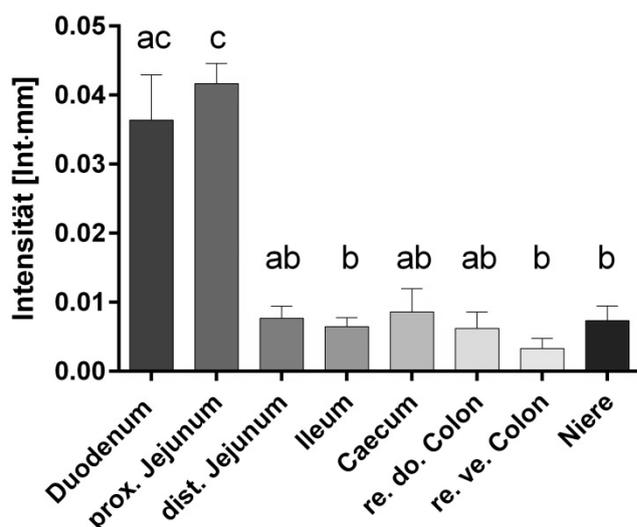


Abbildung 21: Proteinexpression von PMCA (Santa Cruz sc-20018) in Gesamtmembran entlang der Darmachse normiert auf Gesamtprotein, MW \pm SEM, N=6, One-way ANOVA korrigiert nach Tukey's, ungleiche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Segmenten. Die Niere dient zur Kontrolle.

4. Ergebnisse

4.3.2.3.3 Immunhistologie

Der für den Proteinnachweis von PMCA1b mittels Western Blot Analyse verwendete Antikörper wurde ebenfalls für die immunhistologische Darstellung des PMCA1b genutzt. PMCA1b wurde erfolgreich an der basolateralen Membran der Enterozyten dargestellt (Abbildung 22).

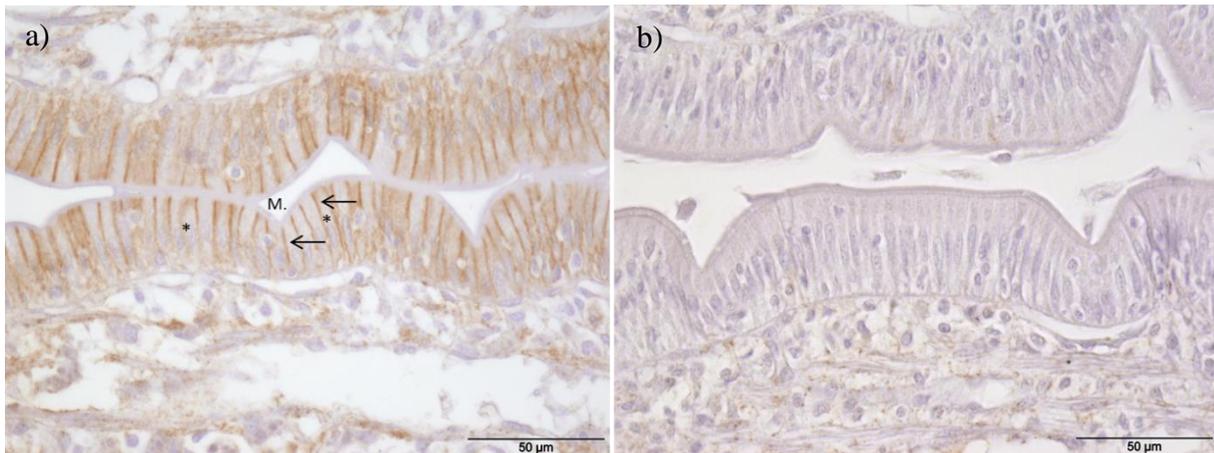


Abbildung 22: a) Immunhistochemische Färbung der Enterozyten mit mouse anti-PMCA1/4 auf Dünnschnitten vom equinen Jejunum (1:10000) Gegenfärbung mit Hämalaun, M. = Mikrovillisaum, * = Zellkern, → = DAB-Färbung der basolateralen Membran b) PAK Kontrolle mit Hämalaunfärbung

4.4.1 Funktionelle Untersuchungen zum P_i -Transport

4.4.1.1 Basale Fluxraten von P_i entlang der Darmachse

Es wurden unidirektionale Fluxraten in Abwesenheit eines elektromechanischen Gradienten bestimmt und Nettofluxraten berechnet.

4. Ergebnisse

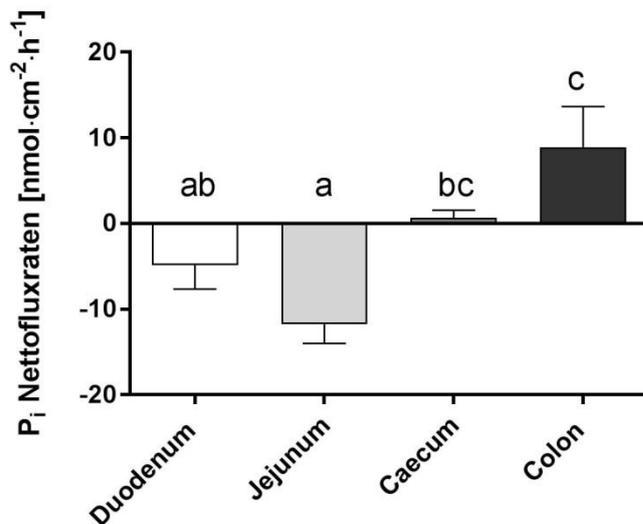


Abbildung 23: Gezeigt sind basale P_i Nettofluxraten entlang der Darmachse; Duodenum N=9, Jejunum N=10, Caecum und Colon N=12, MW ± SEM, one-way ANOVA getestet nach Tukey's

Im Duodenum betragen die basalen Nettofluxraten $-4,853 \pm 2,795 \text{ nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$, im Jejunum $-11,44 \pm 2,055 \text{ nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$, im Caecum $1,028 \pm 0,8993 \text{ nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ und im Colon $7,086 \pm 3,705 \text{ nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$. Signifikant vom hypothetischen Wert Null verschieden war das Jejunum. Die Nettofluxraten von P_i der verschiedenen Darmsegmente unterschieden sich zwischen Jejunum und Caecum signifikant voneinander (One-way ANOVA, $p < 0.05$) (Abbildung 23).

4.4.1.2 Differenzierung zwischen para- und transzellulärem P_i-Transport

Die unidirektionalen Fluxraten von P_i und Mannit wurden simultan in Abwesenheit eines elektrochemischen Gradienten bestimmt. Durch Korrelation der P_i-Fluxraten mit den entsprechenden Mannit-Fluxraten wurde überprüft, ob P_i vorwiegend parazellulär oder transzellulär transportiert wurde (Abbildung 24).

4. Ergebnisse

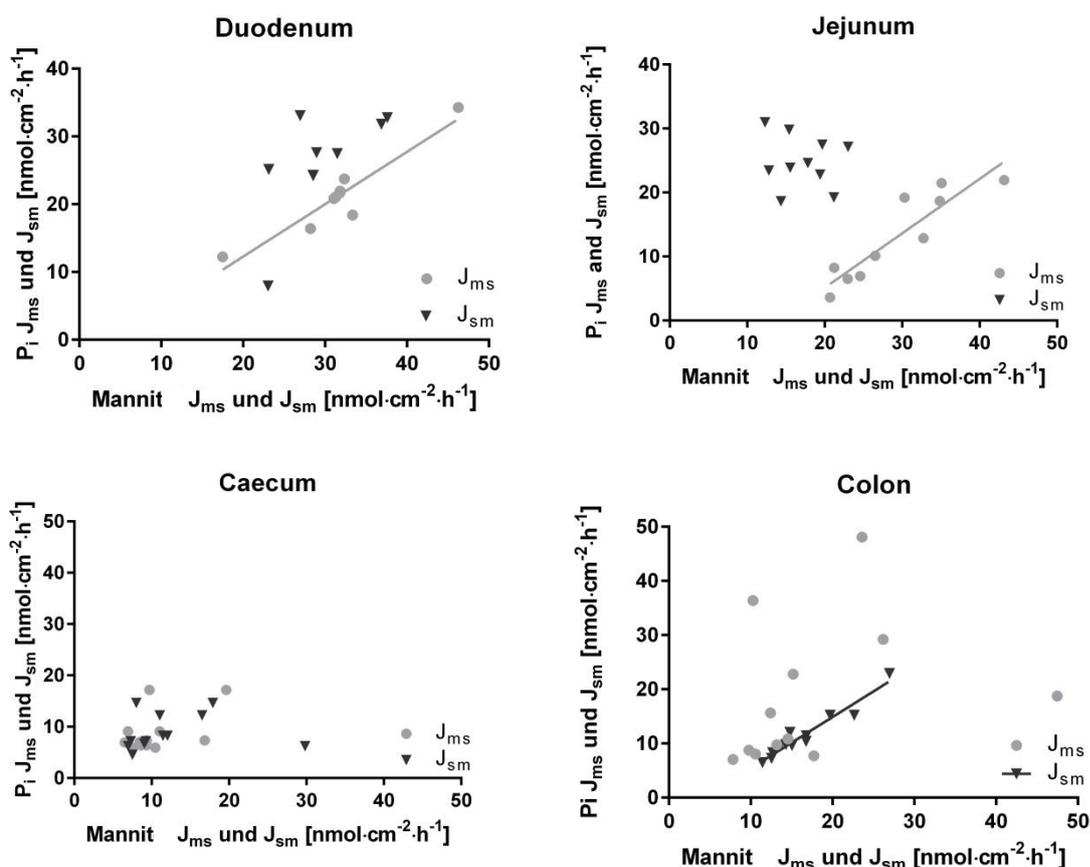


Abbildung 24: Unidirektionale P_i -Fluxraten (J_{sm} und J_{ms}) in Abhängigkeit der entsprechenden Mannitfluxraten, MW, Korrelation nach Pearson, Duodenum N=9, Jejunum N=10, Caecum und Colon N=12

Bei einem Korrelationswert über $r = 0,5$ wurde die Regressionsgerade ermittelt um den linearen Zusammenhang genauer zu beschreiben. In Tabelle 13 werden die Korrelationswerte und Regressionsgeraden sowie das Signifikanzniveau für das Duodenum, Jejunum, Caecum und Colon von J_{ms} und J_{sm} gezeigt.

Tabelle 13: Korrelationen zwischen den unidirektionalen P_i -Fluxraten und den dazugehörigen unidirektionalen Mannit-Fluxraten im Duodenum, Jejunum, Caecum und rechten dorsalen Colon. J_{ms} = Fluxraten von mukosal nach serosal, J_{sm} = Fluxraten von serosal nach mukosal

	Korrelationskoeffizient nach Pearson r^2		Signifikanz p		Regressionsgerade
	ms	sm	ms	sm	
Duodenum	0,9414	0,6546	<0,001	n.s.	ms: $J_{Pi} = (0,7726 \pm 0,1046) \cdot J_{man} - (3,16 \pm 3,374)$
Jejunum	0,9075	-0,1551	<0,001	n.s.	ms: $J_{Pi} = (0,8502 \pm 0,1391) \cdot J_{man} - (11,86 \pm 4,176)$
Caecum	0,5046	0,1096	n.s.	n.s.	
Colon	0,297	0,9653	n.s.	<0,001	sm: $J_{Pi} = (0,9459 \pm 0,081) \cdot J_{man} - (0,4025 \pm 1,376)$

4. Ergebnisse

Im Duodenum wurde ein linearer Zusammenhang für die J_{ms} Fluxraten beobachtet. Das Jejunum zeigte ebenfalls einen linearen Zusammenhang für die J_{ms} Fluxrate. Für das Caecum konnte kein signifikanter Zusammenhang ermittelt werden. Im Colon zeigte sich ein linearer Zusammenhang für die Fluxraten von serosal nach mukosal.

4.4.1.2.1 Effekt von 2,4,6- Triaminopyrimidin (TAP) auf den P_i -Transport

Die unidirektionalen P_i -Fluxraten vor und nach Zugabe von TAP in den verschiedenen Darmsegmenten sind in den Abbildungen 25 und 26 dargestellt. Die statistischen Auswertungen der unidirektionalen Fluxraten ergaben weder im Dünndarm noch im Dickdarm signifikante Unterschiede vor und nach Zugabe von TAP.

4. Ergebnisse

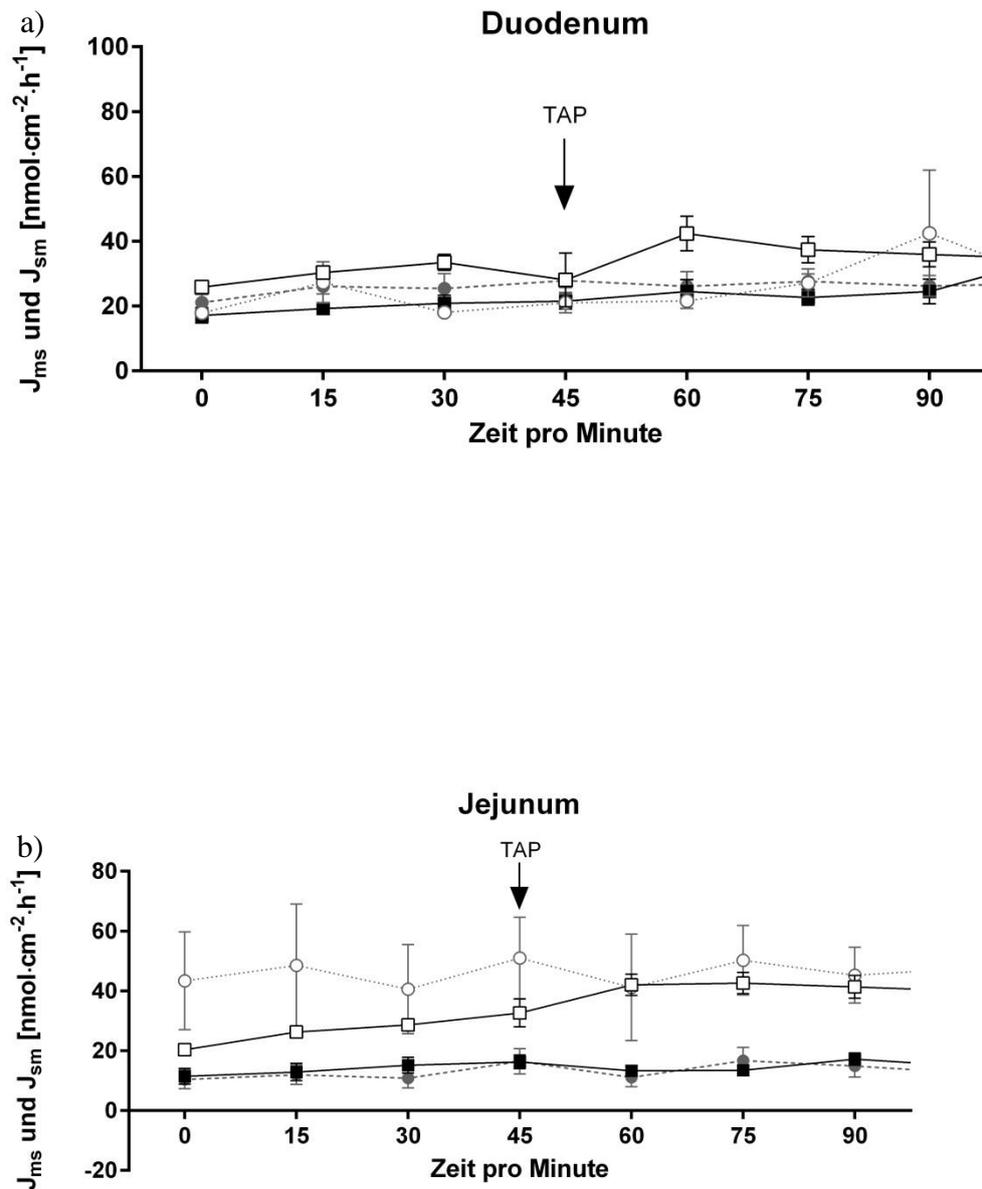


Abbildung 25: Zeitlicher Verlauf der unidirektionale P_i J_{ms} (■) und P_i J_{sm} (□) im Duodenum (a) und im Jejunum (b) vor und nach der Zugabe von TAP im Vergleich zur Zeitkontrolle (P_i J_{ms} ● und P_i J_{sm} ○, keine Zugabe von TAP) Two-way ANOVA, Multiple comparisons nach Sidak, $*=P<0,05$

4. Ergebnisse

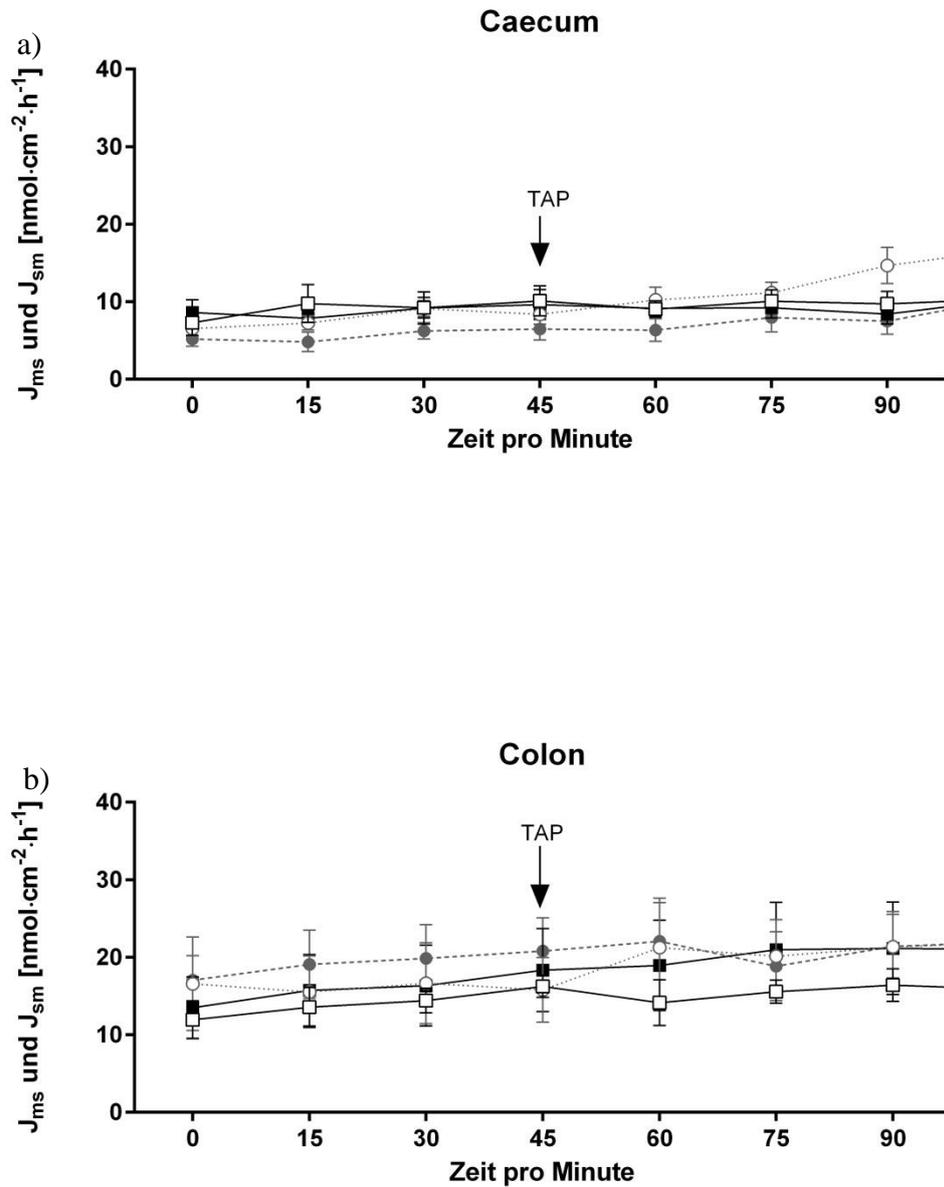


Abbildung 26: Zeitlicher Verlauf der unidirektionale P_i J_{ms} (■) und P_i J_{sm} (□) im Caecum (a) und Colon (b) vor und nach der Zugabe von Na-Arsenat im Vergleich zur Zeitkontrolle (P_i J_{ms} ● und P_i J_{sm} ○, keine Zugabe von TAP) Two-way ANOVA, Multiple comparisons nach Sidak, *=*P*<0,05

4.4.1.2.2 Effekte von Natrium Arsenat auf den Pi-Transport

Die unidirektionalen Ca²⁺-Fluxraten vor und nach Zugabe von Natrium Arsenat in den verschiedenen Darmsegmenten sind in den Abbildungen 26 und 27 dargestellt. Natrium Arsenat hatte weder im Dünndarm noch im Dickdarm einen Effekt auf die unidirektionalen P_i Fluxraten (Two-way ANOVA, *p*<0.05).

