

6. Zusammenfassung

Calcitriol stimuliert den Calciumtransport an der Bürstensaummembran. Es wurde untersucht, welche Membranproteine an diesem Transport in isolierten BSMV beteiligt sind.

Für die Untersuchungen wurden 38 Ferkel, welche 6 bis 12 Wochen alt waren, eingesetzt. Die Versuchstiere waren über ihren Calcitriolstatus in drei Versuchsgruppen eingeteilt:

1. 17 gesunde Ferkel mit normalem Calcitriolstatus
2. 17 rachitische Ferkel mit erblichem Calcitriolmangel
3. 4 rachitische Ferkel mit erblichem Calcitriolmangel, welche drei Tage vor der Probennahme mit 5 mg Vitamin D₃ behandelt wurden

Aus dem Duodenum dieser Ferkel wurden mit der Mg-EGTA-Präzipitationsmethode BSMV isoliert. Die Vesikel wurden mit Octylglukopyranosid in Konzentrationen von 0,4 bis 0,7% behandelt, um selektiv Proteine aus den BSMV herauszulösen; unbehandelte BSMV dienten als Kontrolle. Die Calciumaufnahme in die BSMV wurde mit ⁴⁵Ca gemessen. Die Konzentration an freiem Calcium im Inkubationsmedium betrug 0,03 mmol/l und die Inkubationszeiten waren 0,5 und 1 Minute, dabei wurde die sättigbare Calcitriol-abhängige Komponente des Calciumtransportes in die BSMV gemessen.

Die Calciumaufnahme in unbehandelten BSMV war vom Calcitriolstatus der Tiere abhängig. Die Aufnahme von Calcium nach 1 min Inkubationszeit betrug $2,2 \pm 0,68$ nmol/(mg×min) bei gesunden Ferkeln gegenüber $1,1 \pm 0,5$ nmol/(mg×min) bei rachitischen Ferkeln und $2,82 \pm 1,1$ nmol/(mg×min) bei behandelten Ferkeln. TFP hemmte die Calciumaufnahme aller drei Gruppen signifikant, wobei die Werte nach TFP-Hemmung bei rachitischen Ferkeln signifikant niedriger waren als die der anderen Gruppen. Verapamil hemmte die Aufnahme bei gesunden und rachitischen Ferkeln signifikant auf etwa dieselben Werte. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Calciumaufnahme in die BSMV Calcitriol-abhängig

war und daß Transportmechanismen vorhanden waren, welche durch Verapamil und TFP gehemmt werden konnten.

Bei gesunden und behandelten Ferkeln reduzierte Octylglukopyranosid den Calciumtransport signifikant stärker als bei rachitischen Ferkeln. Bei einer Konzentration von 0,6% waren keine Unterschiede zwischen den Gruppen und keine Unterschiede zwischen gehemmtem und unbeeinflusstem Transport bei beiden Inkubationszeiten meßbar. Octylglukopyranosid führte bei den BSMV zu einer Abnahme des Vesikelvolumens, und die Vesikel wiesen ein nicht mehr vollständig geschlossenes Kompartiment auf. Diese Effekte waren jedoch zwischen den Versuchstiergruppen nicht verschieden und konnten somit die Unterschiede in der Ca-Aufnahme nicht erklären. Insgesamt sprechen diese Ergebnisse dafür, daß durch Octylglukopyranosid Calcitriol-abhängige Transportproteine aus den BSMV herausgelöst wurden.

Zur Analyse der Proteine wurden sowohl die aus den BSMV herausgelösten als auch die in den Vesikeln verbliebenen Proteine mittels SDS-Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Durch Laserscanning wurden die Molekulargewichte von 11 Proteinbanden ermittelt und deren relativer Flächenanteil bestimmt. Die relative Fläche der 141-kD-Bande war bei rachitischen Ferkeln signifikant stärker ausgeprägt als bei gesunden Ferkeln, während die 236-kD-Bande bei rachitischen Ferkeln signifikant schwächer ausgeprägt war. Die Messungen der AP sowie die Stärke der die AP enthaltenden 66-kD-Bande sprechen dafür, daß die AP bei Schweinen im Gegensatz zu Küken und Ratten nicht Calcitriol-abhängig ist.

Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen beim selektiven Solubilisieren durch Octylglukopyranosid konnten nur bei der Bande beobachtet werden, welche das Zytoskelettprotein Aktin (44 kD) enthält. Bei beiden Tiergruppen wurde die das Zytoskelettprotein Myosin I enthaltende Bande (113 kD) sowie die 236-kD-Bande durch Octylglukopyranosid weniger stark solubilisiert, während die 95-kD-Bande stärker solubilisiert wurde.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß Proteine des Mikrovilluszytoskeletts durch Calcitriol in bisher nicht geklärter Weise beeinflusst werden, daß jedoch die Ca-Transportproteine nicht unter den 11 erfaßten Proteinbanden zu suchen sind, sondern eher einem sehr kleinen Teil der BSM-Proteine zuzuordnen sind.

7. Summary

Christiane Schlesselmann

Analysis of duodenal brush border proteins in combination with the calcitriol-stimulated Ca^{2+} -transport in pigs.

Calcitriol stimulates the transport of calcium on the brush border membrane. The membrane proteins which are involved in this transport in isolated BBMV (brush border membrane vesicles) were studied.

For the study, 38 piglets between 6 and 12 weeks old were used. The animals were divided into three groups based on their calcitriol status:

1. 17 healthy piglets with a normal calcitriol status
2. 17 rachitic piglets with a hereditary calcitriol deficiency
3. 4 rachitic piglets with a hereditary calcitriol deficiency which were treated with 5 mg of vitamin D_3 three days before collection of the mucosa.

BBMV were prepared from the duodenal segments by the Mg-EGTA-precipitation method. The vesicles were treated with octylglukopyranosid in concentrations from 0.4% to 0.7% to solubilize selectively proteins from the membrane; untreated BBMV served as a control. The calcium uptake in the BBMV was measured with ^{45}Ca . The concentration of free Ca^{2+} in the incubation medium amounted to 0.03 nmol/l and the incubation periods were 0.5 and 1 minute; also, the saturable calcitriol-dependent component of the calcium uptake into the BBMV was measured.

The calcium uptake in untreated BBMV depended on the calcitriol status of the animals. The uptake of calcium after 1 minute incubation period amounted to 2.2 ± 0.68 nmol/(mg \times ml) for healthy piglets as opposed to 1.1 ± 0.5 nmol/(mg \times ml) for rachitic piglets and 2.82 ± 1.1 nmol/(mg \times ml) for vitamin D-treated piglets. TFP significantly inhibited the calcium uptake of all three groups, but the values after inhibition were significantly lower for the rachitic piglets than for the other groups. Verapamil inhibited the uptake in both healthy and rachitic piglets significantly and to roughly the same level. These findings show that the calcium uptake

in the BBMV was calcitriol-dependent and that there were transport mechanisms that could be inhibited by Verapamil and TFP.

Octylglukopyranosid reduced the calcium uptake in healthy and vitamin D-treated piglets significantly more strongly than in rachitic piglets. At a concentration 0.6%, there was no difference between the groups and no measurable difference between inhibited and uninfluenced uptake in the two incubation periods. Octylglukopyranosid led to a reduction of the vesicle volume in the BBMV and the vesicles have a no longer completely enclosed compartment. These effects did not differ between the test groups, however, so they can not explain the differences in the calcium uptake. All in all, the results indicate that octylglukopyranosid releases calcitriol-dependent transport proteins from the membrane.

For the analysis of the proteins, both the proteins solubilized from the BBMV and those that remained in the vesicles were separated using SDS-PAGE electrophoresis. With laser scanning, the molecular weight of 11 protein bands and their relative surface areas were determined. The relative surface of the 141 kD band was significantly more pronounced in rachitic piglets than in healthy ones, but the 236 kD band was significantly less pronounced in rachitic piglets. The measurement of AP as well as the strength of the 66 kD band, which contain AP, indicate that AP in pigs, in contrast to chicks and rats is not calcitriol-dependent.

Significant differences between the test groups in selective solubilization with octylglukopyranosid were only detectable in the band that contains the cytoskeletal protein actin (44 kD). Both the band that contains the cytoskeletal protein myosin I (113 kD) and the 236 kD band were less solubilized in both groups of animals, while the 95 kD band was more solubilized.

These results indicated that the proteins of the microvillar cytoskeleton are influenced in an as yet unexplained fashion, but that calcium transport proteins are not among the 11 studied bands, but should more likley be classified as a very small group of BBM proteins.