4. Ergebnisse

Auch die leichte, kontinuierliche Abnahme der J_{ms} Fluxraten nach Natrium Arsenat-Zugabe im Colon, die in der Zeitkontrolle nicht beobachtet wurde, konnte statistisch nicht abgesichert werden.

Die zeitlichen Zugaben des Inhibitors sind durch Pfeile gekennzeichnet.

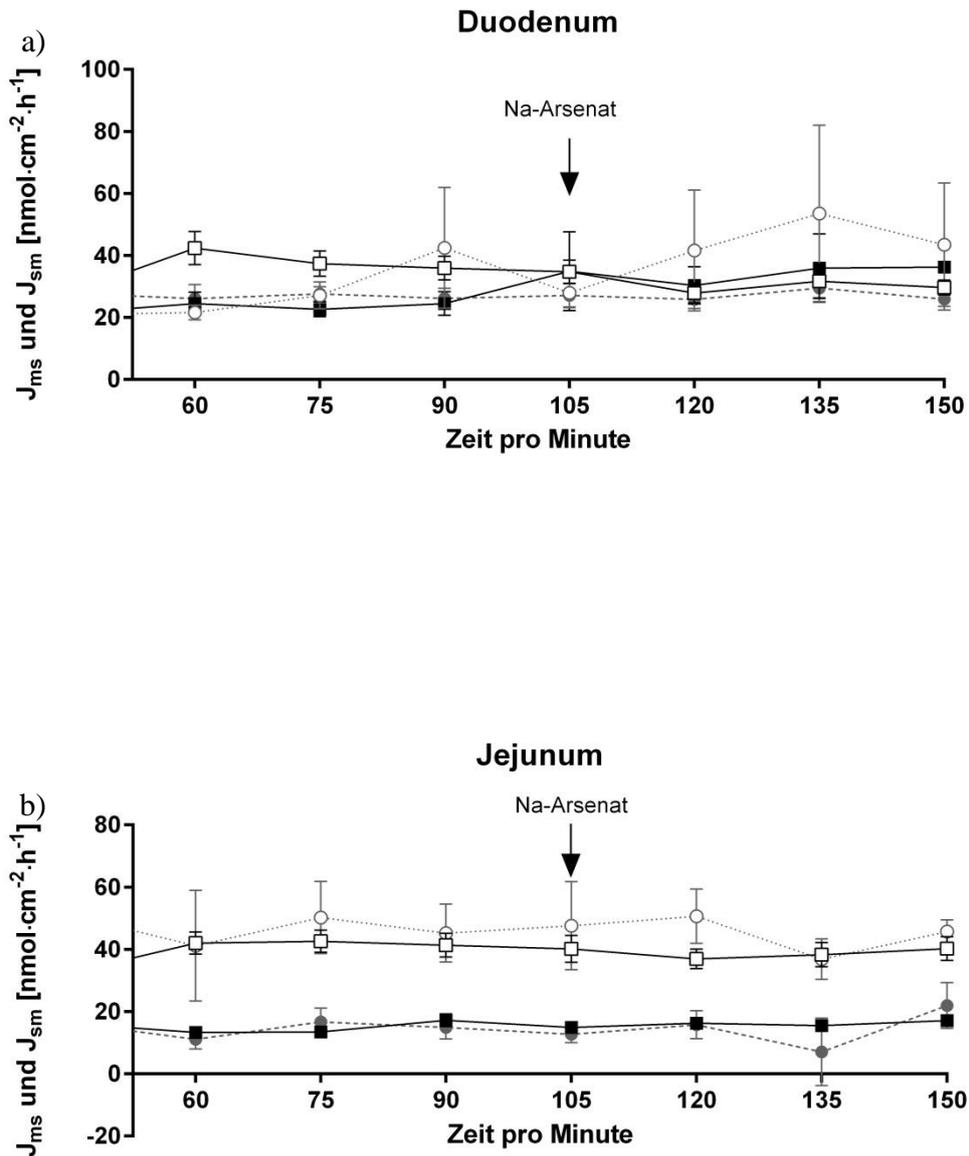


Abbildung 27: Zeitlicher Verlauf der unidirektionale P_i J_{ms} (■) und P_i J_{sm} (□) im Duodenum (a) und im Jejunum (b) vor und nach der Zugabe von TAP im Vergleich zur Zeitkontrolle (P_i J_{ms} ● und P_i J_{sm} ○, keine Zugabe von Na Arsenat) Two-way ANOVA, Multiple comparisons nach Sidak, *= $P < 0,05$

4. Ergebnisse

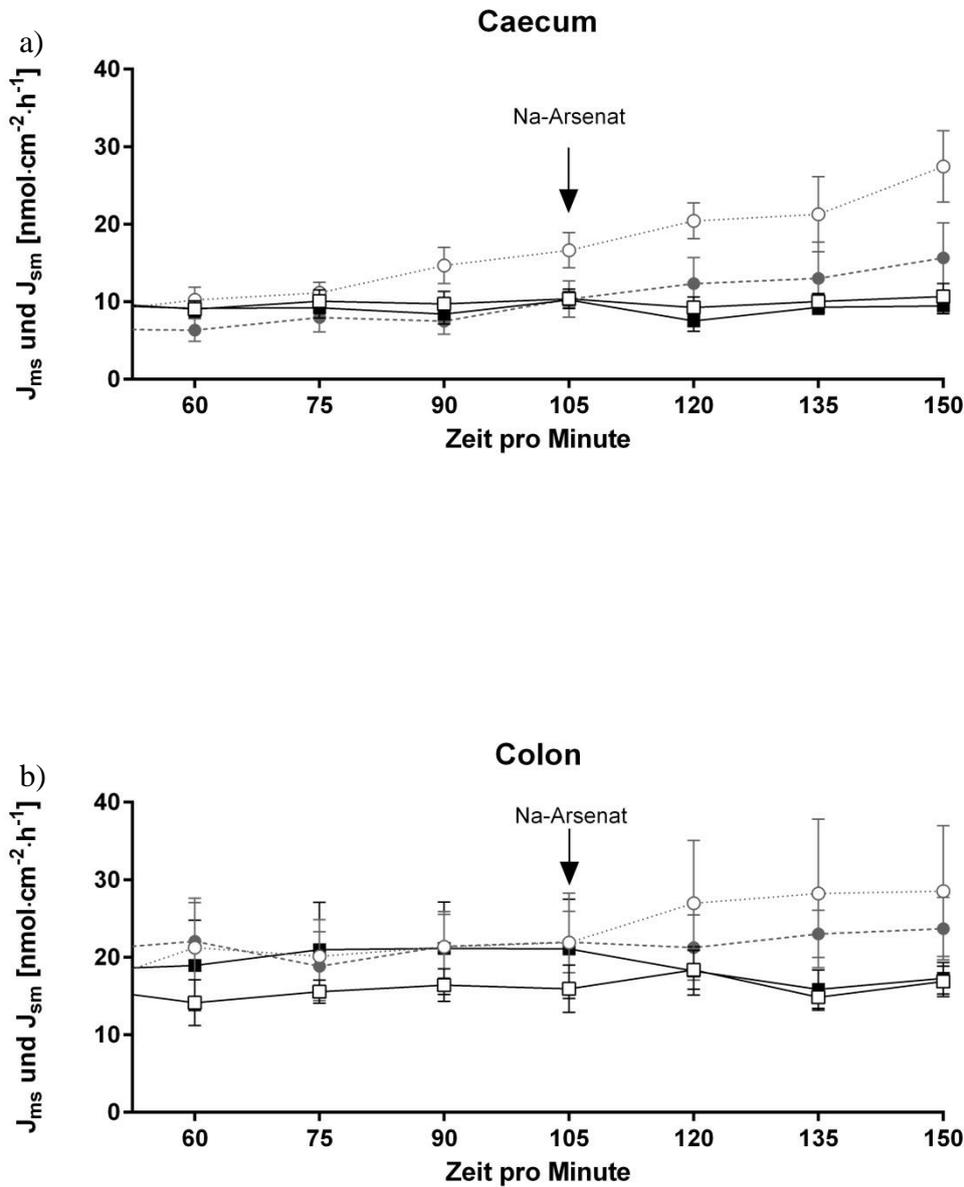


Abbildung 28: Zeitlicher Verlauf der unidirektionale P_i J_{ms} (■) und P_i J_{sm} (□) im Caecum (a) und Colon (b) vor und nach der Zugabe von Na-Arsenat im Vergleich zur Zeitkontrolle (P_i J_{ms} ● und P_i J_{sm} ○, keine Zugabe von Na-Arsenat) Two-way ANOVA, Multiple comparisons nach Sidak, $^* = P < 0,05$ für a) und b)

4.4.2 Strukturelle Untersuchungen zum P_i -Transport

4.4.2.1 qPCR PiT1

Die RNA-Expression von PiT1 entlang der Darmachse ist in Abbildung 29 dargestellt. Die Auswertung der Genexpression für PiT1 zeigten signifikante Unterschiede zwischen dem Duodenum und Ileum. Auch konnten signifikante Unterschiede zwischen dem Ileum und dem

4. Ergebnisse

Caecum sowie Ileum und rechtem dorsalen Colon und Ileum und dem rechten ventralen Colon ermittelt werden. Signifikant unauffällig blieben hingegen proximales und distales Jejunum.

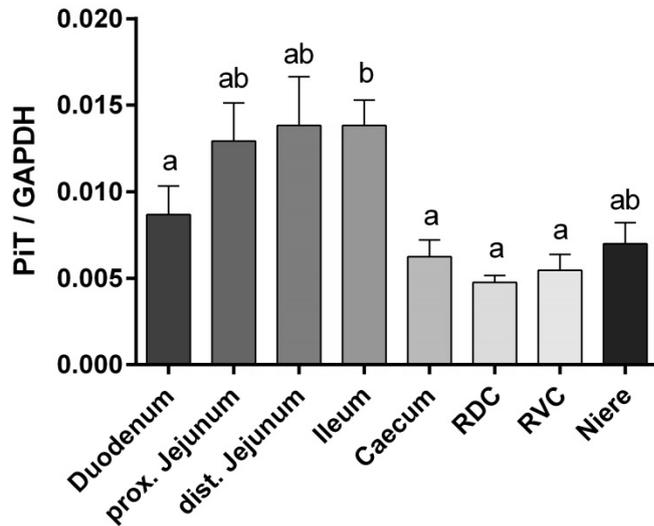


Abbildung 29: RNA-Expression von PiT1 entlang der Darmachse normiert auf GAPDH, RDC = rechtes dorsales Colon, RVC = rechtes ventrales Colon, MW \pm SEM, N=6, One-way ANOVA getestet nach Tukey's, ungleiche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Segmenten. Die Niere dient zur Kontrolle.

4.4.2.2 q-PCR NaPi-IIb

Die RNA-Expression von NaPi-IIb entlang der Darmachse ist in Abbildung 30 dargestellt. Dabei konnte festgestellt werden, dass das rechte dorsale Colon signifikant verschieden vom rechten ventralen Colon war. Alle weiteren Darmabschnitte waren statistisch nicht verschieden.

4. Ergebnisse

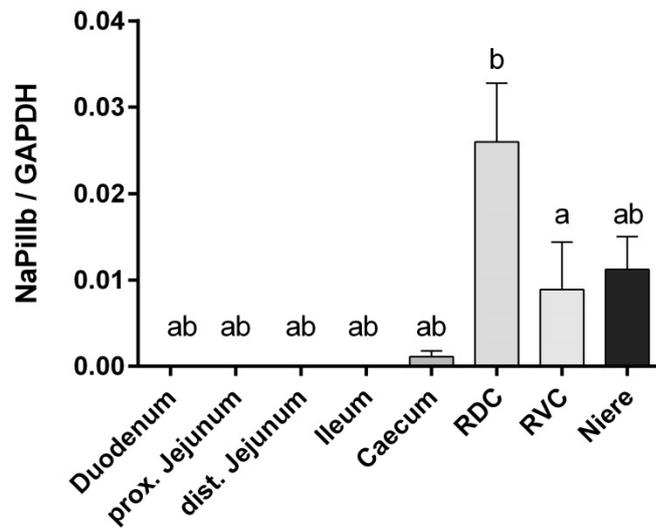


Abbildung 30: RNA-Expression von NaPi-IIb entlang der Darmachse normiert auf GAPDH, RDC = rechtes dorsales Colon, RVC = rechtes ventrales Colon, MW \pm SEM, N=6, One-way ANOVA korrigiert nach Tukey's, ungleiche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Segmenten. Die Niere dient zur Kontrolle.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der intestinale Transport von Ca^{2+} und P_i entlang der Darmachse beim Pferd untersucht und sowohl funktionell als auch molekularbiologisch charakterisiert. Hierfür wurden Studien an 12 gesunden Pferden verschiedenen Alters, Rasse, Herkunft und Geschlecht durchgeführt.

5.1 Bewertung des Versuchsansatzes und der angewandten Methoden

5.1.1 Auswahl der Tiere

Für die Durchführung der Versuche wurden insgesamt neun Deutsche Warmblutpferde sowie ein Vollblut, ein Niederländisches Reitpferd und ein Französisches Warmblut im Alter zwischen drei und 22 Jahren verwendet, wobei zehn Tiere weiblich und zwei Tiere männlich waren. Eines der männlichen Tiere war kastriert. Die Tiere stammten aus unterschiedlichen geografischen Regionen und wurden vor ihrer Ankunft im Physiologischen Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover nicht standardisiert gefüttert. Nach der Ankunft im Institut wurden die Pferde im Erhaltungsbedarf drei Wochen mit Raufutter (Heu, 1,5 kg/100 kg LM) und Kraftfutter (Hafer, 1 g Stärke/kg LM) gefüttert. Die Pferde hatten freien Zugang zu Wasser und wurden in Laufboxen gehalten. Am Tag 22 nach Einstallung erfolgte die Euthanasie der Tiere und die Gewebeentnahme. Die Anpassungsphase im Institut wurde gewählt, um eine unterschiedliche Fütterung als relevanten Einflussfaktor für die Ausprägung gastrointestinaler Funktionen weitgehend zu reduzieren.

5.1.2 Beurteilung der angewandten Methoden

5.1.2.1 Beurteilung der Verwendung der Ussing-Kammer-Technik

Das Prinzip der Ussing-Kammer geht ursprünglich auf eine von Ussing und Zerahn entwickelte Technik zur Charakterisierung ionaler Transportvorgänge an der Froschhaut zurück (USSING u. ZERAHN 1951). Für Analysen an Darmepithelien verschiedener Spezies wie Wiederkäuer, Schweinen oder auch Pferden, wurde das Verfahren modifiziert und weiterentwickelt (KAUNE et al. 1992; SCHRÖDER et al. 1993; SCHRÖDER et al. 1997; SCHRÖDER et al. 1998; SCHRÖDER et al. 2001; CEHAK et al. 2009).

Die Ussing-Kammer-Technik ermöglicht unter definierten Bedingungen und der gleichzeitigen Anwendung der Radioisotopen-Tracertechnik quantitative Bestimmung transepithelialer Transportraten von Elektrolyten und Nährstoffen. Neben den transepithelialen Transportraten werden kontinuierlich die elektrophysiologischen Parameter Gewebeleitfähigkeit und Kurzschlussstrom gemessen. Hinweise auf aktive Transportprozesse liegen dann vor, wenn bei Abwesenheit eines elektrochemischen Gradienten die Differenz zwischen den unidirektionalen Transportraten signifikant von Null verschieden ist. Aus der Messung der elektrophysiologischen Parameter kann auf die Integrität der Gewebe geschlossen werden. Die Zugabe von Forskolin am Ende des Versuches kann ebenfalls genutzt werden, um die Vitalität des Gewebes zu überprüfen. Nach der Zugabe von Forskolin sollte ein Anstieg im I_{sc} zu detektieren sein, der über eine Stimulation der Chloridsekretion vermittelt wird. An Mageneithelien von Ratten und Schweinen konnten Korrelationen zwischen intaktem und defektem Gewebe und dessen Gewebeleitfähigkeit festgestellt werden (ARGENZIO u. EISEMANN 1996; BAJKA et al. 2003).

5.1.2.2 Betrachtung von I_{sc} und G_t

Die im Rahmen dieser Studie gemessenen basalen I_{sc} und G_t Werte waren vergleichbar mit denen aus vorangegangenen Studien bei Pferden (CEHAK et al. 2009; CEHAK et al. 2012). Allerdings zeigten sich geringfügige Unterschiede zwischen den bereits publizierten Werten von CEHAK et al. (2012) und denen in dieser Studie gemessenen Werten. Diese könnten möglicherweise auf Unterschiede in Alter, Geschlecht oder Rasse der Tiere zurückzuführen sein. Im tierartspezifischen Vergleich lagen die basalen I_{sc} Werte in der vorliegenden Studie im

5. Diskussion

Duodenum und Jejunum höher als Werte von Schafen und Ziegen. Ähnliche Werte wie beim Pferd wurden bei neugeborenen Ferkeln gefunden. Auch die basalen G_t waren beim Pferd im Dünndarm höher und im Dickdarm niedriger als bei Schafen und Ziegen. Bei Ferkeln waren die G_t Werte im Duodenum ähnlich den gemessenen Werten von Pferden (Schröder et al. 1993; Schröder et al. 1997; Wilkens et al. 2011).

Die in dieser Studie erhobenen positiven Werte für den I_{sc} im Jejunum decken sich nicht mit den Ergebnissen aus den Studien von CEHAK et al. (2009, 2012). Der Grund hierfür könnte die Heterogenität der Tiere sein. Auch könnte die Anzahl der Tiere der Grund für den detektierten Unterschied sein. CEHAK et al. (2012) verwendeten N=4 Tiere bzw. N=5 Tiere (CEHAK et al. 2009). In der vorliegenden Studie wurden bis zu 12 Tiere in die Auswertung integriert.

Insgesamt unterscheiden sich die Ergebnisse in der vorliegenden Studie von Versuchen an Schweinen, Ziegen und Schafen. Bei diesen Tierarten wurden die höchsten I_{sc} Werte im Colon und die niedrigsten I_{sc} Werte im Jejunum detektiert (SCHRÖDER et al. 1997; SCHRÖDER et al. 1998; LEONHARD-MAREK et al. 2009).

Die in dieser Studie erhobenen G_t Werte sind vergleichbar mit bereits publizierten Werten (CEHAK et al. 2009; 2012). Das Pferd wies höhere G_t Werte im Duodenum auf als Ratten (JUNGBLUTH u. BINSWANGER 1989) und kleine Wiederkäuer (SCHRÖDER et al. 1997).

5.1.2.3 Beurteilung der Verwendung der qPCR

Anhand der qPCR wurde die mRNA Expression des Ca^{2+} - und P_i -Transportes entlang der Darmachse des Pferdes auf genomischer Ebene untersucht und quantifiziert. Als Komponenten des Ca^{2+} -Transports wurden die mRNA Expression des apikalen Kanals TRPV6, die Expression des zytosolischen Ca^{2+} -Bindungsprotein Calbindin D_{9k} und der basolateralen Ca^{2+} -Pumpe PMCA1b gemessen und quantifiziert. Ebenso wurden Teile des P_i -Transportes, PiT1 und NaPi-IIIb gemessen und quantifiziert.

Die qPCR detektiert im Gegensatz zu einer konventionellen PCR während jedem Zyklus mittels Fluoreszenz die Template Vermehrung. So lässt sich die Templatemenge quantitativ bestimmen und ihr Abundanz zwischen verschiedenen Proben messen. Bereits in früheren Studien konnte so anhand von qPCR eine höhere Effizienz einzelner Gene nachgewiesen werden als bei einer herkömmlichen PCR (WANG u. BROWN 1999; WIEDEMANN et al. 2004).

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Qualitätskontrolle der RNA anhand der Lab-on-Chip-Technologie mittels Kapillargelelektrophorese unter Verwendung des Bioanalyser 2100 durchgeführt. Die Verwendung von intakter RNA ist ein wichtiges Element für eine erfolgreiche RT-PCR-Analyse. Dabei wurde die RNA-Integrität durch Bestimmung der RNA-Integritätsnummer (RIN) ermittelt. Als optimal für die molekularbiologische Untersuchung werden RIN-Werte zwischen 8 und 10 angesehen (MUELLER et al. 2004; SCHRÖDER et al. 2006). Alle in dieser Studie ermittelten RIN-Werte lagen zwischen 9 und 10. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die verwendete RNA zum Zeitpunkt der Messung der RNA-Integrität intakt gewesen ist.

Als Standard zur Normalisierung wurde GAPDH eingesetzt. GAPDH wird oftmals als *Housekeeping* Gen verwendet. Die Anforderungen an ein solches Gen bestehen darin, dass das Gen eine relativ konstante Expression in verschiedenen Gewebetypen und unter unterschiedlichen experimentellen Konditionen aufweist (BUSTIN 2000). Wie Versuche an Ratten (ANDERSON et al. 2004; CABIATI et al. 2012) und Rindern (LISOWSKI et al. 2008) zeigten, kann GAPDH zur Normalisierung verwendet werden, da es gleichbleibend über verschiedene Zelltypen und Stadien exprimiert wird und somit mehrfach erfolgreich bei verschiedenen Fragestellungen als interner Standard verwendet wurde (BENN et al. 2008; WILKENS et al. 2009; SCHRÖDER et al. 2015).

Bei Pferden konnte eine relativ gleichmäßige Expression von GAPDH entlang der Darmachse in vorangegangenen Studien gezeigt werden (SPREKELER et al. 2011). Daher wird davon ausgegangen, dass sich GAPDH als *Housekeeping* Gen zur Normalisierung auch beim Pferd eignet.

5.1.2.4 Betrachtung der Verwendung der Western Blot Analyse

Die Expression sowie die Lokalisation der am Ca^{2+} -Transport beteiligten Proteine TRPV6, Calbindin $\text{D}_{9\text{k}}$ und PMCA1b wurden auch mittels Western Blot-Analyse untersucht. Die Expression sowie die Lokalisation der am P_i -Transport beteiligten Proteine PiT1 und NaPi-IIb wurden nicht mittels Western Blot-Analyse untersucht.

Nach Überprüfung der Negativkontrolle anhand des Sekundärantikörpers (SAK) wurden die jeweiligen Antikörper als passend befunden.

5. Diskussion

Im Rahmen der Untersuchungen war es nicht möglich, alle gewonnenen Proben von allen Pferden und Darmabschnitten direkt zu vergleichen, da auf einer Membran nur 8 Proben aufgetragen werden konnten. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit Proben aus Duodenum, proximalem Jejunum, distalem Jejunum, Ileum, Caecum, rechtem dorsalen Colon, rechtem ventralen Colon sowie der Niere genauer betrachtet. Nach Bestimmung der Bandendichte mittels Chemidoc wurden diese Werte auf das Gesamtprotein relativiert. Dabei wurde für TRPV6 und Calbindin D_{9k} Ponceau rot und für PMCA das Färbemittel IndianInk verwendet. Die Färbung mit Ponceau rot ist reversibel und wurde vor der Detektierung des Proteins durchgeführt wohingegen die Färbung mit IndianInk nicht reversibel ist und nach der Detektion des Proteins erfolgte. IndianInk wurde verwendet, da eine Detektion mittels Ponceau rot bei PMCA auf der Nitrocellulose-Membran nicht möglich war.

5.1.2.5 Beurteilung der Verwendung der Immunhistochemie

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von PMCA1b immunhistologisch untersucht. Zur Prüfung der Spezifität der Primärantikörper wurde als Negativkontrolle der Sekundärantikörper verwendet. Unter diesen Bedingungen sichtbare Signale wurden als unspezifisch angesehen. PMCA1b konnte in der vorliegenden Studie basolateral detektiert werden, was der Lokalisation von PMCA1b entspricht.

5.1.3 Gemessene Blutparameter zur Beurteilung des Mineralstoffstatus der Tiere

Die Konzentrationen von Ca_t und Ca²⁺ lagen im Wesentlichen in dem für Pferde angegebenen Referenzbereichen (KRAFT 2005). Abweichungen im Ca²⁺ wurden bei vier Pferden geringfügig unterhalb und bei einem Pferd oberhalb des Referenzbereiches (1,45 - 1,6 mmol/l) gemessen. Die geringen Abweichungen der Ca²⁺-Konzentrationen vom Normbereich bei wenigen Tieren könnten durch individuelle Faktoren, wie zum Beispiel das Alter und den unterschiedlichen Trainingszustand der Pferde vor Beginn der Studie zurückzuführen sein. Diese Faktoren können die Ca²⁺-Werte beeinflussen, wie in vorangegangenen Studien gezeigt werden konnte (VERVUERT et al. 2002; VERVUERT et al. 2006; BERLIN u. AROCH 2009). Die Ca_t Werte entsprachen publizierten Werten von BREIDENBACH et al. (1998). Die in dieser Studie gemessenen Calcidiol-Werte lagen unterhalb der von PICCIONE et al. (2008)

5. Diskussion

gemessenen Werte, waren aber ähnlich wie die von BREIDENBACH et al. (1998) bestimmten Werte.

Die gemessenen Calcitriol- sowie Calcidiol-Werte lagen deutlich niedriger als Werte von anderen Spezies (BROMMAGE et al. 1988; WARREN et al. 1989; SCHOENMAKERS et al. 2016). Die Ergebnisse von Calcitriol und Calcidiol lassen eine andere physiologische Relevanz bei Pferden vermuten als sie bei anderen Spezies haben. Warum Pferde solch niedrigen Konzentrationen von Calcitriol und Calcidiol im Blut aufweisen ist bislang nicht eindeutig geklärt. Ob und inwiefern das eine Rolle für die Regulation der Ca^{2+} -Homöostase spielt, müsste durch weitere Studien geklärt werden.

Die gemessenen P_i -Plasmakonzentrationen lagen alle im für Pferde angegebenen Normbereich (KRAFT 2005).

Der teilweise große Standardfehler in den untersuchten Proben lässt sich vermutlich auf die Heterogenität der Tiere zurückführen. Ältere Pferde scheinen aufgrund des Alterungsprozesses eine veränderte Verdauung zu haben (MEYER u. COENEN 2002). Jüngere Pferde weisen eine aktivere Dickdarmfunktion und eine aktivere Nährstoffabsorption als ältere Pferde auf (RALSTON et al. 1989). Bei einem gesteigerten Ca^{2+} -Anteil in der Ration wird die Verdaulichkeit und Rückresorption von Phosphor bei älteren Pferden im Vergleich zu jüngeren Tieren vermindert (DOORN et al. 2004). BREIDENBACH et al. (1998) zeigten eine altersbedingte Abnahme der P_i -Plasmakonzentration. Dies lässt vermuten, dass auch die Aktivität einzelner Transmembranproteine im Alter Veränderungen aufweist. Ob auch rassebedingte- oder geschlechtsbedingte Unterschiede eine Rolle spielen kann zu diesem Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden.

Dennoch kann aufgrund der Ergebnisse der Blutuntersuchung davon ausgegangen werden, dass sich die Tiere zum Zeitpunkt der Probenentnahme in einem physiologischen Zustand im Hinblick auf die Ca^{2+} - und P_i -Homöostase befanden.

5.2 Ca²⁺ Transport entlang der Darmachse

5.2.1 Betrachtung des Ca²⁺ -Transportes entlang der Darmachse unter Verwendung der Ussing-Kammer-Technik

Durch die Ussing-Kammer-Technik ist eine aussagekräftige Darstellung der Ca²⁺- Fluxraten entlang der Darmachse des Pferdes möglich gewesen. Dabei war der Erhalt der Integrität und Vitalität des Epithels eine Voraussetzung für die Messungen. Dies wurde anhand des Kurzschlussstroms (I_{sc}) und der Gewebeleitfähigkeit (G_t) als elektrophysiologische Parameter überprüft.

5.2.1.1 Betrachtung von basalen Ca²⁺-Fluxraten

Die Bestimmung der basalen Ca²⁺-Fluxraten entlang der Darmachse in der vorliegenden Arbeit zeigten das Duodenum als Hauptlokalisierung der Ca²⁺-Absorption beim Pferd, gefolgt vom Jejunum. Das Caecum wurde auf Grund der zugrundeliegenden Ergebnisse als weniger relevant für die Ca²⁺-Absorption bewertet. Auch das Colon schien beim Pferd in der vorliegenden Arbeit für die Ca²⁺-Absorption keine größere Relevanz zu haben.

Damit stimmen die Ergebnisse dieser Studie mit Ergebnissen aus vorangegangenen Studien von CEHAK et al. (2012), SPREKELER et al. (2011) und H. F. SCHRYVER (1975) überein. Letzterer konnte in seiner Studie anhand fistulierter Ponies zeigen, dass die Ca²⁺-Absorption prozentual gesehen im Duodenum am höchsten war.

Nicht nur bei Pferden konnte das Duodenum als wichtigster Darmabschnitt hinsichtlich der Ca²⁺-Absorption gesehen werden, denn SCHRÖDER et al. (1997) zeigten an heranwachsenden Ziegen ebenfalls verhältnismäßig hohe Fluxraten im Duodenum gefolgt von Jejunum, Caecum und Colon. Auch bei Ratten konnten positive Netto-Fluxraten im Duodenum detektiert werden (JUNGBLUTH u. BINSWANGER 1989). Die Ca²⁺-Netto-Fluxraten der Pferde in der vorliegenden Arbeit waren im Duodenum im tierartlichen Vergleich sehr hoch. SCHRÖDER et al. (1993) konnte an Saugferkeln ebenfalls verhältnismäßig hohe Ca²⁺-Netto-Fluxraten im Duodenum zeigen. Vor dem Hintergrund, dass Pferde sehr niedrige Calcitriol- und Calcidiol-Werte im Blut aufweisen, spielen die Vitamin D₃-Metabolite eventuell eine untergeordnete

5. Diskussion

Rolle bei der Regulation der intestinalen Ca^{2+} Absorption, dies müsste noch weiter untersucht werden (BREIDENBACH et al. 1998).

Die in dieser Arbeit detektierten hohen jejunalen positiven Ca^{2+} Netto-Fluxraten unterscheiden sich stark von Ergebnissen aus Untersuchungen an Ratten, bei denen ein negativer Ca^{2+} Nettoflux im Jejunum beobachtet wurde (JUNGBLUTH u. BINSWANGER 1989). Bei adulten Schafen konnten zwar positive Nettofluxraten im Jejunum festgestellt werden, diese wiesen aber im Vergleich zum Pferd deutlich geringere Werte auf (SCHRÖDER et al. 1997).

Im Caecum wurden in der vorliegenden Arbeit positive Nettofluxraten dokumentiert. Dieses Ergebnis bestätigt Studien von CEHAK et al. (2012), die ebenfalls einen positiven Nettoflux im Caecum gemessen hatte. Arbeiten von SCHRYVER et al. (1970a) hingegen postulieren eine Ca^{2+} -Sekretion im Caecum des Pferdes. SCHRYVER et al. (1970a) führte In-vivo Untersuchungen an isolierten Darmsäckchen fistulierter Ponys durch und berechnete den Ca^{2+} -Transport mit Hilfe von radioaktivem ^{47}Ca und des nicht absorbierbaren Markers Cr_2O_3 .

Untersuchungen an anderen Spezies, u.a. bei Ratten und Kaninchen, zeigten ebenfalls eine Ca^{2+} -Absorption im Caecum (KARBACH u. FELDMIEIER 1993; FREEMAN et al. 1995; MINEO et al. 2001).

5.2.1.2 Wirkung von TAP und RR auf den para- und transzellulären Transport sowie Untersuchungen der Korrelationen mit Mannit

Um zu überprüfen, ob für den Ca^{2+} -Transport eher ein parazellulärer oder transzellulärer Transport vorliegt, wurden die Inhibitoren TAP für den parazellulären Weg und RR für den transzellulären Weg in der Ussing-Kammer eingesetzt und Korrelationen der basalen Ca^{2+} -Fluxraten mit Mannit-Fluxraten durchgeführt.

Mannit gilt es als Marker für den parazellulären Transport (DAWSON 1977; NELLANS u. KIMBERG 1978; KARBACH 1992; SCHRÖDER et al. 1997). Die in dieser Arbeit durchgeführten Korrelationsstudien zwischen Mannit und Ca^{2+} weisen auf einen überwiegend transzellulären Transport vom Darmlumen zur Blutseite und einen parazellulären Transport von der Blutseite zum Darmlumen im Dünndarm sowie im Caecum hin. Ein parazellulärer Transport konnte sowohl von der Blutseite hin zum Darmlumen ($p < 0,001$) als auch in entgegengesetzte Richtung ($p < 0,01$) im Colon detektiert werden. Dies lässt vermuten, dass im Colon nahezu keine transzelluläre Aufnahme von Ca^{2+} stattfindet, sondern primär ein

5. Diskussion

parazellulärer Transport. Dies unterstreicht die Ergebnisse dieser Arbeit und kann die Reduktion der Transmembranproteine TRPV6, Calbindin D_{9k} und PMCA auf sowohl mRNA und Proteinebene im Colon erklären.

Korrelationen zwischen Mannit und P_i weisen auf einen überwiegend parazellulären Transport von der Seite des Darmlumens zur Blutseite ($p < 0,001$) im Duodenum und Jejunum hin, wohingegen bei anderen monogastrischen Tier und Wiederkäuern ein primär transzellulärer Transport von P_i im Dünndarm beschrieben wird (BERNER et al. 1976; SHIRAZI-BEECHEY et al. 1988a; SCHRÖDER et al. 1995; MUSCHER et al. 2008). Im Colon wurde vornehmlich ein transzellulärer Transport von P_i detektiert was darauf schließen lässt, dass dieser Transport aktiv über Transportmechanismen geführt wird und daher aktiv und sättigbar scheint.

TAP wurde verwendet, um den parazellulären Weg zu charakterisieren, wie es bei der Inhibition der *tight junctions* in der Gallenblase gezeigt wurde. Die genaue Wirkungsweise von TAP ist derzeit nicht bekannt, aber es wurde vermutet, dass entweder Konformationsänderungen von *tight junctions* induziert werden oder die *tight junctions* - Permeabilität durch direkte Bindung an bestimmte Bindungsstellen innerhalb der *tight junctions* zu einer Veränderung führt. (MORENO 1975a, b; KOTTRA u. FROEMTER 1983). Studien von BALABAN et al. (1979) zeigten einen Abfall der Kationen-Leitfähigkeit, unabhängig von der Anionen-Leitfähigkeit nach Behandlung von TAP. Aufgrund der in dieser Studie gewonnenen Ergebnisse hätte TAP im Colon eine Verringerung der Ca²⁺-Fluxraten verursachen müssen, da im Colon ein parazellulärer Transport sowohl von mucosal nach serosal als auch von serosal nach mucosal gezeigt wurde. Anhand der hier vorliegenden Untersuchungen scheint TAP beim Pferd keine signifikanten Auswirkungen auf den parazellulären Ca²⁺-Transport zu haben.

Als Inhibitor für den transzellulären Transport von Ca²⁺ wurde RR eingesetzt. Die Ergebnisse nach Zugabe von 5·10⁻⁵M RR zeigten beim Pferd keine signifikanten Veränderungen in den Fluxraten entlang der Darmachse. RR inhibiert mit einer deutlich höheren Affinität TRPV5 als TRPV6 (HOENDEROP et al. 2001; NILIUS et al. 2001). Im Gegensatz zu den in dieser Studie gezeigten Ergebnissen zeigten Daten aus der Dissertation von BRANDENBURGER (2004) einen Effekt von RR bei einer Konzentration von 10·10⁻⁶M am mittleren Jejunum von Ferkeln. Studien zeigen, dass das Schwein TRPV5 auf mRNA Ebene im mittleren Jejunum exprimiert (BRANDENBURGER 2004). Die Expression von TRPV5 wurde bei Arbeiten von

5. Diskussion

SPREKELER et al. (2011) und ROURKE et al. (2010) untersucht und weisen darauf hin, dass Pferde TRPV5 wohl nicht, beziehungsweise in marginalen Mengen im Dünndarm, vornehmlich im proximalen Jejunum, exprimieren. Daher könnte spekuliert werden, dass die gewonnenen Ergebnisse beim Schwein überwiegend auf den TRPV5 zurück zu führen sind oder aber, dass RR in einer zu niedrigen Konzentration eingesetzt wurde. Außerdem könnte es sein, dass das porcine TRPV6 empfindlicher gegenüber RR ist. Es kann auch sein, dass RR am equinen Darm nicht wirksam ist.

5.2.2 Messungen zur Expression der Ca²⁺-transportierenden Strukturen TRPV6, CaBPD9K und PMCA sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene

Die Ergebnisse der Expressionsstudien der Ca²⁺-transportierenden Strukturen TRPV6, Calbindin D_{9k} und PMCA bestätigen die funktionellen Untersuchungen zum Ca²⁺-Transport entlang der Darmachse. Die Expressionen aller untersuchten Strukturen waren im Duodenum und am proximalen Jejunum am höchsten, gefolgt vom Jejunum, und die Expressionen nahmen im Wesentlichen nach aboral hin ab.

5.2.2.1 Expressionsstudien von GAPDH

Zur Durchführung der Expressionsstudien wurde GAPDH als interner Standard zur Normalisierung der mRNA verwendet. Bei Versuchen an Ratten und Rindern konnte gezeigt werden, dass GAPDH in vergleichbarem Umfang in verschiedenen Geweben exprimiert wird (REIST et al. 2003; P. H. ANDERSON et al. 2004; LISOWSKI et al. 2008; CABIATI et al. 2012). GAPDH wurde in vorherigen Studien an Pferden als *Housekeeping Gene* zur Normalisierung verwendet (ROURKE et al. 2010; SPREKELER et al. 2011).

5.2.2.2 Betrachtung von TRPV6

Die Expression auf RNA-Ebene des TRPV6 war im proximalen Dünndarm am höchsten und unterstreicht die Vermutung in Einklang mit den funktionellen Untersuchungen, dass der vordere Dünndarm der wichtigste Darmabschnitt hinsichtlich der Ca²⁺-Absorption beim Pferd ist. Bei den hier durchgeführten Expressionsstudien wurde das Jejunum noch weiter in proximales und distales Jejunum unterteilt.

5. Diskussion

Hier zeigte sich, dass auch das proximale Jejunum für den Ca^{2+} -Transport wichtig zu sein scheint, wohingegen das distale Jejunum an Bedeutung verliert. Die Ergebnisse hinsichtlich der mRNA Expression lassen vermuten, dass das Ileum eine sehr geringe Bedeutung bei der Ca^{2+} -Absorption hat, wohingegen Teile des equinen Dickdarms, wie das Caecum und rechte ventrale Colon, ebenfalls eine Bedeutung für die intestinale Ca^{2+} -Absorption zu haben scheinen.

Die in dieser Studie durchgeführten Ergebnisse bestätigen die Ergebnisse der Studien von ROURKE et al. (2010), HWANG et al. (2011), SPREKELER et al. (2011) und CEHAK et al. (2012), bei denen die mRNA Expression von TRPV6 im Duodenum, Jejunum und im Dickdarm des Pferdes am stärksten detektiert wurden. Die stärkste TRPV6-Expression zeigte sich bei Studien von SPREKELER et al. (2011) im Duodenum, wohingegen ROURKE et al. (2010) diese im proximalen Jejunum detektierte. Diese Daten und die Ergebnisse der hiesigen Studie lassen vermuten, dass das Duodenum sowie der proximale Abschnitt des Jejunums für die Ca^{2+} -Absorption beim Pferd eine hohe Bedeutung haben.

Die Bedeutung des Duodenums für den aktiven Ca^{2+} -Transport wurde auch bei anderen Spezies gezeigt, wie zum Beispiel bei Schafen (WILKENS et al. 2009), Ratten (VAN ABEL et al. 2003; KUTUZOVA u. DELUCA 2004) oder auch beim Huhn (YANG et al. 2011). Anhand von Expressionsstudien entlang der Darmachse konnte beim Kaninchen (HOENDEROP et al. 2000) festgestellt werden, dass der TRPV6 am stärksten im Duodenum gefolgt vom Jejunum exprimiert wurde. Im Ileum und Colon konnte keine Expression detektiert werden. Diese Ergebnisse decken sich im Wesentlichen mit den Ergebnissen aus der vorliegenden Studie. Es zeigte sich, dass im Ceacum und rechten ventralen Colon, TRPV6 auf mRNA Ebene exprimiert wurde, wohingegen auch beim Pferd nahezu keine Expression im Ileum detektiert werden konnte. Es scheint, dass nicht nur beim Pferd das Ileum keine große Relevanz bei der aktiven Ca^{2+} -Absorption besitzt. Studien von WALTERS et al. (2006) an humanem Gewebe oder von NIJENHUIS et al. (2003) an der Maus zeigten ähnliche Resultate bei anderen Spezies.

Im Rahmen dieser Studie wurde die Expression des TRPV6 als Ca^{2+} -Kanal an der apikalen Membran der Enterozyten untersucht. Eine interessante Fragestellung wäre, ob für den Ca^{2+} -Transport an der apikalen Membran noch weitere Strukturen im equinen Darm zu finden sind. So wurde zum Beispiel der TRPV5 bereits in anderen Studien auf mRNA Ebene im Duodenum (HWANG et al. 2011) sowie im proximalen Jejunum und Caecum detektiert (ROURKE et al.

5. Diskussion

2010). Eine Expression von TRPV5 im Ileum konnte ebenfalls beschrieben werden (ROURKE et al. 2010). Es ist nicht ganz auszuschließen, dass der TRPV5, der primär in der Niere exprimiert wird (NIJENHUIS et al. 2003), auch im equinen Darm in relevanter Menge exprimiert wird, zumal BRANDENBURGER (2004) diesen im Darm von Ferkeln auf mRNA Ebene nachweisen konnte. Allerdings weisen Studien von ROURKE et al. (2010) ausschließlich auf eine eventuell relevante Expression im Duodenum und proximalen Jejunum hin. Im Dünndarm von Mäusen konnte der TRPV5 in geringen Mengen im Duodenum und Caecum detektiert werden (NIJENHUIS et al. 2003). Die Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bei Ratten führte zu einer signifikanten Steigerung der Expression des TRPV5 im Dünndarm (VAN ABEL et al. 2003). Es ist nicht auszuschließen, dass das Pferd eventuell zusätzlich zum TRPV6 als Ca^{2+} -Kanal den TRPV5 im Darm exprimiert. Die fehlende Hemmung der Ca^{2+} -Fluxraten durch RR in der hiesigen Studie spricht allerdings gegen eine Bedeutung des TRPV5 für den Ca^{2+} -Transport auf funktioneller Ebene. Denkbar wäre auch ein alternativer Transport-Weg über den spannungsgesteuerten L-Typ-Kanal Cav1.3 (voltage-gated Ca^{2+} channel typ 1.3), der unter anderem im Jejunum von Ratten nachgewiesen wurde (MORGAN et al. 2003). Untersuchungen zum L-Typ-Kanal Cav1.3 liegen beim Pferd bisher nicht vor.

Ergebnisse von ROURKE et al. (2010), SPREKELER et al. (2011) und CEHAK et al. (2012) deuten auf eine aktive Ca^{2+} -Aufnahme im Dickdarm hin, wie Ergebnisse im Rahmen dieser Studie untermauern. Auch bei Studien an Ratten wurde ein aktiver Ca^{2+} -Transport im Caecum vermutet (PENG et al. 1999). KARBACH u. FELDMEIER (1993) postulierten sogar das Caecum als Hauptabsorptionsort für Ca^{2+} .

Ein aktiver Transport von Ca^{2+} im Dickdarm könnte möglicherweise von Bedeutung sein, wenn der diätetische Ca^{2+} -Gehalt reduziert oder der Ca^{2+} -Bedarf stark erhöht ist. Bereits SCHRYVER et al. (1970a, 1970b) konnte zeigen, dass sich die Lokalisation der Ca^{2+} -Aufnahme im Darm des Pferdes abhängig vom Ca^{2+} -Gehalt in der Ration ändert.

Auch an Ratten konnte die Bedeutung der Ca^{2+} -Konzentration im Futter gezeigt werden. So wurden bei niedrigen luminalen Ca^{2+} -Konzentrationen überwiegend der transzelluläre Transport aktiviert wohingegen bei deutlich höheren luminalen Ca^{2+} -Konzentrationen der parazelluläre Transport über *tight junctions* dominierte (BRONNER 2003b, a). NELLANS u. KIMBERG (1978) zeigten ebenfalls an Ratten, dass eine geringe Ca^{2+} -Verfügbarkeit eine erhöhte Ca^{2+} -Aufnahme zur Folge hatte. Aufgrund der Studien an Ratten stellt sich die Frage,

5. Diskussion

ob ähnliche Regulationsmechanismen bei Pferden vorliegen. Zur Abklärung dieser Vermutung müssten gezielt weitere Fütterungsstudien an Pferden durchgeführt werden, die zu unterschiedlichen Ca^{2+} -Konzentrationen im Darm führen. Dabei könnten die Expressionen der einzelnen Transporter für den Ca^{2+} -Transport entlang der Darmachse untersucht werden und ob eine mögliche Modulation dieser Transportsysteme stattfindet. Anhand von Ussing-Kammer Versuchen könnte zudem festgestellt werden inwieweit der Transport parazellulär bzw. transzellulär verläuft bei einem hohen oder niedrigen Ca^{2+} Eintrag im Futter.

Unter Vorbehalt sollten die Ergebnisse des TRPV6 auf Proteinebene diskutiert werden, da es zu Komplikationen beim Nachweis des Proteins gekommen war. So kann es sein, dass der Antikörper gegen TRPV6 nicht so sensitiv gegenüber dem equinen TRPV6 ist oder, dass der gewählte Antikörper eventuell nicht den equinen TRPV6 detektiert oder nur Teile von ihm.

Die Detektion des TRPV6 auf mRNA Ebene bestätigt die Ergebnisse der funktionellen Untersuchungen und des TRPV6 Nachweises auf Protein Ebene. Das Duodenum wurde als Hauptlokalisationsort für die Ca^{2+} -Absorption identifiziert. Im Dickdarm konnte der TRPV6 auf Proteinebene nicht nachgewiesen werden, sondern war nur auf mRNA Ebene zu identifizieren.

Eine Ca^{2+} -Aufnahme im Dickdarm, insbesondere im Caecum, wird auf Grund der Untersuchungsergebnisse dieser Studie mit höherer Wahrscheinlichkeit nicht über den TRPV6 erfolgen, sondern eventuell über alternative Ca^{2+} -Kanäle wie zum Beispiel Cav1.3. Beim Nachweis des TRPV6 mittels Western Blot wurde dieser nicht unter der zu erwartenden Größe von 83kDa nachgewiesen. Die ermittelte Größe in dieser Studie lag unter 72kDa. Dies liegt möglicherweise am Wanderungsverhalten im Gel und wurde beim TRPV6 Nachweis auf Proteinebene bereits von WILKENS et al. (2009) und HOENDEROB et al. (2003) beschrieben. Ergebnisse von HWANG et al. (2011), zeigen den equinen TRPV6 auf der erwarteten Höhe, auf circa 85kDa mittels dem *goat anti-TRPV6* Antikörper (1:500, Santa Cruz CA, U.S.A.). Die Proteinsequenzierung des equinen TRPV6 mittels Massenspektrometrie gelang in dieser Studie nicht. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass der equine TRPV6 auf Grund der Masse vieler anderer dominanterer Proteine in der zu untersuchenden Probe bei der Massenspektrometrie nicht detektiert wurde. Zudem könnte es durchaus sein, dass der equine TRPV6 eine geringere Masse aufweist als berechnet oder die ausgewählten Antikörper nicht

5. Diskussion

geeignet für den equinen TRPV6 waren, da die Information über die genaue Lokalisation der Antikörperbindestellen nicht vorlagen.

Die bis jetzt vorhergesagten Isoformen variieren zwischen 74kDa und 83kDa am Pferd Studien am Duodenum von Ratten verwiesen auf eine Größe von 84 kDa (PENG et al. 1999). Studien an Schafen detektierten ebenfalls den TRPV6 bei circa 75 kDa (WILKENS et al. 2011). Auch Studien von SPREKELER et al. (2012) detektierten den TRPV6 auf Proteinebene an der Plazenta von Kühen mit einer Größe von circa 75 kDa.

5.2.2.3 Expressionsstudien von Calbindin D_{9k}

Die Ergebnisse der Expressionsstudien sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene zeigen, dass Calbindin D_{9k} insbesondere im Duodenum und im proximalen Jejunum am höchsten exprimiert wird und stimmen mit den vorherigen Ergebnissen und der Vermutung, dass der vordere Dünndarmbereich der wichtigste Darmabschnitt für die Ca²⁺-Absorption beim Pferd ist, überein.

Dabei konnte festgestellt werden, dass im Duodenum signifikant mehr Calbindin D_{9k} exprimiert wurde als im distalen Jejunum. Die Ergebnisse der mRNA Expressionen zeigten auch, dass das Ileum eine geringe Bedeutung bei der Ca²⁺-Absorption zu haben scheint wie schon gezeigt wurde. Die RNA Expression von Calbindin D_{9k} ist im Ileum entlang der Darmachse am dritt niedrigsten. Der Nachweis von Calbindin D_{9k} im Dickdarm, wenn auch in deutlich geringeren Maßen als im Dünndarm, zeigte, dass Calbindin D_{9k} beim Pferd auch im Dickdarm an dem transzellulären Ca²⁺-Transport beteiligt sein könnte. Jedoch scheint das rechte dorsale Colon kaum eine Bedeutung für die aktive Ca²⁺-Aufnahme zu haben.

Die Ergebnisse der Calbindin D_{9k} Expressionen entlang der Darmachse der hiesigen Studie bestätigen Untersuchungsergebnisse anderer Studien (ROURK et al. 2010; SPREKELER et al. 2011; CEHAK et al. 2012). SPREKELER et al. (2011) wies Calbindin D_{9k} am equinen Darm sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene nach. Die stärkste Expression von Calbindin D_{9k} wurde im Duodenum und Jejunum detektiert. Auch ROURKE et al. (2010) konnten Calbindin D_{9k} auf mRNA-Ebene am Darm des Pferdes überwiegend im Duodenum und proximalen Jejunum detektieren sowie sehr geringe Expressionen im Ileum, Ceacum und Colon. Auch diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Duodenum und proximale Jejunum unter Normalbedingungen der Hauptlokalisationsort für die Ca²⁺-Absorption ist.

5. Diskussion

5.2.2.4 Betrachtung von PMCA

Die Expression von PMCA war im Duodenum und proximalen Jejunum am höchsten, konnte aber auch in anderen Darmabschnitten nachgewiesen werden. Sie entsprachen im Wesentlichen dem Expressionsmuster von PMCA beim Kaninchen (FREEMAN et al. 1995). Die in dieser Studie gezeigten Ergebnisse auf mRNA Ebene bestätigen vorangegangene Studien von ROURKE et al. (2010) und HWANG et al. (2011). Auch die Ergebnisse zur PMCA Expression deuten darauf hin, dass der vordere Dünndarm der wichtigste Darmabschnitt für die Ca^{2+} -Absorption beim Pferd ist.

5.2.2.5 Betrachtung von Immunhistologie PMCA

Die immunhistologische Darstellung der PMCA zeigte eine basolaterale Lokalisation im Jejunum des Pferdes. Die Lokalisation von PMCA beim Pferd entspricht der Lokalisation anderer Spezies wie HOENDEROP et al. (2000) am Duodenum von Kaninchen zeigen konnte. Um eine umfassende Aussage über die Lokalisation und die Zusammenarbeit weiterer Ca^{2+} -transportierender Proteine treffen zu können, müssten weitere Studien für den Nachweis von TRPV6, Calindin D9k sowie PMCA durchgeführt werden.

5.3 P_i -Transport entlang der Darmachse

5.3.1 Messungen zum P_i -Transport mit funktionellen und strukturellen Versuchsansätzen

Nach dem bisherigen Kenntnisstand wurden zum ersten Mal Expressionsstudien auf mRNA-Ebene in Kombination mit funktionellen Studien zum P_i -Transport am Darm des Pferdes durchgeführt.

Die funktionellen Untersuchungen in Ussing-Kammern ergaben, dass im Jejunum des Pferdes P_i transzellulär sezerniert wird. Dies bestätigt auch Untersuchungen von CEHAK et al. (2012). Auch In-vivo-Studien von SCHRYVER et al. (1971, 1972) deuteten auf eine P_i -Sekretion im Dünndarm des Pferdes hin.

5. Diskussion

Im Rahmen dieser Studie wurden erstmals die beiden intestinalen Na^+ -gekoppelten Pitransporter NaPi-IIb und PiT1 auf mRNA-Ebene im Pferdedarm nachgewiesen. Der NaPi-IIb wurde ausschließlich im Dickdarm detektiert. PiT1 wurde über die gesamte Darmachse nachgewiesen. Im proximalen Jejunum, distalen Jejunum sowie im Ileum war PiT1 stärker vertreten als entlang der restlichen Darmachse.

Anders als bei Pferden wird bei anderen Spezies der Dünndarm als Hauptlokalisation für die P_i -Absorption genannt (CRAMER 1961; KAYNE et al. 1993; SCHRÖDER et al. 1998; HUBER et al. 2002). Bei Menschen oder Ratten wurde als Hauptlokalisation der P_i -Absorption das Jejunum identifiziert, gefolgt vom Duodenum und Ileum (BERNER et al. 1976; SCHARRER 1985; LOGHMAN-ADHAM 1997). CRAMER (1961) postulierte eine Absorption hauptsächlich im Ileum bzw. proximalen Dünndarm, wohingegen KAYNE et al. (1993) den Hauptort der P_i -Absorption im Duodenum und Ileum der Ratte beschrieben. Studien an Ziegen oder Schweinen wiesen ebenfalls auf eine P_i -Absorption im Dünndarm der Tiere hin (SCHRÖDER u. BREVES 1996; SCHRÖDER et al. 1998; HUBER et al. 2002). RADANOVIC et al. (2005) zeigte an Mäusen eine hohe NaPi-IIb mRNA Expression im Ileum und bei Mäusen wurde PiT1 im Dünndarm, vorwiegend im Duodenum und Jejunum exprimiert (BAI et al. 2000).

Kaninchen, die dem Pferd bezüglich der Verdauungsphysiologie ähnlich sind, zeigen eine P_i -Absorption im Duodenum (DANISI et al. 1984; BOROWITZ u. GRANRUD 1992).

Bei Kaninchen konnte unter anderem festgestellt werden, dass die Aufnahme und die Lokalisation eines natriumgekoppelten P_i -Transportes existiert und altersabhängig zu sein scheint. Es zeigte sich ein aktiver P_i -Transport bei Jungtieren im Duodenum, sowie im proximalen und distalen Jejunum, der sich bei älteren Kaninchen ausschließlich auf das Duodenum und proximalen Jejunum verlagerte (DANISI et al. 1984; BOROWITZ u. GRANRUD 1992). Falls sich der P_i -Transport bei Jungtieren bei Pferden ebenso verändern sollte, wie es sich bei Kaninchen darstellt, so wäre es sinnvoll weitere Studien durchzuführen, die ihren Fokus genau auf den Altersunterschied legen. Diese altersabhängige Absorption könnte auch der Grund für die teilweise hohe Streuung der Ergebnisse dieser Studie sein.

Um zu überprüfen ob für den P_i -Transport eher ein parazellulärer oder transzellulärTransport vorlag wurden die Inhibitoren TAP und Na^+ -Arsenat in den Kammern der Ussing-Kammer eingesetzt. Na^+ -Arsenat wurde ausgewählt, da Studien von WILLSKY u. MALAMY (1980) an

5. Diskussion

E. coli zeigten, dass Arsenat den Na⁺-gekoppelten P_i-Transport hemmen kann. Die höchste Affinität zeigte dabei Arsenat mit NaPi-IIb, wie Studien von VILLA-BELLOSTA et al. (2007) zeigten. Studien an jejunalen Bürstensaummembranvesikeln von Ziegen zeigten eine Inhibition des P_i-Transportes durch Na⁺-Arsenat (SCHRÖDER u. BREVES 1996). An Ratten konnte eine kompetitive Inhibition der P_i-Absorption am Dünndarm durch die Zugabe von Na⁺-Arsenat gezeigt werden (BERNER et al. 1976). Auch Arbeiten von HOFFMANN et al. (1976) zeigten eine Hemmung des natriumgekoppelten P_i-Transportes an renaler Bürstensaummembran von Ratten durch Arsenat.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen vermuten, dass sowohl Na⁺-Arsenat wie auch TAP keine geeigneten Inhibitoren für den transzellulären sowie parazellulären P_i-Transport am Darm des Pferdes sind. Dies kann zum einen daran liegen, dass nur marginal NaPiIIb auf mRNA Ebene exprimiert wird und zum anderen, dass Na⁺-Arsenat ausschließlich auf serosaler Seite eingesetzt wurde. Wird der Theorie einer aktiven P_i-Sekretion im Dünndarm nachgegangen, müsste Na⁺-Arsenat auf der mukosalen Seite eingesetzt werden um einen Effekt auf den natriumgekoppelten P_i-Transport zu demonstrieren. Denn beim Pferd liegt, vorsichtig formuliert, eine umgekehrte Transportkette des P_i-Transportes, zumindest im Dünndarm, vor. P_i würde im Dünndarm basal über noch unbekannte Transportmechanismen in die Zelle transportiert werden und apikal, ebenfalls über unbekannte Transportmechanismen, in das Darmlumen sezerniert werden. Um diese Vermutung bestätigen zu können wären weitere Studien unter anderem anhand der Ussing-Kammer-Technik nötig. Hier sollte speziell ein Augenmerk auf die serosale Seite des Dünndarms gelegt werden.

Die Korrelationsstudien im Caecum weisen auf einen transzellulären und somit auch überwiegend aktiven P_i-Transport von sowohl serosal nach mucosal als auch von mucosal nach serosal hin. Die mRNA Expressionsstudien von NaPi-IIb liegen im Caecum an der Nachweisgrenze und die mRNA Expressionen von PiT1 sind deutlich geringer im Dickdarm als im Duodenum oder im mittleren Dünndarm. Mit welchen Transportmechanismen das Pferd im Caecum P_i transportiert konnte bis jetzt noch nicht abschließend geklärt werden und müsste anhand weiterer Studien genauer untersucht werden.

Im Colon konnte eine aktive P_i-Absorption nachgewiesen werden. Diese Untersuchungen decken sich mit vorangegangenen Studien von CEHAK et al. (2012).

5. Diskussion

Ein ähnlicher Mechanismus der P_i -Sekretion findet sich im endogenen P_i -Kreislauf bei Wiederkäuern und bei der Milchsekretion wieder (HUBER et al. 2007).

Bei genauerer Betrachtung der P_i -Sekretion im Speichel adulte Wiederkäuer dient die P_i -Sekretion dem Überleben der im Pansen lokalisierten und für die Verdauung lebensnotwendigen Mikroorganismen (KOMISARCZUK et al. 1987). Zudem werden die, durch Stoffwechselfvorgänge im Pansen, entstehenden Säuren ausreichend durch ein P_i -Puffersysteme gepuffert (MCDOUGALL 1948; KAY 1966; TOMAS 1974; BREVES u. SCHRÖDER 1991).

Auch bei Pferden ist zu vermuten, dass ausreichend P_i für sowohl die Mikroorganismen im Dickdarm als auch für eine Pufferung des Nahrungsbreis oder auch für den Organismus selber zur Verfügung steht.

Dabei verlagert sich das System der P_i -Sekretion bei Pferden, im Vergleich zu Wiederkäuern, in Richtung aboral. Sowohl bei Wiederkäuern als auch bei Pferden muss dabei eine P_i -Sekretion stattfinden. Bei Wiederkäuern findet diese P_i -Sekretion mitunter in den Speicheldrüsen statt (MCDOUGALL 1948; KAY 1966; TOMAS 1974), bei Pferden konnte eine P_i -Sekretion hauptsächlich im Dünndarm detektiert werden (CEHAK et al. 2012, WILKENS et al. 2017). P_i wird dann bei Wiederkäuern, wie auch bei anderen monogastrischen Tieren, im Gegensatz zu Pferden im Dünndarm aufgenommen (CARE 1994; CRAMER 1961; KAYNE et al. 1993; SCHRÖDER et al. 1995; SCHRÖDER et al. 1998; HUBER et al. 2002). Durch die Verlagerung des Systems liegt die Vermutung nahe, dass bei Pferden P_i statt im Dünndarm im Dickdarm aktiv aufgenommen wird, wie in dieser Studie und auch bei Studien von SCHRYVER et al. (1972) und CEHAK et al. (2012) gezeigt werden konnte.

Doch sowohl für die P_i -Sekretion in den Milchdrüsen, bei Wiederkäuern im Speichel als auch die P_i -Sekretion im Dünndarm von Pferden sind die zugrunde liegenden Transportmechanismen noch weitestgehend unbekannt.

Nicht nur bei Pferden, sondern auch bei Wiederkäuern konnte eine aktive P_i -Absorption im proximalen Colon detektiert werden (SCHRÖDER et al. 1995).

Im Gegensatz dazu stehen Ergebnisse anderer Studien an anderen Tierarten, die zeigen, dass das Colon eher eine untergeordnete Rolle bei der P_i -Absorption zu spielen scheint. So ergaben Studien von KAYNE et al. (1993), LEE et al. (1980) und HU et al. (1997), dass bei Ratten im Colon kein aktiver P_i -Transport mehr vorliegt.

5. Diskussion

Dennoch weisen die hier durchgeführten Studien auf eine aktive P_i -Aufnahme im Colon bei Pferden hin, zumal sowohl der PiT1 als auch der NaPi-IIb detektiert werden konnten.

Um genauere Aussagen bezüglich der P_i -Absorption im Pferdedarm treffen zu können, müssten weitere Studien durchgeführt werden. Es stellt sich auch die Frage, ob für das Pferd andere P_i -Transporter im Darm eine höhere Relevanz haben, wie zum Beispiel PiT2.

Die hier durchgeführten Studien zeigen eindeutig, dass die zugrundeliegenden Mechanismen für den P_i -Transport am Darm des Pferdes noch viele Fragen aufwerfen, die in weiteren Studien geklärt werden sollten.

5.4 Schlussfolgerung

Das Duodenum sowie Jejunum wurde als Hauptlokalisation für die intestinale Ca^{2+} -Absorption am equinen Darm identifiziert. Ein transzellulärer Ca^{2+} -Transport wurde im Duodenum, Jejunum und Caecum festgestellt. Ob das Caecum eine Rolle bei der Ca^{2+} -Absorption spielt, bleibt weiterhin fraglich. Die am „klassischen“ Weg der intestinalen transzellulären Ca^{2+} -Absorption beteiligten Strukturen TRPV6, Calbindin D_{9k} und PMCA wurden auf mRNA und Proteinebene nachgewiesen. Ob und inwieweit regulierende Strukturen, wie die Hormone Calcitriol oder Calcidiol sowie das Transportprotein Calmodulin oder regulierende Proteine wie Klotho oder FGF23, die Ca^{2+} - und P_i -Homöostase auch bei Pferden beeinflussen, muss noch weiter geklärt werden.

Es wurden auch Erkenntnisse über den P_i -Transport entlang der Darmachse des Pferdes auf funktioneller und molekularbiologischer Ebene erworben. Es liegt die Vermutung nahe, dass das Pferd im Jejunum eine transzelluläre, aktive P_i -Sekretion und im Dickdarm eine transzelluläre, aktive P_i -Absorption aufweist. Diese Vermutung wurde anhand der durchgeführten Korrelationsstudien mit Mannit bekräftigt. Die Expression des PiT1 konnte entlang der Darmachse detektiert werden mit tendenziell höheren Expressionen im mittleren Dünndarm.

NaPi-IIb konnte auf mRNA Ebene im Dünndarm des Pferdes nicht nachgewiesen werden und eine Hemmung durch Na^+ -Arsenat war nicht möglich. Anzumerken sei, dass der NaPi-IIb bei anderen Tierarten im Dünndarm zu detektieren ist und dort eine wichtige Rolle bei der P_i -

5. Diskussion

Absorption spielt. Um die Vermutung einer P_i -Sekretion im Dünndarm und einer P_i -Absorption im Dickdarm zu bestätigen, sind weitere Untersuchungen nötig.

6. Zusammenfassung

Lisa Solveiga Marholt

Strukturelle und funktionelle Untersuchungen zum intestinalen Ca^{2+} - und P_i -Transport beim Pferd

Ziel dieser Arbeit war es den equinen Ca^{2+} - und P_i -Transport entlang der Darmachse anhand Ussing-Kammer-Versuchen und molekularbiologischer Untersuchungen genauer zu charakterisieren.

Am Beispiel des Duodenums und mittleren Jejunums wurde der Ca^{2+} - sowie P_i -Transport in der Ussing-Kammer am Dünndarm des Pferdes genauer betrachtet. Der Transport im Dickdarm wurde am Beispiel des Caecums und des Colons eingehend untersucht.

Wie auch in vorangegangenen Studien dargelegt, konnten in dieser Studie sehr hohe Ca^{2+} -Fluxraten im Duodenum des Pferdes, gefolgt von geringgradig niedrigeren Fluxraten im Jejunum nachgewiesen werden. Durch Korrelationsstudien mit Mannit wurde zwischen transzellulären und parazellulären Transportprozessen unterschieden. Es stellte sich heraus, dass im Pferd, ebenso wie bei anderen Säugetieren, ein transzellulärer Transport von Ca^{2+} im Duodenum und Jejunum vorliegt. Ein Fokus wurde auch auf das Caecum gelegt, denn auch hier konnte ein transzellulärer Ca^{2+} -Transport aufgezeigt werden. Dieser transzelluläre Transport konnte ebenfalls bei Ratten in vorherigen Studien nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen sind nötig um die Bedeutung des Caecums für den Ca^{2+} -Transport vollständig aufzuklären.

Mit Hilfe der Inhibitoren TAP, RR und Na^+ -Arsenat sollte einerseits der parazelluläre Weg (TAP) und andererseits der transzelluläre Weg für den Ca^{2+} - (RR) und den P_i -Transport (Na^+ -Arsenat) untersucht werden, um genauere Informationen über die verschiedenen Transportkapazitäten zu erhalten. Die Versuchsergebnisse wiesen darauf hin, dass weder TAP, RR noch Na^+ -Arsenat geeignete Inhibitoren beim Pferd sind.

6. Zusammenfassung

Bei genauerer Betrachtung des funktionalen P_i -Transportes konnte eine transzelluläre Sekretion für P_i im Jejunum des Pferdes detektiert werden.

Zu den Strukturen des klassischen Ca^{2+} Transportes gehören TRPV6, Calbindin D_{9k} und PMCA. Dabei ist TRPV6 bekanntermaßen für den transzellulären Transport an der apikalen Seite, Calbindin D_{9k} für den Transport von Ca^{2+} durch die Zelle und PMCA für die Ausschleusung von Ca^{2+} an der basolateralen Seite verantwortlich.

Beim Pferd konnten hohe Expressionsmuster von TRPV6 im Duodenum und proximalen Jejunum detektiert werden.

Expressionsstudien von PMCA waren insbesondere auf Proteinebene im Duodenum und proximalen Jejunum am höchsten, konnten aber auch in den anderen Darmabschnitten nachgewiesen werden. Sie entsprachen im Wesentlichen den Expressionsmustern von Calbindin D_{9k} und TRPV6. Daraus lässt sich schließen, dass das Pferd zwar überwiegend im vorderen Bereich des Dünndarms transzellulär Ca^{2+} in großen Mengen absorbiert, dass aber auch der Rest des Darmes für die Ca^{2+} -Aufnahme genutzt wird.

Die Ergebnisse der Ussing-Kammer-Versuche zeigten für den P_i -Transport Tendenzen einer P_i -Sekretion im Duodenum, eine P_i -Sekretion im Jejunum und eine tendenzielle Absorption im Colon des equinen Darms. Anhand Korrelationsstudien mit Mannit konnte zwischen transzellulären und parazellulären P_i -Transportprozessen unterschieden werden. Die in dieser Studie erlangten Ergebnisse weisen auf eine transzelluläre P_i -Sekretion im Dünndarm, speziell im Jejunum des Pferdes hin.

Expressionsstudien auf mRNA Ebene zeigten, dass P_iT1 entlang der gesamten Darmachse detektiert wurde, wobei die Expression im Ileum am stärksten war und am rechten dorsalen Colon am geringsten.

Der NaP_i-IIb konnte ausschließlich im Dickdarm detektiert werden. Hier zeigte sich eine verstärkte Expression im rechten dorsalen Colon.

Das Pferd scheint bezüglich des P_i -Transports grundlegende Unterschiede im Gegensatz zu anderen Spezies aufzuweisen.

Um genauere Aussagen darüber treffen zu können, bedarf es beim Pferd weiterer Untersuchungen sowohl auf funktioneller wie auch auf molekularbiologischer Ebene.

7. Summary

Lisa Solveiga Marholt

Structural and functional investigations of the Ca²⁺ and Pi transport along the equine intestinal axis

In the present study, Ca²⁺ and P_i transport along the equine intestinal axis were characterized by using the Ussing chamber technique and molecular-biological investigations.

Ca²⁺ and P_i transport in the small intestine were characterized by means of the example of the duodenum and middle jejunum and in the large intestine by means of the example of the caecum and colon in Ussing chamber experiments.

Our results demonstrated high positive net flux rates for Ca²⁺ in the duodenum, followed by slightly lower ones in the jejunum. By using correlation with mannitol, a distinction was made between transcellular and paracellular transport processes. This showed that horses, just like other mammals, seem to have a transcellular transport for Ca²⁺ in the duodenum and jejunum. When also focusing on the caecum transcellular transport was reported as demonstrated in previous studies on rats. Further studies are required to gain more information regarding the importance of the equine caecum for Ca²⁺ transport.

The inhibitors TAP, RR and sodium arsenate were used to block the paracellular and transcellular routes. In general, TAP inhibits paracellular transport, whereas RR inhibits transcellular transport for Ca²⁺ transport and sodium arsenate transcellular transport for P_i transport. However, the results showed that neither TAP, RR nor sodium arsenate seem to be suitable inhibitors for the equine intestine.

A transcellular secretion for P_i in the equine jejunum could be detected by means of the Ussing chamber.

In the present study, molecular biological examinations were undertaken to gain more information concerning the underlying transport system for the “classical” pathway of Ca²⁺ and P_i at mRNA and protein level.

7. Summary

TRPV6, Calbindin D_{9k} and PMCA belong to the structures of classical Ca²⁺ transport. TRPV6 located at the apical side is responsible for transcellular transport, CaBPD_{9k} for the transport of Ca²⁺ through the cell. PMCA, a plasma membrane ATPase, is located at the basolateral side for the outward transfer of Ca²⁺.

High expression patterns of TRPV6 were detected in the duodenum and proximal of jejunum. Up to now protein studies have been inconclusive and must be examined more closely. Expression studies of Calbindin D_{9k} at an mRNA and protein level showed significantly higher expression patterns in the duodenum and proximal jejunum compared to the rest of the intestine. Expression studies of PMCA were highest in the duodenum and proximal jejunum especially at protein level, but could also be detected in the other sections of the intestine. These were predominantly like the expression pattern of Calbindin D_{9k} and TRPV6. It can be concluded that the horse absorbs Ca²⁺ in large quantities, predominantly in the front region of the small intestine, but that the rest of the intestine is also used for Ca²⁺ intake.

The results of the Ussing chamber experiments showed tendencies of a P_i secretion in the duodenum, P_i secretion in the jejunum and a tendency towards P_i absorption in the colon. Based on correlation studies with mannitol it was possible to differentiate between transcellular and paracellular transport processes. The results of this study indicate a transcellular P_i secretion in the equine small intestine, especially in the jejunum.

Ca²⁺ transport along the intestinal axis and P_i transport were characterized by molecular biological investigations based on the specific transport proteins NaPi-IIb and PiT1.

PiT1 was detected in expression studies at mRNA level along the whole intestinal axis, whereby it was detected the most in the ileum and the least in the right dorsal colon.

NaPi-IIb was only detected in the large intestine. The highest expression was detected in the right dorsal colon. The results of the molecular biological investigations and those of the Ussing chamber studies in the present study indicate a transcellular secretion in the equine jejunum. It seems that the horse has fundamental differences regarding P_i transport in contrast to other species.

Further investigations on a functional and a molecular biological level are required to gain more information about the underlying transport processes for the classical pathway of Ca²⁺ and P_i transport in horses.

8. Literaturverzeichnis

ANDERSON, J. M. (2001):

Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport.

News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society 16, 126-130

ANDERSON, P. H., P. D. O'LOUGHLIN, B. K. MAY u. H. A. MORRIS (2004):

Determinants of circulating 1,25-dihydroxyvitamin D₃ levels: the role of renal synthesis and catabolism of vitamin D.

The Journal of steroid biochemistry and molecular biology 89-90, 111-113

ARGENZIO, R. A. u. J. EISEMANN (1996):

Mechanisms of acid injury in porcine gastroesophageal mucosa.

American journal of veterinary research 57, 564-573

AUDRAN, M. u. R. KUMAR (1985):

The Physiology and Pathophysiology of Vitamin D.

Mayo Clinic Proceedings 60, 851-866

BAI, L., J. F. COLLINS u. F. K. GHISHAN (2000):

Cloning and characterization of a type III Na-dependent phosphate cotransporter from mouse intestine.

American journal of physiology. Cell physiology 279, C1135-1143

BAI, X. Y., D. MIAO, D. GOLTZMAN u. A. C. KARAPLIS (2003):

The autosomal dominant hypophosphatemic rickets R176Q mutation in fibroblast growth factor 23 resists proteolytic cleavage and enhances in vivo biological potency.

The Journal of biological chemistry 278, 9843-9849

BAJKA, B. H., C. M. GILLESPIE, C. B. STEEB, L. C. READ u. G. S. HOWARTH (2003):

Applicability of the Ussing chamber technique to permeability determinations in functionally distinct regions of the gastrointestinal tract in the rat.

Scandinavian journal of gastroenterology 38, 732-741

8. Literaturverzeichnis

- BALABAN, R. S., L. J. MANDEL u. D. J. BENOS (1979):
On the cross-reactivity of amiloride and 2,4,6 Triaminopyrimidine (TAP) for the cellular entry and tight junctional cation permeation pathways in epithelia.
The Journal of membrane biology 49, 363-390
- BARLEY, N. F., A. HOWARD, D. O'CALLAGHAN, S. LEGON u. J. R. WALTERS (2001):
Epithelial calcium transporter expression in human duodenum.
American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology 280, G285-290
- BEN-DOV, I. Z., H. GALITZER, V. LAVI-MOSHAYOFF, R. GOETZ, M. KURO-O, M. MOHAMMADI, R. SIRKIS, T. NAVEH-MANY u. J. SILVER (2007):
The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats.
The Journal of clinical investigation 117, 4003-4008
- BENN, B. S., D. AJIBADE, A. PORTA, P. DHAWAN, M. HEDIGER, J.-B. PENG, Y. JIANG, G. T. OH, E.-B. JEUNG u. L. LIEBEN (2008):
Active intestinal calcium transport in the absence of transient receptor potential vanilloid type 6 and calbindin-D9k.
Endocrinology 149, 3196-3205
- BERGWITZ, C. u. H. JUPPNER (2010):
Regulation of phosphate homeostasis by PTH, vitamin D, and FGF23.
Annual review of medicine 61, 91-104
- BERLIN, D. u. I. AROCH (2009):
Concentrations of ionized and total magnesium and calcium in healthy horses: effects of age, pregnancy, lactation, pH and sample type.
Veterinary journal (London, England : 1997) 181, 305-311
- BERNER, W., R. KINNE u. H. MURER (1976):
Phosphate transport into brush-border membrane vesicles isolated from rat small intestine.
The Biochemical journal 160, 467-474
- BLEICH, M., Q. SHAN u. N. HIMMERKUS (2012):
Calcium regulation of tight junction permeability.
Annals of the New York Academy of Sciences 1258, 93-99
- BORKE, J. L., A. CARIDE, A. K. VERMA, J. T. PENNISTON u. R. KUMAR (1989):
Plasma membrane calcium pump and 28-kDa calcium binding protein in cells of rat kidney distal tubules.
The American journal of physiology 257, F842-849
- BOROWITZ, S. M. u. G. S. GRANRUD (1992):
Ontogeny of intestinal phosphate absorption in rabbits.
The American journal of physiology 262, G847-853

8. Literaturverzeichnis

- BRAIN, R. T., H. D. KAY u. P. G. MARSHALL (1928):
Observations on phosphates in blood and on the urinary excretion of phosphates.
The Biochemical journal 22, 628-648
- BRANDENBURGER, M. (2004):
Verlauf der postnatalen Entwicklung des Vitamin D-abhängigen Ca²⁺-Transportes im
Dünndarm von Ferkeln.
[Dissertation] Hannover Stiftung Tierärztl. Hochsch.
- BREIDENBACH, A., C. SCHLUMBOHM u. J. HARMEYER (1998):
Peculiarities of vitamin D and of the calcium and phosphate homeostatic system in horses.
Veterinary research 29, 173-186
- BREVES, G. u. B. SCHRÖDER (1991):
Comparative aspects of gastrointestinal phosphorus metabolism.
Nutrition Research Reviews 4, 125-140
- BRIDGES, R. J., W. RUMMEL u. B. SIMON (1983):
Forskolin induced chloride secretion across the isolated mucosa of rat colon descendens.
Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology 323, 355-360
- BROMMAGE, R., S. C. MILLER, C. B. LANGMAN, R. BOUILLON, R. SMITH u. J. E.
BOURDEAU (1988):
The effects of chronic vitamin D deficiency on the skeleton in the adult rabbit.
Bone 9, 131-139
- BRONNER, F. (1987):
Intestinal calcium absorption: mechanisms and applications.
The Journal of nutrition 117, 1347-1352
- BRONNER, F. (2003a):
Mechanisms and functional aspects of intestinal calcium absorption.
Journal of experimental zoology. Part A, Comparative experimental biology 300, 47-52
- BRONNER, F. (2003b):
Mechanisms of intestinal calcium absorption.
Journal of cellular biochemistry 88, 387-393
- BROWN, A. J., A. DUSSO u. E. SLATOPOLSKY (1999):
Vitamin D.
The American journal of physiology 277, F157-175
- BROWN, E. M. (1991):
Extracellular calcium sensing, regulation of parathyroid cell function, and role of calcium and
other ions as extracellular (first) messengers.
Physiological reviews 71, 371-411

8. Literaturverzeichnis

- BROWN, E. M. u. R. J. MACLEOD (2001):
Extracellular Calcium Sensing and Extracellular Calcium Signaling.
Physiological reviews 81, 239-297
- BUSTIN, S. A. (2000):
Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays.
Journal of molecular endocrinology 25, 169-193
- CABIATI, M., S. RAUCCI, C. CASELLI, M. A. GUZZARDI, A. D'AMICO, T. PRESCIMONE, D. GIANNESI u. S. DEL RY (2012):
Tissue-specific selection of stable reference genes for real-time PCR normalization in an obese rat model.
Journal of molecular endocrinology 48, 251-260
- CARAFOLI, E. (1987):
Intracellular calcium homeostasis.
Annual review of biochemistry 56, 395-433
- CARE, A. D. (1994):
The absorption of phosphate from the digestive tract of ruminant animals.
British Veterinary Journal 150, 197-205
- CEHAK, A., M. BURMESTER, F. GEBUREK, K. FEIGE u. G. BREVES (2009):
Electrophysiological characterization of electrolyte and nutrient transport across the small intestine in horses.
Journal of animal physiology and animal nutrition 93, 287-294
- CEHAK, A., M. R. WILKENS, M. GUSCHLBAUER, N. MROCHEN, B. SCHRÖDER, K. FEIGE u. G. BREVES (2012):
In vitro studies on intestinal calcium and phosphate transport in horses.
Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology 161, 259-264
- CLAPHAM, D. E. (2003):
TRP channels as cellular sensors.
Nature 426, 517-524
- CLAPHAM, D. E., C. MONTELL, G. SCHULTZ u. D. JULIUS (2003):
International Union of Pharmacology. XLIII. Compendium of voltage-gated ion channels: transient receptor potential channels.
Pharmacological reviews 55, 591-596
- CLARKE, L. L. u. M. C. HARLINE (1998):
Dual role of CFTR in cAMP-stimulated HCO₃⁻ secretion across murine duodenum.
The American journal of physiology 274, G718-726

8. Literaturverzeichnis

CRAMER, C. F. (1961):

Progress and rate of absorption of radiophosphorus through the intestinal tract of rats.
Canadian journal of biochemistry and physiology 39, 499-503

DANISI, G., H. MURER u. R. W. STRAUB (1984):

Effect of pH on phosphate transport into intestinal brush-border membrane vesicles.
The American journal of physiology 246, G180-186

DAWSON, D. C. (1977):

Na and Cl transport across the isolated turtle colon: parallel pathways for transmural ion movement.

The Journal of membrane biology 37, 213-233

DIGIROLAMO, D. J., T. L. CLEMENS u. S. KOUSTENI (2012):

The skeleton as an endocrine organ.

Nat Rev Rheumatol 8, 674-683

DOORNENBAL, H., A. K. TONG u. N. L. MURRAY (1988):

Reference values of blood parameters in beef cattle of different ages and stages of lactation.

Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire 52, 99-105

DOORN, D. V., M. SPEK, H. EVERTS, H. WOUTERSE u. A. BEYNEN (2004):

The influence of calcium intake on phosphorus digestibility in mature ponies.

Journal of animal physiology and animal nutrition 88, 412-418

EBASHI, S., M. ENDO u. I. OTSUKI (1969):

Control of muscle contraction.

Quarterly reviews of biophysics 2, 351-384

ELFERS, R. S., W. M. BAYLY, D. F. BROBST, S. M. REED, H. D. LIGGITT, C. D. HAWKER u. D. J. BAYLINK (1986):

Alterations in calcium, phosphorus and C-terminal parathyroid hormone levels in equine acute renal disease.

The Cornell veterinarian 76, 317-329

Elfers, K

ELFERS, K., A. LIESEGANG, M. R. WILKENS, G. BREVES u. A. S. MUSCHER-BANSE (2015a):

Dietary nitrogen and calcium modulate bone metabolism in young goats.

The Journal of steroid biochemistry and molecular biology

ENGLISH, H. F., N. KYPRIANOU u. J. T. ISAACS (1989):

Relationship between DNA fragmentation and apoptosis in the programmed cell death in the rat prostate following castration.

The Prostate 15, 233-250

8. Literaturverzeichnis

- ERBEN, R. G. u. O. ANDRUKHOVA FGF23-Klotho signaling axis in the kidney.
Bone
- ETO, N., M. TOMITA u. M. HAYASHI (2006):
NaPi-mediated transcellular permeation is the dominant route in intestinal inorganic phosphate absorption in rats.
Drug metabolism and pharmacokinetics 21, 217-221
- EVERS, C., H. MURER u. R. KINNE (1978):
Effect of parathyrin on the transport properties of isolated renal brush-border vesicles.
The Biochemical journal 172, 49-56
- FEHER, J. J., C. S. FULLMER u. R. H. WASSERMAN (1992):
Role of facilitated diffusion of calcium by calbindin in intestinal calcium absorption.
The American journal of physiology 262, C517-526
- FLYNN, A. (2003):
The role of dietary calcium in bone health.
The Proceedings of the Nutrition Society 62, 851-858
- FORSTER, I. C., D. D. LOO u. S. ESKANDARI (1999):
Stoichiometry and Na⁺ binding cooperativity of rat and flounder renal type II Na⁺-Pi cotransporters.
The American journal of physiology 276, F644-649
- FRASER, D. R. u. E. KODICEK (1970):
Unique biosynthesis by kidney of a biological active vitamin D metabolite.
Nature 228, 764-766
- FREEMAN, T. C., A. HOWARD, B. S. BENTSEN, S. LEGON u. J. R. WALTERS (1995):
Cellular and regional expression of transcripts of the plasma membrane calcium pump PMCA1 in rabbit intestine.
The American journal of physiology 269, G126-131
- FUCHS, R. u. M. PETERLIK (1980):
Vitamin D-induced phosphate transport in intestinal brush border membrane vesicles.
Biochemical and biophysical research communications 93, 87-92
- FUJITA, H., K. SUGIMOTO, S. INATOMI, T. MAEDA, M. OSANAI, Y. UCHIYAMA, Y. YAMAMOTO, T. WADA, T. KOJIMA, H. YOKOZAKI, T. YAMASHITA, S. KATO, N. SAWADA u. H. CHIBA (2008):
Tight junction proteins claudin-2 and -12 are critical for vitamin D-dependent calcium absorption between enterocytes.
Molecular biology of the cell 19, 1912-1921
- FULLMER, C. S. (1992):
Intestinal calcium absorption: calcium entry.
The Journal of nutrition 122, 644-650

8. Literaturverzeichnis

- FURIE, B. u. B. C. FURIE (2005):
Thrombus formation in vivo.
The Journal of clinical investigation 115, 3355-3362
- GAASBEEK, A. u. A. E. MEINDERS (2005):
Hypophosphatemia: an update on its etiology and treatment.
The American journal of medicine 118, 1094-1101
- GIRAL, H., Y. CALDAS, E. SUTHERLAND, P. WILSON, S. BREUSEGEM, N. BARRY, J. BLAINE, T. JIANG, X. X. WANG u. M. LEVI (2009):
Regulation of rat intestinal Na-dependent phosphate transporters by dietary phosphate.
American journal of physiology. Renal physiology 297, F1466-1475
- GONZALEZ-MARISCAL, L., A. BETANZOS, P. NAVA u. B. E. JARAMILLO (2003):
Tight junction proteins.
Progress in biophysics and molecular biology 81, 1-44
- GUERINI, D. (1998):
The significance of the isoforms of plasma membrane calcium ATPase.
Cell and tissue research 292, 191-197
- GUNTHORPE, M. J., C. D. BENHAM, A. RANDALL u. J. B. DAVIS (2002):
The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels.
Trends in pharmacological sciences 23, 183-191
- HANSARD, S. L. u. M. P. PLUMLEE (1954):
Effects of dietary calcium and phosphorus levels upon the physiological behavior of calcium and phosphorus in the rat.
The Journal of nutrition 54, 17-31
- HARMEYER, J. u. C. SCHLUMBOHM (2004):
Effects of pharmacological doses of Vitamin D3 on mineral balance and profiles of plasma Vitamin D3 metabolites in horses.
The Journal of steroid biochemistry and molecular biology 89-90, 595-600
- HARRINGTON, D. D. u. E. H. PAGE (1983):
Acute vitamin D3 toxicosis in horses: case reports and experimental studies of the comparative toxicity of vitamins D2 and D3.
Journal of the American Veterinary Medical Association 182, 1358-1369
- HERNANDO, N., Z. KARIM-JIMENEZ, J. BIBER u. H. MURER (2001):
Molecular determinants for apical expression and regulatory membrane retrieval of the type IIa Na/Pi cotransporter.
Kidney international 60, 431-435
- HILFIKER, H., O. HATTENHAUER, M. TRAEBERT, I. FORSTER, H. MURER u. J. BIBER (1998):

8. Literaturverzeichnis

Characterization of a murine type II sodium-phosphate cotransporter expressed in mammalian small intestine.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95, 14564-14569

HOENDEROP, J. G., O. DARDENNE, M. VAN ABEL, A. W. VAN DER KEMP, C. H. VAN OS, R. ST-ARNAUD u. R. J. BINDELS (2002a):

Modulation of renal calcium transport protein genes by dietary calcium and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase knockout mice.

FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 16, 1398-1406

HOENDEROP, J. G., A. HARTOG, M. STUIVER, A. DOUCET, P. H. WILLEMS u. R. J. BINDELS (2000):

Localization of the epithelial Ca(2+) channel in rabbit kidney and intestine.

Journal of the American Society of Nephrology : JASN 11, 1171-1178

HOENDEROP, J. G., B. NILIUS u. R. J. BINDELS (2002b):

Molecular mechanism of active Ca²⁺ reabsorption in the distal nephron.

Annual review of physiology 64, 529-549

HOENDEROP, J. G., B. NILIUS u. R. J. BINDELS (2005):

Calcium absorption across epithelia.

Physiological reviews 85, 373-422

HOENDEROP, J. G., A. W. VAN DER KEMP, A. HARTOG, S. F. VAN DE GRAAF, C. H. VAN OS, P. H. WILLEMS u. R. J. BINDELS (1999a):

Molecular identification of the apical Ca²⁺ channel in 1, 25-dihydroxyvitamin D3-responsive epithelia.

The Journal of biological chemistry 274, 8375-8378

HOENDEROP, J. G., R. VENNEKENS, D. MULLER, J. PRENEN, G. DROOGMANS, R. J. BINDELS u. B. NILIUS (2001):

Function and expression of the epithelial Ca²⁺ channel family: comparison of mammalian ECaC1 and 2.

The Journal of physiology 537, 747-761

HOENDEROP, J. G. J., A. W. C. M. VAN DER KEMP, A. HARTOG, C. H. VAN OS, P. H. G. M. WILLEMS u. R. J. M. BINDELS (1999b):

The Epithelial Calcium Channel, ECaC, Is Activated by Hyperpolarization and Regulated by Cytosolic Calcium.

Biochemical and biophysical research communications 261, 488-492

8. Literaturverzeichnis

- HOFFMANN, N., M. THEES u. R. KINNE (1976):
Phosphate transport by isolated renal brush border vesicles.
Pflugers Archiv : European journal of physiology 362, 147-156
- HOLICK, M. F. (1981):
The cutaneous photosynthesis of previtamin D₃: a unique photoendocrine system.
The Journal of investigative dermatology 77, 51-58
- HOLICK, M. F., J. E. FROMMER, S. C. MCNEILL, N. M. RICHTAND, J. W. HENLEY u.
J. T. POTTS, JR. (1977):
Photometabolism of 7-dehydrocholesterol to previtamin D₃ in skin.
Biochemical and biophysical research communications 76, 107-114
- HONG, E. J. u. E. B. JEUNG (2013):
Biological significance of calbindin-D_{9k} within duodenal epithelium.
International journal of molecular sciences 14, 23330-23340
- HU, M. S., L. H. KAYNE, N. JAMGOTCHIAN, H. J. WARD u. D. B. LEE (1997):
Paracellular phosphate absorption in rat colon: a mechanism for enema-induced
hyperphosphatemia.
Mineral and electrolyte metabolism 23, 7-12
- HUANG, C. L. u. O. W. MOE (2011):
Klotho: a novel regulator of calcium and phosphorus homeostasis.
Pflugers Archiv : European journal of physiology 462, 185-193
- HUBER, K., A. MUSCHER u. G. BREVES (2007):
Sodium-dependent phosphate transport across the apical membrane of alveolar epithelium in
caprine mammary gland.
Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology 146,
215-222
- HUBER, K., U. ROESLER, A. MUSCHER, K. HANSEN, I. WIDIYONO, E. PFEFFER u. G.
BREVES (2003):
Ontogenesis of epithelial phosphate transport systems in goats.
American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology 284,
R413-421
- HUBER, K., C. WALTER, B. SCHRÖDER u. G. BREVES (2002):
Phosphate transport in the duodenum and jejunum of goats and its adaptation by dietary
phosphate and calcium.
American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology 283,
R296-302

8. Literaturverzeichnis

- HUG, M. J., T. TAMADA u. R. J. BRIDGES (2003):
CFTR and bicarbonate secretion by [correction of to] epithelial cells.
News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society 18, 38-42
- HWANG, I., E.-M. JUNG, H. YANG, K.-C. CHOI u. E.-B. JEUNG (2011):
Tissue-specific expression of the calcium transporter genes TRPV5, TRPV6, NCX1, and PMCA1b in the duodenum, kidney and heart of Equus caballus.
Journal of Veterinary Medical Science 73, 1437-1444
- JOHNSON, J. A. u. R. KUMAR (1994):
Renal and intestinal calcium transport: roles of vitamin D and vitamin D-dependent calcium binding proteins.
Seminars in nephrology 14, 119-128
- JUNGBLUTH, H. u. U. BINSWANGER (1989):
Unidirectional duodenal and jejunal calcium and phosphorus transport in the rat: effects of dietary phosphorus depletion, ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate and 1,25 dihydroxycholecalciferol.
Research in experimental medicine. Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin einschliesslich experimenteller Chirurgie 189, 439-449
- KARBACH, U. (1992):
Paracellular calcium transport across the small intestine.
The Journal of nutrition 122, 672-677
- KARBACH, U. u. H. FELDMEIER (1993):
The cecum is the site with the highest calcium absorption in rat intestine.
Digestive diseases and sciences 38, 1815-1824
- KARIM-JIMENEZ, Z., N. HERNANDO, J. BIBER u. H. MURER (2001):
Molecular determinants for apical expression of the renal type IIa Na⁺/Pi-cotransporter.
Pflügers Archiv : European journal of physiology 442, 782-790
- KAUNE, R., I. KASSIANOFF, B. SCHRÖDER u. J. HARMEYER (1992):
The effects of 1,25-dihydroxyvitamin D-3 deficiency on Ca⁽²⁺⁾-transport and Ca⁽²⁺⁾-uptake into brush-border membrane vesicles from pig small intestine.
Biochimica et biophysica acta 1109, 187-194
- KATOH, M. u. M. KATOH (2006):
FGF signaling network in the gastrointestinal tract (review).
International journal of oncology 29, 163-168

8. Literaturverzeichnis

KAVANAUGH, M. P., D. G. MILLER, W. ZHANG, W. LAW, S. L. KOZAK, D. KABAT u. A. D. MILLER (1994):

Cell-surface receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91, 7071-7075

KAY, R. N. (1966):

The influence of saliva on digestion in ruminants.

World review of nutrition and dietetics 6, 292-325

KAYNE, L. H., D. Z. D'ARGENIO, J. H. MEYER, M. S. HU, N. JAMGOTCHIAN u. D. B. LEE (1993):

Analysis of segmental phosphate absorption in intact rats. A compartmental analysis approach.

The Journal of clinical investigation 91, 915-922

KESSLER, M. A., L. LAMM, K. JARNAGIN u. H. F. DELUCA (1986):

1,25-Dihydroxyvitamin D₃-stimulated mRNAs in rat small intestine.

Archives of biochemistry and biophysics 251, 403-412

KHANAL, R. C. u. I. NEMERE (2008):

Regulation of intestinal calcium transport.

Annual review of nutrition 28, 179-196

KNOX, F. G., H. OSSWALD, G. R. MARCHAND, W. S. SPIELMAN, J. A. HAAS, T. BERNDT u. S. P. YOUNGBERG (1977):

Phosphate transport along the nephron.

The American journal of physiology 233, F261-268

KOMISARCZUK S., R. J. Merry und A. B. McAllan (1987)

Effect of different levels of phosphorus on rumen microbial fermentation and synthesis determined using a continuous culture technique.

Br. J. Nutr. 57 (2), 279-290

KOTTRA, G. u. E. FROMTER (1983):

Functional properties of the paracellular pathway in some leaky epithelia.

The Journal of experimental biology 106, 217-229

KRAFT, W. (2005):

Klinische labordiagnostik in der tiermedizin.

Schattauer Verlag,

KREBS, E. G. u. J. A. BEAVO (1979):

Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes.

Annual review of biochemistry 48, 923-959

8. Literaturverzeichnis

- KREBS, J., M. VASAK, A. SCARPA u. E. CARAFOLI (1987):
Conformational differences between the E1 and E2 states of the calcium adenosinetriphosphatase of the erythrocyte plasma membrane as revealed by circular dichroism and fluorescence spectroscopy.
Biochemistry 26, 3921-3926
- KUMAR, R. (1995):
Calcium transport in epithelial cells of the intestine and kidney.
Journal of cellular biochemistry 57, 392-398
- KUTUZOVA, G. D. u. H. F. DELUCA (2004):
Gene expression profiles in rat intestine identify pathways for 1,25-dihydroxyvitamin D(3) stimulated calcium absorption and clarify its immunomodulatory properties.
Archives of biochemistry and biophysics 432, 152-166
- LACHENMAIER-CURRLE, U. u. J. HARMEYER (1988):
Intestinal absorption of calcium in newborn piglets. Role of vitamin D.
Biology of the neonate 53, 327-335
- LACHENMAIER-CURRLE, U. u. J. HARMEYER (1989):
Placental transport of calcium and phosphorus in pigs.
Journal of perinatal medicine 17, 127-136
- LARSSON, D. u. I. NEMERE (2002):
Vectorial Transcellular Calcium Transport in Intestine: Integration of Current Models.
Journal of biomedicine & biotechnology 2, 117-119
- LEE, D. B., M. W. WALLING, U. GAFTER, V. SILIS u. J. W. COBURN (1980):
Calcium and inorganic phosphate transport in rat colon: dissociated response to 1,25-dihydroxyvitamin D₃.
The Journal of clinical investigation 65, 1326-1331
- LEONHARD-MAREK, S., J. HEMPE, B. SCHRÖDER u. G. BREVES (2009):
Electrophysiological characterization of chloride secretion across the jejunum and colon of pigs as affected by age and weaning.
Journal of Comparative Physiology B 179, 883-896
- LISOWSKI, P., M. PIERZCHALA, J. GOSCIK, C. S. PAREEK u. L. ZWIERZCHOWSKI (2008):
Evaluation of reference genes for studies of gene expression in the bovine liver, kidney, pituitary, and thyroid.
Journal of applied genetics 49, 367-372

8. Literaturverzeichnis

- LOGHMAN-ADHAM, M. (1997):
Adaptation to changes in dietary phosphorus intake in health and in renal failure.
The Journal of laboratory and clinical medicine 129, 176-188
- MCDOUGALL, E. (1948):
Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva.
Biochemical Journal 43, 99
- MINEO, H., H. HARA, H. KIKUCHI, H. SAKURAI u. F. TOMITA (2001):
Various indigestible saccharides enhance net calcium transport from the epithelium of the small and large intestine of rats in vitro.
The Journal of nutrition 131, 3243-3246
- MONTELL, C., L. BIRNBAUMER, V. FLOCKERZI, R. J. BINDELS, E. A. BRUFORD, M. J. CATERINA, D. E. CLAPHAM, C. HARTENECK, S. HELLER, D. JULIUS, I. KOJIMA, Y. MORI, R. PENNER, D. PRAWITT, A. M. SCHARENBERG, G. SCHULTZ, N. SHIMIZU u. M. X. ZHU (2002):
A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels.
Molecular cell 9, 229-231
- MORENO, J. H. (1975a):
Blockage of gallbladder tight junction cation-selective channels by 2,4,6-triaminopyrimidinium (TAP).
The Journal of general physiology 66, 97-115
- MORENO, J. H. (1975b):
Routes of nonelectrolyte permeability in gallbladder. Effects of 2,4,6-triaminopyrimidinium (TAP).
The Journal of general physiology 66, 117-128
- MUELLER, O., S. LIGHTFOOT u. A. SCHRÖDER (2004):
RNA integrity number (RIN)—standardization of RNA quality control.
Agilent application note, publication 1-8
- MURER, H., I. FORSTER u. J. BIBER (2004):
The sodium phosphate cotransporter family SLC34.
Pflugers Archiv : European journal of physiology 447, 763-767
- MURER, H., I. FORSTER, N. HERNANDO, G. LAMBERT, M. TRAEBERT u. J. BIBER (1999):
Posttranscriptional regulation of the proximal tubule NaPi-II transporter in response to PTH and dietary P(i).
The American journal of physiology 277, F676-684

8. Literaturverzeichnis

- MUSCHER, A., G. BREVES u. K. HUBER (2009):
Modulation of apical Na⁺/Pi cotransporter type IIb expression in epithelial cells of goat mammary glands.
Journal of animal physiology and animal nutrition 93, 477-485
- MUSCHER-BANSE, A. S., L. MARHOLT, N. EIGENDORF, M. R. WILKENS, B. SCHRÖDER, G. BREVES u. A. CEHAK (2017):
Segmental diversity of phosphate transport along the intestinal axis in horses.
Journal of animal science 95, 165-172
- NELLANS, H. N. u. R. S. GOLDSMITH (1981):
Transepithelial calcium transport by rat cecum: high-efficiency absorptive site.
The American journal of physiology 240, G424-431
- NELLANS, H. N. u. D. V. KIMBERG (1978):
Cellular and paracellular calcium transport in rat ileum: effects of dietary calcium.
The American journal of physiology 235, E726-737
- NICHOLSON, G. C., J. M. MOSELEY, P. M. SEXTON, F. A. MENDELSON u. T. J. MARTIN (1986):
Abundant calcitonin receptors in isolated rat osteoclasts. Biochemical and autoradiographic characterization.
The Journal of clinical investigation 78, 355-360
- NIGGLI, V., E. SIGEL u. E. CARAFOLI (1982):
The purified calcium pump of human erythrocyte membranes catalyzes an electroneutral calcium-H⁺ exchange in reconstituted liposomal systems.
The Journal of biological chemistry 257, 2350-2356
- NIJENHUIS, T., J. G. HOENDEROP, A. W. VAN DER KEMP u. R. J. BINDELS (2003):
Localization and regulation of the epithelial calcium channel TRPV6 in the kidney.
Journal of the American Society of Nephrology : JASN 14, 2731-2740
- NILIUS, B., J. PRENEN, R. VENNEKENS, J. G. J. HOENDEROP, R. J. M. BINDELS u. G. DROOGMANS (2001):
Modulation of the epithelial calcium channel, ECaC, by intracellular calcium.
Cell Calcium 29, 417-428
- OKANO, T., M. YASUMURA, K. MIZUNO u. T. KOBAYASHI (1977):
Photochemical conversion of 7-dehydrocholesterol into vitamin D3 in rat skins.
Journal of nutritional science and vitaminology 23, 165-168
- OLAH, Z., C. LEHEL, W. B. ANDERSON, M. V. EIDEN u. C. A. WILSON (1994):
The cellular receptor for gibbon ape leukemia virus is a novel high affinity sodium-dependent phosphate transporter.
The Journal of biological chemistry 269, 25426-25431

8. Literaturverzeichnis

- PEDERSEN, P. L. u. E. CARAFOLI (1987):
Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties, and significance to cell function.
Trends in Biochemical Sciences 12, 146-150
- PENG, J. B., X. Z. CHEN, U. V. BERGER, P. M. VASSILEV, H. TSUKAGUCHI, E. M. BROWN u. M. A. HEDIGER (1999):
Molecular cloning and characterization of a channel-like transporter mediating intestinal calcium absorption.
The Journal of biological chemistry 274, 22739-22746
- PEREZ, A. V., G. PICOTTO, A. R. CARPENTIERI, M. A. RIVOIRA, M. E. PERALTA LOPEZ u. N. G. TOLOSA DE TALAMONI (2008):
Minireview on regulation of intestinal calcium absorption. Emphasis on molecular mechanisms of transcellular pathway.
Digestion 77, 22-34
- PICCIONE, G., A. ASSENZA, F. FAZIO, D. BERGERO u. G. CAOLA (2008):
Daily rhythms of serum vitamin D-metabolites, calcium and phosphorus in horses.
Acta Veterinaria Brno 77, 151-157
- PONCHON, G., A. L. KENNAN u. H. F. DELUCA (1969):
"Activation" of vitamin D by the liver.
The Journal of clinical investigation 48, 2032-2037
- POULSEN, J. H., H. FISCHER, B. ILLEK u. T. E. MACHEN (1994):
Bicarbonate conductance and pH regulatory capability of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91, 5340-5344
- QUAMME, G. A. (1985):
Phosphate transport in intestinal brush-border membrane vesicles: effect of pH and dietary phosphate.
The American journal of physiology 249, G168-176
- RADANOVIC, T., C. A. WAGNER, H. MURER u. J. BIBER (2005):
Regulation of intestinal phosphate transport. I. Segmental expression and adaptation to low-P(i) diet of the type IIb Na(+)-P(i) cotransporter in mouse small intestine.
American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology 288, G496-500
- RAMASAMY, I. (2006):
Recent advances in physiological calcium homeostasis.
Clinical chemistry and laboratory medicine 44, 237-273
- RASMUSSEN, H., P. JENSEN, W. LAKE u. D. B. GOODMAN (1976):
Calcium ion as second messenger.
Clinical endocrinology 5 Suppl, 11s-27s

8. Literaturverzeichnis

- REIST, M., M. W. PFAFFL, C. MOREL, M. MEYLAN, G. HIRSBRUNNER, J. W. BLUM u. A. STEINER (2003):
Quantitative mRNA analysis of eight bovine 5-HT receptor subtypes in brain, abomasum, and intestine by real-time RT-PCR.
Journal of receptor and signal transduction research 23, 271-287
- RIMINUCCI, M., M. T. COLLINS, N. S. FEDARKO, N. CHERMAN, A. CORSI, K. E. WHITE, S. WAGUESPACK, A. GUPTA, T. HANNON, M. J. ECONS, P. BIANCO u. P. GEHRON ROBEY (2003):
FGF-23 in fibrous dysplasia of bone and its relationship to renal phosphate wasting.
The Journal of clinical investigation 112, 683-692
- ROOT, A. W. u. H. E. HARRISON (1976a):
Recent advances in calcium metabolism. I. Mechanisms of calcium homeostasis.
The Journal of pediatrics 88, 1-18
- ROOT, A. W. u. H. E. HARRISON (1976b):
Recent advances in calcium metabolism. II. Disorders of calcium homeostasis.
The Journal of pediatrics 88, 177-199
- ROURKE, K. M., S. COE, C. W. KOHN, T. J. ROSOL, F. J. MENDOZA u. R. E. TORIBIO (2010):
Cloning, comparative sequence analysis and mRNA expression of calcium-transporting genes in horses.
General and comparative endocrinology 167, 6-10
- SAITO, H., K. KUSANO, M. KINOSAKI, H. ITO, M. HIRATA, H. SEGAWA, K. MIYAMOTO u. N. FUKUSHIMA (2003):
Human fibroblast growth factor-23 mutants suppress Na⁺-dependent phosphate co-transport activity and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ production.
The Journal of biological chemistry 278, 2206-2211
- SASAMURA, S., K. FURUKAWA, M. SHIRATORI, S. MOTOMURA u. Y. OHIZUMI (2002):
Antisense-inhibition of plasma membrane calcium pump induces apoptosis in vascular smooth muscle cells.
Japanese journal of pharmacology 90, 164-172
- SCHARRER, E. (1985):
Phosphate absorption at different intestinal sites in the developing lamb.
Quarterly journal of experimental physiology (Cambridge, England) 70, 615-621
- SCHATZMANN, H. J. Calciumaufnahme und Abgabe am Darmmuskel des Meerschweinchens.
Pflüger's Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere 274, 295-310

8. Literaturverzeichnis

- SCHOEBER, J. P., J. G. HOENDEROP u. R. J. BINDELS (2007):
Concerted action of associated proteins in the regulation of TRPV5 and TRPV6.
Biochemical Society transactions 35, 115-119
- SCHOENMAKERS, I., P. GOUSIAS, K. S. JONES u. A. PRENTICE (2016):
Prediction of winter vitamin D status and requirements in the UK population based on 25(OH) vitamin D half-life and dietary intake data.
The Journal of steroid biochemistry and molecular biology
- SCHRÖDER, B. u. G. BREVES (2006):
Mechanisms and regulation of calcium absorption from the gastrointestinal tract in pigs and ruminants: comparative aspects with special emphasis on hypocalcemia in dairy cows.
Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases 7, 31-41
- SCHRÖDER, B., W. GOEBEL, K. HUBER u. G. BREVES (2001):
No effect of vitamin D3 treatment on active calcium absorption across ruminal epithelium of sheep.
Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine 48, 353-363
- SCHRÖDER, B., O. HATTENHAUER u. G. BREVES (1998):
Phosphate transport in pig proximal small intestines during postnatal development: lack of modulation by calcitriol.
Endocrinology 139, 1500-1507
- SCHRÖDER, B., H. KAPPNER, K. FAILING, E. PFEFFER u. G. BREVES (1995):
Mechanisms of intestinal phosphate transport in small ruminants.
The British journal of nutrition 74, 635-648
- SCHRÖDER, B., R. KAUNE, C. SCHLUMBOHM, G. BREVES u. J. HARMEYER (1993):
Evidence for vitamin D-independent active calcium absorption in newborn piglets.
Calcified tissue international 52, 305-309
- SCHRÖDER, B., I. RITTMANN, E. PFEFFER u. G. BREVES (1997):
In vitro studies on calcium absorption from the gastrointestinal tract in small ruminants.
Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology 167, 43-51
- SCHRÖDER, A., O. MUELLER, S. STOCKER, R. SALOWSKY, M. LEIBER, M. GASSMANN, S. LIGHTFOOT, W. MENZEL, M. GRANZOW u. T. RAGG (2006):
The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements.
BMC molecular biology 7, 3

8. Literaturverzeichnis

SCHRÖDER, B., M. R. WILKENS, G. E. RICKEN, S. LEONHARD-MAREK, D. R. FRASER u. G. BREVES (2015):

Calcium transport in bovine rumen epithelium as affected by luminal Ca concentrations and Ca sources.

Physiological reports 3,

SCHRYVER, H., P. CRAIG, H. HINTZ, D. HOGUE u. J. LOWE (1970a):

The site of calcium absorption in the horse.

Journal of Nutrition 100, 1127-1131

SCHRYVER, H. F. (1975):

Intestinal absorption of calcium and phosphorus by horses.

Journal of the South African Veterinary Association 46, 39-45

SCHRYVER, H. F., P. H. CRAIG u. H. F. HINTZ (1970b):

Calcium metabolism in ponies fed varying levels of calcium.

The Journal of nutrition 100, 955-964

SCHRYVER, H. F., H. F. HINTZ u. P. H. CRAIG (1971):

Phosphorus metabolism in ponies fed varying levels of phosphorus.

The Journal of nutrition 101, 1257-1263

SCHRYVER, H. F., H. F. HINTZ, P. H. CRAIG, D. E. HOGUE u. J. E. LOWE (1972):

Site of phosphorus absorption from the intestine of the horse.

The Journal of nutrition 102, 143-147

SCHULTZ, S. G. u. R. ZALUSKY (1964):

ION TRANSPORT IN ISOLATED RABBIT ILEUM. I. SHORT-CIRCUIT CURRENT AND NA FLUXES.

J Gen Physiol 47, 567-584

SEAMON, K. u. J. W. DALY (1981a):

Activation of adenylate cyclase by the diterpene forskolin does not require the guanine nucleotide regulatory protein.

The Journal of biological chemistry 256, 9799-9801

SEAMON, K. B. u. J. W. DALY (1981b):

Forskolin: a unique diterpene activator of cyclic AMP-generating systems.

Journal of cyclic nucleotide research 7, 201-224

SEIDLER, U., I. BLUMENSTEIN, A. KRETZ, D. VIELLARD-BARON, H. ROSSMANN, W. H. COLLEDGE, M. EVANS, R. RATCLIFF u. M. GREGOR (1997):

A functional CFTR protein is required for mouse intestinal cAMP-, cGMP- and Ca(2+)-dependent HCO₃⁻ secretion.

The Journal of physiology 505 (Pt 2), 411-423

8. Literaturverzeichnis

SHIBER, J. R. u. A. MATTU (2002):

Serum phosphate abnormalities in the emergency department.
The Journal of emergency medicine 23, 395-400

SHIRAZI-BEECHEY, S. P., J. P. GORVEL u. R. B. BEECHEY (1988a):

Intestinal phosphate transport: localization, properties and identification, a progress report.
Progress in clinical and biological research 252, 59-64

SHIRAZI-BEECHEY, S. P., J. P. GORVEL u. R. B. BEECHEY (1988b):

Phosphate transport in intestinal brush-border membrane.
Journal of bioenergetics and biomembranes 20, 273-288

SLEPCHENKO, B. M. u. F. BRONNER (2001):

Modeling of transcellular Ca transport in rat duodenum points to coexistence of two mechanisms of apical entry.
American journal of physiology. Cell physiology 281, C270-281

SPIEGEL, S., M. PHILLIPPER, H. ROSSMANN, B. RIEDERER, M. GREGOR u. U. SEIDLER (2003):

Independence of apical Cl⁻/HCO₃⁻ exchange and anion conductance in duodenal HCO₃⁻ secretion.
American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology 285, G887-897

SPREKELER, N., M. P. KOWALEWSKI u. A. BOOS (2012):

TRPV6 and Calbindin-D_{9k}-expression and localization in the bovine uterus and placenta during pregnancy.
Reproductive biology and endocrinology : RB&E 10, 66

SPREKELER, N., T. MULLER, M. P. KOWALEWSKI, A. LIESEGANG u. A. BOOS (2011):
Expression patterns of intestinal calcium transport factors and ex-vivo absorption of calcium in horses.

BMC veterinary research 7, 65

TANG, V. W. u. D. A. GOODENOUGH (2003):

Paracellular ion channel at the tight junction.
Biophysical journal 84, 1660-1673

TOMAS, F. (1974):

The influence of parathyroid hormone on the secretion of phosphate by the parotid salivary gland of sheep.
Quarterly journal of experimental physiology and cognate medical sciences 59, 269-281

TOMBES, R. M. u. G. G. BORISY (1989):

Intracellular free calcium and mitosis in mammalian cells: anaphase onset is calcium modulated, but is not triggered by a brief transient.
The Journal of cell biology 109, 627-636

8. Literaturverzeichnis

TORIBIO, R. E. (2007):

Essentials of equine renal and urinary tract physiology.

The Veterinary clinics of North America. Equine practice 23, 533-561, v

TORIBIO, R. E. (2011a):

Disorders of Calcium and Phosphate Metabolism in Horses.

Veterinary Clinics of North America: Equine Practice 27, 129-147

TORIBIO, R. E. (2011b):

Disorders of calcium and phosphate metabolism in horses.

The Veterinary clinics of North America. Equine practice 27, 129-147

TORIBIO, R. E., C. W. KOHN, C. C. CAPEN u. T. J. ROSOL (2003):

Parathyroid hormone (PTH) secretion, PTH mRNA and calcium-sensing receptor mRNA expression in equine parathyroid cells, and effects of interleukin (IL)-1, IL-6, and tumor necrosis factor-alpha on equine parathyroid cell function.

Journal of molecular endocrinology 31, 609-620

TUDPOR, K., J. TEERAPORNPUNTAKIT, W. JANTARAJIT, N. KRISHNAMRA u. N. CHAROENPHANDHU (2008):

1,25-dihydroxyvitamin D(3) rapidly stimulates the solvent drag-induced paracellular calcium transport in the duodenum of female rats.

The journal of physiological sciences : JPS 58, 297-307

ULLRICH, K. J., E. FROMTER u. H. MURER (1979):

[Principles of epithelial transport in the kidney and intestines].

Klinische Wochenschrift 57, 977-991

USSING, H. H. u. K. ZERAHN (1951):

Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin.

Acta physiologica Scandinavica 23, 110-127

VAN ABEL, M., J. G. HOENDEROP, A. W. VAN DER KEMP, J. P. VAN LEEUWEN u. R. J. BINDELS (2003):

Regulation of the epithelial calcium channels in small intestine as studied by quantitative mRNA detection.

American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology 285, G78-85

VAN ITALLIE, C. M. u. J. M. ANDERSON (2006):

Claudins and epithelial paracellular transport.

Annual review of physiology 68, 403-429

8. Literaturverzeichnis

VERVUERT, I., M. COENEN, U. WEDEMEYER, C. CHROBOK, J. HARMEYER u. H. P. SPORLEDER (2002):

Calcium homeostasis and intact plasma parathyroid hormone during exercise and training in young Standardbred horses.

Equine veterinary journal 34, 713-718

VERVUERT, I., K. STANIK u. M. COENEN (2006):

Effects of different levels of calcium and phosphorus intake on calcium homeostasis in exercising horses.

Equine veterinary journal. Supplement 659-663

VILLA-BELLOSTA, R., Y. E. BOGAERT, M. LEVI u. V. SORRIBAS (2007):

Characterization of phosphate transport in rat vascular smooth muscle cells: implications for vascular calcification.

Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology 27, 1030-1036

WALTERS, J. R., S. BALESARIA, K. M. CHAVELE, V. TAYLOR, J. L. BERRY, U. KHAIR, N. F. BARLEY, D. A. VAN HEEL, J. FIELD, J. O. HAYAT, A. BHATTACHARJEE, R. JEFFERY u. R. POULSOM (2006):

Calcium channel TRPV6 expression in human duodenum: different relationships to the vitamin D system and aging in men and women.

Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research 21, 1770-1777

WALTERS, J. R., A. HOWARD, M. V. CHARPIN, K. C. GNIECKO, P. BRODIN, E. THULIN u. S. FORSEN (1990):

Stimulation of intestinal basolateral membrane calcium-pump activity by recombinant synthetic calbindin-D_{9k} and specific mutants.

Biochemical and biophysical research communications 170, 603-608

WANG, T. u. M. J. BROWN (1999):

mRNA quantification by real time TaqMan polymerase chain reaction: validation and comparison with RNase protection.

Analytical biochemistry 269, 198-201

WARREN, H. B., N. C. LAUSEN, G. V. SEGRE, G. EL-HAJJ u. E. M. BROWN (1989):

Regulation of calciotropic hormones in vivo in the New Zealand white rabbit.

Endocrinology 125, 2683-2690

WASSERMAN, R. H. (1968): Calcium transport by the intestine: A model and comment on vitamin D action.

Calcified Tissue Research 2, 301-313

WASSERMAN, R. H., J. S. CHANDLER, S. A. MEYER, C. A. SMITH, M. E. BRINDAK, C. S. FULLMER, J. T. PENNISTON u. R. KUMAR (1992):

Intestinal calcium transport and calcium extrusion processes at the basolateral membrane.

The Journal of nutrition 122, 662-671

8. Literaturverzeichnis

- WIEDEMANN, C., H. SCHULZ u. B. WEBER (2004):
Quantitative real-time PCR-eine frage der normalisierung.
BIOSpektrum 1, 99-102
- WILKENS, M. R., C. KUNERT-KEIL, H. BRINKMEIER u. B. SCHRÖDER (2009):
Expression of calcium channel TRPV6 in ovine epithelial tissue.
Veterinary journal (London, England : 1997) 182, 294-300
- WILKENS, M. R., L. MARHOLT, N. EIGENDORF, A. S. MUSCHER-BANSE, K. FEIGE,
B. SCHRÖDER, G. BREVES u. A. CEHAK (2017):
Trans- and paracellular calcium transport along the small and large intestine in horses.
Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology 204,
157-163
- WILKENS, M. R., N. MROCHEN, G. BREVES u. B. SCHRÖDER (2011):
Gastrointestinal calcium absorption in sheep is mostly insensitive to an alimentary induced
challenge of calcium homeostasis.
Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology 158,
199-207
- WILLSKY, G. R. u. M. H. MALAMY (1980):
Effect of arsenate on inorganic phosphate transport in Escherichia coli.
Journal of bacteriology 144, 366-374
- YAMASHITA, T. (2005):
Structural and biochemical properties of fibroblast growth factor 23.
Therapeutic apheresis and dialysis : official peer-reviewed journal of the International Society
for Apheresis, the Japanese Society for Apheresis, the Japanese Society for Dialysis Therapy
9, 313-318
- YAMASHITA, T., M. YOSHIOKA u. N. ITOH (2000):
Identification of a novel fibroblast growth factor, FGF-23, preferentially expressed in the
ventrolateral thalamic nucleus of the brain.
Biochemical and biophysical research communications 277, 494-498
- YANG, J., J. HOU, C. FARQUHARSON, Z. ZHOU, Y. DENG, L. WANG u. Y. YU (2011):
Localisation and expression of TRPV6 in all intestinal segments and kidney of laying hens.
British poultry science 52, 507-516
- (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> Stand 30.07.2017)

8. Anhang

A. Firmenverzeichnis

Firma	Anschrift
Agilent technologies	Herrenberger Str. 130, 71034 Böblingen
Alomone Labs	Har Hotzvim Hi-Tech Park, P.O.Box 4287 Jerusalem 9104201, Israel.
Beckman Coulter GmbH	Europark Fichtenhain B 13, 47807 Krefeld
Bio-Rad Laboratories GmbH	Heidemannstrasse 164, 80939 München
B. Braun Melsungen AG	D-34209 Melsungen
Carl Zeiss AG	Carl-Zeiss-Straße 22, 73447 Oberkochen
Dako Deutschland GmbH	Stresemannstraße 161, 22769 Hamburg
Enzo® Life Sciences, Inc.	Shanghai (S): Flat J, 10/F., Block B, Yue Da InteRNAtional Plaza, 1118 Chang Shou Road, CN-20042
Eppendorf AG	Barkhausenweg 1, 22339 Hamburg
GE Healthcare Europe GmbH	Munzinger Str. 5, 79111 Freiburg
GraphPad Software, Inc.	2236 Avenida de la Playa, La Jolla, CA 92037 USA
Heraeus Holding GmbH	Heraeusstraße 12-14, 63450 Hanau
Merck KGaA	Frankfurter Straße 25, 64293 Darmstadt
Orsatec GmbH	Max-Fischer-Straße 11, 86399 Bobingen
PEQLAB Biotechnologie GmbH	Carl-Thiersch-Str. 2b, D-91052 Erlangen
Perkin Elmer LHS,	Ferdinand-Porsche-Ring 17, 63110 Rodgau- Jügesheim
Promega GmbH	Schildkrötstraße 15, 68199 Mannheim
Qiagen GmbH	Qiagen Straße 1, 40724 Hilden
Roche Applied Science	Sandhofer Str. 116, 68305 Mannheim
Roche Molecular Systems, Inc.	1080 U.S. 202, Branchburg, NJ 08876 USA
ROTH	Schoemperlenstraße 3-5, 76185 Karlsruhe
Carl Roth GmbH & Co. KG	
Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Bergheimer Str. 89-2, 69115 Heidelberg
Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Riedstrasse 2, 89555 Steinheim
swant Swiss antibodies	Postfach 327, 1723 Marly, Schweiz
Thermo Fisher Scientific, Inc.	Fisher Scientific GmbH Im Heiligen Feld 17 58239 Schwerte

B. Hergestellte Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
Anodenpuffer	0,1 mol/l Tris pH 8,9
Blotting-Puffer	25 mmol/l Tris-Base 192 mmol/l Glycin 20% v/v Methanol pH 8,1 - 8,4
Coomassie Brilliantblau Färbelösung	0,1% Coomassie Brilliantblau R250 20% Methanol (od Ethanol) 10% Essigsäure auf 1l Aqua dest
Cytosolpräparationspuffer	10 mmol/l Tris-HCL 0,5 mmol/l EDTA 0,1% SDS 0,1 mmol/l PMSF: unmittelbar vor Anwendung dazugeben pH 7,4
Citratpuffer	Stammlösung A: 0,1 M Citronensäure 2,1 % Citronensäure T-hydrat (21 g) 1 l Aqua dest. Stammlösung B: 0,1 M NaCitrat 29,41 g tri-Natriumcitrat*2H ₂ O Gebrauchslösung: 18 ml Stammlösung A 82 ml Stammlösung B 900 ml Aqua dest
Denaturierungspuffer "Hannover-Rezept" 1-2fach Konzentriert	1 ml Glycerin 3 ml SDS [10%] 1,25 ml Sammelgelpuffer 0,5 ml gesättigte Bromphenolblau-Lösung Ad 4,25 ml A. bidest. (steril)

8. Anhang

Denaturierungspuffer „Lämmli“	4 ml SDS (10%) 2 ml Glycerin (100 %) 1 ml Tris HCl (100 mM) pH 6,8 0,5 ml gesättigte Bromphenolblaulösung Ad 3,5 ml A. bidest.
Dreifach Gelpuffer	3 mmol/l Tris-base 1 M´mmol/l HCl SDS (0,3 %) pH 8,45
Elektrophoresepuffer	25 mmol/l Tris, basisch 192 mmol/l Glycin 0,1% SDS
Entfärbelösung	20% Methanol (od Ethanol) 10% Eisessig auf 1l Aqua dest
Hämalaun	nach Mayer Firma Merck
Homogenisationspuffer Gesamtmembranpräp.	20 mmol/l Tris base 250 mmol/l Saccharose 5 mmol/l EGTA 5 mmol/l MgSO ₄ ·7H ₂ O pH 7,5 A. dest.
Homogenisationspuffer Apikalmembranpräp.	2 mmol/l Tris base 50 mmol/l Mannit pH 7,1 A. dest.
Indian Ink Färbelösung	97,5 % PBST 2 % Essigsäure 0,5 % Tinte (Pelikan 4001)
Kathodenpuffer	0,1 mmol/l Tris base 0,1 mmol/l Tricin 0,1% SDS
LB-Medium	2,5g Hefeextrakt 5,0g Trypton 5,0g NaCl 7,5g Agar 1l aqua. Bidest
Lade Puffer (nach Jens Herrmann)	50 % w/v Glycerin (100 %) 10 % Bromphenolblau (10 mg/ml) 1% 1 M Tris/HCl pH 8,0 24% 0,5 M EDTA 15 % autoklaviert H ₂ O
Mukosaler Puffer	NaCl 113,6 mmol/l KCl 5,4 mmol/l

8. Anhang

	<p>HCl 0,2 mmol/l MgCl₂·6H₂O 1,2 mmol/l CaCl₂·2H₂O 1,2 mmol/l NaHCO₃ 21,0 mmol/l Na₂HPO₄·2H₂O 1,2 mmol/l Mannit 1,2 mmol/l Hepes 20,0 mmol/l 1nNaOH 6,0 mmol/l</p>
PBS	<p>137 mmol/l NaCl 3 mmol/l KCl 2 mmol/l KH₂PO₄ 9 mmol/l Na₂HPO₄ pH 7,35 bis 7,4 gesamt 5l Aqua. dest</p>
PBS (Immunhistologie)	<p>7,8 g NaH₂PO₄*H₂O (0,156 %) 40 g NaCl (0,8 %) 4960 ml Aqua dest. 40 ml NaOH (1N) pH 7,2</p>
PBST	<p>1 ml Tween 20 ad 1000 ml PBS</p>
Ponceau Rot-Lösung	<p>20 mg Ponceau 2R 10 ml Essigsäure (3%)</p>
Resuspensionspuffer	<p>10 mmol/l Tris, basisch 150 mmol/l NaCl pH 7,4</p>
Sammelgel Puffer	<p>1 mol/l Tris-base ad 100 ml A. bidest pH 6,8</p>
Serosaler Puffer	<p>NaCl 113,6 mmol/l KCl 5,4 mmol/l HCl 0,2 mmol/l MgCl₂·6H₂O 1,2 mmol/l CaCl₂·2H₂O 1,2 mmol/l NaHCO₃ 21,0 mmol/l Na₂HPO₄·2H₂O 1,2 mmol/l Glucose 10 mmol/l Mannit 1,2 mmol/l Hepes 7,0 mmol/l Na-Gluconat 6,0 mmol/l</p>
SDS-Lösung	<p>10 % SDS (10 g) 100 ml Bidest.</p>

8. Anhang

SDS-Gel: Sammelgel 4,75% (4 Gele)	7,3 ml A. bidest. 1,25 ml ROTI-Gel 40 1,25 ml Sammelgelpuffer 100 µl SDS [10%] 100 µl APS-Lösung [10%] 5 µl TEMED
SDS-Gel: Trenngel 8,5% (4 Gele)	6,66 ml A. bidest. 3,75 ml ROTI-Gel 40 6,48 ml Trenngel Puffer 171 µl SDS [10%] 138 µl APS-Lösung [10%] 13,8 µl TEMED
TAE-Puffer	Stammlösung 50x: 242 g Tris-base 57,1 ml Eisessig 100 ml 0,5 M EDTA-Na ₂ *2H ₂ O pH 8,0 Gebrauchslösung: 10 ml TAE 50x 500 ml Aquabidest
TBS-T: 10fach Puffer	12,11 % Tris (121,1 g) 5,84 % NaCl (58,4 g) 920 ml Aqua dest. 80 ml HCl (25%) pH 7,4 Einfachlösung mit 1,25ml Tween-20 (1:5 verdünnt) versetzen
TE-Puffer	1 ml 1 M Tris-HCl pH 8,0 0,2 ml 0,5 M Na ₂ EDTA pH 8,0 Auf 100 ml mit Aquabidest auffüllen autoklavieren
Trenngel Puffer	1 mol/l Tris-base ad 100 ml A. bidest. pH 8,8
Tricin-SDS-Gel: Sammelgel 4% (4 Gele)	1,25 ml ROTI-Gel 40 3,0 ml dreifach-Puffer 7,75 ml A. bidest. 90 µl APS-Lösung [10%] 9 µl TEMED
Tricin-SDS-Gel: Trenngel 16 % (4 Gele)	7,5 ml ROTI-Gel 40 6,0 ml dreifach-Puffer 1,8 g Glycerol 2,7 ml A. bidest. 60 µl APS-Lösung [10%] 6 µl TEMED

C. Rohdaten PCR Produkte**Einheit PCR Produkte: absoluten Kopienzahl**

GAPDH PCR							
Duodenum	prox. Jejunum	dist. Jejunum	Ileum	Caecum	RDC	RVC	Niere
5690000	3990000	1190000	1940000	2920000	3000000	2140000	1270000
3600000	2390000	2140000	3680000	2290000	2850000	1930000	1930000
3150000	4610000	1940000	1580000	1720000	2840000	1730000	1530000
9650000	10300000	3580000	2070000	3670000	3000000	3700000	1620000
6620000	9960000	3640000	4270000	3330000	2710000	2370000	2290000
6820000	7440000	4890000	4960000	2786000	4930000	4160000	2410000
TRPV6 PCR							
Duodenum	prox. Jejunum	dist. Jejunum	Ileum	Caecum	RDC	RVC	Niere
6360000	4440000	1710000	136	44500	21400	491000	122000
4180000	3620000	1670	1880	119000	7010	6350	7370
10200000	1820000	988	223	113000	4110	3680	6060
4100000	4640000	4290	1070	478000	1870	148000	5350
2650000	1420000	1060	859	9680	1320	2030	28200
2750000	1950000	2510	2870	5070	2830	3460	4830
Calbindin D_{9k} PCR							
Duodenum	prox. Jejunum	dist. Jejunum	Ileum	Caecum	RDC	RVC	Niere
1828000000	1152000000	8900000	11840000	51800000	204000	39200000	2540000
1826000000	844000000	13980000	34800000	2260000	36400	84200	3960000
1614000000	878000000	11040000	4880000	222000	8620	4420000	8580000
4540000000	3940000000	88600000	8650000	5300000	48400000	30800000	562000
4350000000	3800000000	20300000	18100000	27300000	287000	4500000	15200000
5070000000	1530000000	15300000	13200000	43441000	49200	17900000	6990000
PMCA PCR							
Duodenum	prox. Jejunum	dist. Jejunum	Ileum	Caecum	RDC	RVC	Niere

8. Anhang

272000	106000	16600	6030	23800	30000	32800	3950
231000	237000	11700	17400	29000	14100	19800	4440
184000	93700	14200	15700	37100	23400	30800	3920
328000	296000	71000	37800	62400	40400	82800	7740
252000	185200	41200	72200	33000	32200	33000	24800
268000	254000	60400	55000	33800	61000	53000	12940
PiTi PCR							
Duodenum	prox. Jejunum	dist. Jejunum	Ileum	Caecum	RDC	RVC	Niere
5920	11400	7060	13200	6110	5370	5530	5780
16100	19900	15300	23500	6970	10700	6630	5290
13200	26400	13800	10800	6630	4930	5160	3920
19300	12500	29200	20400	9460	11500	9050	5810
21000	21000	19400	36100	7710	9010	9560	11600
25800	27100	36000	26000	3850	9470	7140	3590
NaPiIb PCR							
Duodenum	prox. Jejunum	dist. Jejunum	Ileum	Caecum	RDC	RVC	Niere
47,3	29,4	28,6		3990	21400	729	2880
111	10,6	10,1	45,2	188	98200	79100	7660
29,2	15,3	17,8	10,2	15,6	12600	263	7490
97,4	132	66,7	78,7	118	87400	23200	9680
396	79,2	13,7	27,2	83,8	25900	1390	26900
162	464	18,4	150	2870	47100	1200	3440

8. Anhang

D. Rohdaten Western Blot Analyse**Einheit WB Intensität: [Int·mm]**

Calbindin D_{9k} WB							
Duodenum	prox. Jejunum	dist. Jejunum	Ileum	Caecum	RDC	RVC	Niere
3280521	3258215	1233385	347947	0	137636	81814	154432
8529045	8542905	1685845	2301810	889140	772100	0	414960
3237570	3371004	663012	349164	141246	0	110610	655596
3367640	3894352	342440	199300	155740	57800	0	93140
3486853	2949806	374561	276947	0	0	0	61676
2853263	1956241	170561	66266	0	0	0	45798
TRPV6 WB							
Duodenum	prox. Jejunum	dist. Jejunum	Ileum	Caecum	RDC	RVC	Niere
6721947	4257912	5480645	4020917				
7299834	5722540	4953290	4968828				
8489970	4133924	2012188	839562				
8312955	10301880	1203114	1148697				
9603972	5105340	2902140	3522852				
3947049	11253370	1122543	646279				
PMCA WB							
Duodenum	prox. Jejunum	dist. Jejunum	Ileum	Caecum	RDC	RVC	Niere
2293640	12101450	912492	574328	647768	0	155890	299302
12986840	13428330	1197684	2473154	3015604	2157108	0	970862
3423494	11985990	2570400	1133084	819604	1480224	2849132	3104608
12966360	11270760	2062374	2308044	2275934	2721864	1996216	2597794
17926860	9428180	3405104	1456768	0	0	737580	5347425
13570790	13204430	956916	1224246	4462796	968202	0	2689716
Ponceau Rot Calbindin D_{9k} WB							
Duodenum	prox. Jejunum	dist. Jejunum	Ileum	Caecum	RDC	RVC	Niere
20717310	14313530	15440700	14636470	13946970	19826490	13961640	19164590

8. Anhang

24271130	26658980	9933011	19520250	26255630	18228120	25047230	71360050
10022380	15223770	8614200	6286168	7560560	14210560	8609664	13725540
18695460	11695840	13171180	19126790	15580620	11989860	13920080	11060640
9947514	12258800	14006640	14949210	11902440	12749850	14044520	22988520
18132240	16469100	21559800	15412740	10251060	13718220	11560080	23880660
Ponceau Rot TRPV6 WB							
Duodenum	prox. Jejunum	dist. Jejunum	Ileum	Caecum	RDC	RVC	Niere
19930950	23100560	17553170	25828100	15395700	8609692	8220534	18694680
15213240	68359100	24461010	25474470	15890070	15532020	23906300	46133850
25437090	23517480	23681760	22866410	17643080	18291770	18271270	27903830
28658040	30234110	33604990	35743990	25531940	17676980	24096300	37697360
12688230	9214040	8922540	13395910	6360530	5833025	6814225	6642185
5111288	8842400	8181768	8205680	6330520	4953088	3529288	7223832
IndianInk_PMCA WB							
Duodenum	prox. Jejunum	dist. Jejunum	Ileum	Caecum	RDC	RVC	Niere
227851600	257202000	220663300	228070900	136832200	111264900	141979000	235033000
261870300	292805100	244197300	264146800	268226800	244119000	242064600	371155600
136702000	246610700	220040000	210474000	193705000	123202000	388450400	421133800
293617900	266817300	228155000	207020300	303687400	211971700	255564300	333622000
349521500	310039600	255652000	238697000	203368100	198409600	196440900	337490000
354469400	366068400	312879500	283205800	187180600	262007100	223917400	291125200

E. Rohdaten Korrelationen Ca²⁺

Einheit Fluxraten: [nmol·cm⁻²·h⁻¹]

Ca²⁺ Fluxraten Duodenum			
Mannit ms	Ca ²⁺ ms	Mannit sm	Ca ²⁺ sm
18,46	7,28	21,59	37,82
24,35	336,60	20,89	16,10
33,36	404,82	23,03	18,68
46,26	156,23	31,49	23,83
31,06	218,63	23,13	20,68

8. Anhang

31,79	131,47	28,53	20,11
32,34	353,31	37,59	27,10
28,20	377,18	28,96	19,60
31,28	457,09	26,96	18,78
17,50	26,88	28,54	15,39
22,89	15,36	43,18	318,62
31,81	165,54	36,88	25,04
Ca²⁺ Fluxraten Jejunum			
Mannit ms	Ca ²⁺ ms	Mannit sm	Ca ²⁺ sm
43,15	56,78	12,28	19,86
24,52	26,35	14,35	19,39
20,69	25,48	15,53	21,70
34,84	72,12	21,17	23,07
30,30	38,93	15,40	21,66
26,51	35,18	17,81	24,97
21,20	32,12	19,69	27,04
35,09	285,09	23,02	23,63
32,75	165,98	12,81	21,21
36,06	98,15	19,41	23,92
23,06	26,06	23,06	30,76
22,97	31,44	9,89	21,96
Ca²⁺ Fluxraten Caecum			
Mannit ms	Ca ²⁺ ms	Mannit sm	Ca ²⁺ sm
6,52	14,12	9,04	9,15
16,84	22,15	11,03	11,63
9,7	20,08	8	7,75
6,92	28,86	7,29	8,87
7,47	10,82	11,47	9,98
8,61	16,55	6,95	7,55
8,42	14,66	7,51	7,57
9,36	12,74	16,52	16,7
19,62	23,96	17,91	20,57
11,02	12,93	9,24	9,53

8. Anhang

10,44	10,96	12,04	12,01
9,31	27,84	29,9	32,21
Ca²⁺ Fluxraten Colon			
Mannit ms	Ca ²⁺ ms	Mannit sm	Ca ²⁺ sm
12,41	24,47	12,53	10,33
7,82	10,73	11,44	11,19
26,18	36,22	12,67	14,12
15,17	29,58	13,54	13,75
9,76	9,67	16,79	-8,02
23,59	28,97	19,7	21,55
10,27	12,05	14,79	16,34
14,53	15,32	22,64	19,9
13,18	16,09	15,05	14,57
10,57	8,47	14,29	12,4
47,45	27,82	26,97	30,47
17,71	15,76	16,76	15,02

F. Rohdaten Korrelationen P_i

P_i Fluxraten Duodenum			
Mannit ms	Phosphat ms	Mannit sm	Phosphat sm
18,46	13,04	21,59	17,72
24,35	15,87	20,89	16,47
33,36	18,43	23,03	7,95
46,26	34,27	31,49	27,48
31,06	20,85	23,13	25,15
31,79	21,67	28,53	24,20
32,34	23,75	37,59	32,79
28,20	16,41	28,96	27,63
31,28	21,09	26,96	33,08
17,50	12,24	28,54	24,27
22,89	18,29	43,18	24,07
31,81	21,95	36,88	31,81
P_i Fluxraten Jejunum			
Mannit ms	Phosphat ms	Mannit sm	Phosphat sm
43,15	21,94	12,28	30,99
24,57	6,94	14,35	18,66

8. Anhang

20,69	3,61	15,53	23,89
34,84	18,67	21,17	19,24
30,3	19,23	15,4	29,81
26,51	10,13	17,81	24,63
21,2	8,25	19,68	27,49
35,08	21,47	23,01	27,14
32,74	12,89	12,8	23,45
36,05	16,86	19,41	22,83
23,06	27,77	23,06	8,9
22,96	6,53	9,88	24,52
P_i Fluxraten Caecum			
Mannit ms	Phosphat ms	Mannit sm	Phosphat sm
6,52	6,94	9,04	6,72
16,84	7,36	11,03	12,24
9,7	17,18	8	14,65
6,92	9,09	7,29	7,2
7,47	5,93	11,47	8,26
8,61	6,38	6,95	6,24
8,43	7,02	7,51	4,56
9,36	7,36	16,52	12,24
19,63	17,18	17,91	14,65
11,02	9,09	9,24	7,2
10,45	5,93	12,04	8,26
9,31	6,38	29,81	6,24
P_i Fluxraten Colon			
Mannit ms	Phosphat ms	Mannit sm	Phosphat sm
12,41	15,65	12,53	7,29
7,82	7,08	11,44	6,47
26,18	29,22	12,67	8,32
15,17	22,82	13,54	9,47
9,76	8,77	16,79	11,43
23,59	48,1	19,7	15,21
10,27	36,39	14,79	12,05
14,53	10,84	22,64	15,21
13,18	9,75	15,05	9,63
10,57	8,07	14,29	9,81
47,45	18,79	26,97	22,92
17,71	7,71	16,76	10,39

9. Danksagung

Zuerst möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Breves bedanken. Ohne Ihn wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Danke Anja, dass ich mit an diesem Thema arbeiten durfte.

Ein weiterer Dank geht an meine tollen Mitstreiter im Doktorandenzimmer, ohne sie wäre ich bestimmt mehr als einmal der Verzweiflung nahe gewesen!

Vielen Dank an Kristin, für deine Unterstützung als die beste Büro-Teilerin, Lebens-Beraterin, Quatscherin und noch so vieles mehr!

Vielen Dank an Melanie für die vielen lustigen und schönen Stunden, deine klugen Ratschläge und das ein oder andere sehr ehrliche Wort!

Danke Tanja, einfach, weil du mit im Boot gesessen bist ☺.

Vielen Dank an Patrick und Matthias als männliche Unterstützung in diesem ganzen Hühnerhaufen.

Vielen Dank an Gesine, für den schönen Spaziergang über die Bult und die witzigen und anregenden Gespräche.

Vielen lieben Dank an Rebecca, wir hatten hier in Hannover eine tolle Zeit. Danke an Petti und Elisabeth und ein Dank an all diejenigen, die im Doktorandenzimmer gekommen und gegangen sind und rege zur Tagesverbesserung beigetragen haben!

Liebe Frau Starke, auch dir möchte ich ganz herzlich danken, ohne dich wäre es nicht erst soweit gekommen, wie es gekommen ist und ich werde mir für den nächsten Sommer ganz sicher einen Sonnenhut kaufen!

Vielen lieben Dank an das ganze Team im Labor. Karin, du bist einfach die allerbeste, Retterin-in-Not, offenes-Ohr-Haberin und noch so vieles mehr! Eine gute Fee braucht jedes Labor und du bist die Beste aller guten Feen! Marion, vielen Dank für die tolle Unterstützung während der Ussing-Kammer-Versuche und für die letzte Rettung, wenn der Unterzucker mal wieder drohte! Nadine vielen Dank bei dem ganzen Laborkladderadatsch! Kerstin, vielen Dank auch dir für deine Hilfe während den Versuchen und darüber hinaus.

9. Danksagung

Liebe Postdocs, auch euch gilt ein richtig großer Dank fürs Zuhören, Ideen austauschen und noch so vieles mehr! Susi, Steffi, Nina, Jens, ja, ihr seid gemeint!

Mirja und Alex auch euch möchte ich für eure tolle Unterstützung, vor allem in der Anfangszeit, Danken. Ihr habt mir gezeigt, was in mir steckt!

Danke an Yvonne und Micha fürs Pferde betütteln und die vielen tollen Gespräche!

Lieber Jan ich freue mich sehr, dass wir uns getroffen haben und aus einer Hund-Tür-Bekanntschaft sehr schnell das geworden ist, was wir jetzt haben. Da hatte „das Ganze“ ja dann doch noch einen Sinn ergeben ;), denn ohne hätten wir uns nie kennen gelernt! Danke, dass du einfach „da“ bist und mir mit gutem Rat und deiner ruhigen Art zur Seite stehst!

Natürlich darf auch die Physik nicht fehlen! Christian und Gerrit, ihr wart einfach toll! Danke!

Und ein ganz besonderer Dank gilt meinem Hund Moritz. Danke, dass du der größte Chaotenköter der Welt bist und immer dafür gesorgt hast, dass es nie, aber auch wirklich nie langweilig wurde!