

Aus dem Physiologischen Institut
der Tierärztlichen Hochschule Hannover

**Untersuchungen zur Funktion und zu Mechanismen des
Ca²⁺-Transportes im Dünndarm
von Saugferkeln**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
DOCTOR MEDICINAE VETERINARIAE
durch die Tierärztliche Hochschule Hannover

Vorgelegt von
Ulrike Nurnus
aus Freiburg

Hannover 2000

Wissenschaftliche Betreuung: PD Dr. Schröder

1. Gutachter: PD Dr. Schröder

2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Kietzmann

Tag der mündlichen Prüfung: 7.06.2000

Gefördert mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft

Für meine
Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	2
2.1	Allgemeine biologische Bedeutung von Ca^{2+}	2
2.2	Alimentäre Ca^{2+} -Aufnahme	3
2.3	Regulation der systemischen Ca^{2+} -Homöostase	4
2.4	Regulation der zellulären Ca^{2+} -Homöostase	7
2.5	Mechanismen des intestinalen Ca^{2+} -Transportes	8
2.5.1	Parazellulärer Ca^{2+} -Transport	9
2.5.2	Transzellulärer Ca^{2+} -Transport	11
2.5.2.1	Genomischer Mechanismus der aktiven Ca^{2+} -Absorption	11
2.5.2.2	Nicht-genomischer Mechanismus der aktiven Ca^{2+} -Absorption: „Transcaltachia“	20
2.6	Besonderheiten des transzellulären Ca^{2+} -Transportes bei Saugferkeln	22
3	Material und Methoden	25
3.1	Versuchstiere	25
3.1.1	Kontrollferkel	25
3.1.2	Ferkel mit Calcitriolmangel	25

Inhaltsverzeichnis

3.2	Probenentnahmen und Präparation der Darmepithelien	26
3.2.1	Probenentnahmen	26
3.2.2	Präparation der Darmepithelien für die Fluxratenmessungen in den Ussing-Kammern	26
3.3	Messung der unidirektionalen Fluxraten für Ca^{2+} , P_i und Mannit	27
3.3.1	Pufferlösungen	27
3.3.2	Inkubation der Epithelien	28
3.3.3	Messung der elektrophysiologischen Parameter	29
3.3.4	Messung der unidirektionalen Fluxraten	30
3.3.4.1	Messung der Ca^{2+} - und P_i -Fluxraten	31
3.3.4.2	Messung der Mannit-Fluxraten	33
3.3.5	Berechnung der unidirektionalen und der Nettofluxraten	33
3.4	Bestimmung der Kompartimentierung von Ca^{2+} in jejunalen Enterozyten: Subzelluläre Fraktionierung	34
3.4.1	Pufferlösungen	35
3.4.2	Schichtung des Dichtegradienten	35
3.4.3	Probenentnahmen und Präparation der Dünndarmepithelien	36
3.4.4	Inkubation der Dünndarmepithelien	36
3.4.5	Zeitabhängigkeit der Aufnahme von ^{45}Ca in jejunale Enterozyten	37
3.4.6	Zentrifugation der Enterozytenhomogenate	38
3.5	Analytische Methoden	40
3.5.1	Bestimmung der Proteinkonzentrationen	40
3.5.2	Bestimmung der Aktivitäten der alkalischen Phosphatase	40
3.5.3	Bestimmung der Aktivitäten der sauren Phosphatase	41
3.5.4	Bestimmung der Aktivitäten der Na^+/K^+ -ATPase	41
3.6	Chemikalien	42

3.7	Statistik	42
4	Ergebnisse	43
4.1	Untersuchungen zum Einfluss des Zytoskeletts auf den transepithelialen Ca^{2+} - und P_i -Transport im Duodenum von Saug- und Absetzferkeln	43
4.1.1	Einfluss von Cytochalasin D auf Aktinfilamente	43
4.1.2	Einfluss von Latrunculin B auf Aktinfilamente	45
4.1.2.1	Altersabhängigkeit der Wirkung von Latrunculin B	45
4.1.3	Einfluss von Colchicin auf Mikrotubuli	48
4.1.4	Einfluss von Colchicin auf den parazellulären Transportweg	50
4.2	Untersuchungen zur Stimulierbarkeit der duodenalen Ca^{2+} - und P_i -Resorption durch Calcitriol	50
4.2.1	Dosis-Wirkungs-Beziehung	51
4.2.2	Altersabhängigkeit der Wirkung von Calcitriol	52
4.2.3	Der Calcitriol-Effekt unter dem Einfluss von Colchicin	56
4.3	Einfluss von BAY K8644 auf den duodenalen Ca^{2+} -Transport	58
4.4.	Untersuchungen zur Kompartimentierung von exogenem Ca^{2+} in jejunalen Enterozyten	60
4.4.1	Zeitabhängige Aufnahme von ^{45}Ca in Dünndarmepithelien von Absetzferkeln	60
4.4.2	Verteilung der Markerenzym-Aktivitäten im Gesamthomogenat und in den Fraktionen der Differenzialzentrifugation sowie deren Anreicherungen	62
4.4.3	Dichtegradientenzentrifugation der P_2 -Fraktion	65
4.5	Protein-, ^{45}Ca - und Enzym-Recoveries	67

5	Diskussion	68
5.1	Beurteilung der Methoden	68
5.2	Aktinfilamente und Ca ²⁺ -Transport	71
5.3	Mikrotubuli und Ca ²⁺ -Transport	73
5.4	„Schnelle“ Wirkung von Calcitriol auf den Ca ²⁺ -Transport	74
5.5	Beteiligung von Ca ²⁺ -Kanälen am Ca ²⁺ -Transport	76
5.6	Subzelluläre Kompartimentierung von Ca ²⁺	77
6	Zusammenfassung	81
7	Summary	85
8	Literaturverzeichnis	88

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	<u>A</u> bbildung
AF	<u>A</u> bsetz <u>f</u> er <u>k</u> el
AP	Aktivität der <u>a</u> lkalischen <u>P</u> hosphatase
ATP	<u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat
Bq	<u>B</u> equerel
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calcium
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Konzentration von Ca ²⁺ -Ionen
cpm	Impulse pro Minute (<u>c</u> ounts <u>p</u> er <u>m</u> inute)
Def	calcitriol <u>d</u> efizient
DMSO	<u>D</u> imethyl <u>s</u> ulphoxid
dpm	Zerfälle pro Minute (<u>d</u> ecays <u>p</u> er <u>m</u> inute)
EDTA	<u>E</u> thylen- <u>D</u> iamin- <u>t</u> etra-Essigsäure (- <u>A</u> ctic-Acid)
EGTA	<u>E</u> thylen- <u>G</u> lykobil (beta-Aminoethylether) –N,N'- <u>t</u> etra-Essigsäure (- <u>A</u> ctic-Acid)
<i>g</i>	Zentrifugalbeschleunigung
G _t	Gewebeleitfähigkeit
h	Stunde (<u>h</u> our)
Hepes	4-(2- <u>H</u> ydroxy- <u>E</u> thyl)-1- <u>P</u> iperazin- <u>E</u> than- <u>S</u> ulfonsäure
I _{sc}	Kurzschlussstrom
J _{ms}	Fluxrate von mukosal nach serosal
J _{sm}	Fluxrate von serosal nach mukosal

Abkürzungsverzeichnis

J_{net}	Nettofluxrate (= $J_{\text{ms}} - J_{\text{sm}}$)
K_m	Halbsättigungskonstante bei sättigbarem Transport
Kon	<u>K</u> ontrollferkel
LM	<u>L</u> ebend <u>m</u> asse
M	<u>M</u> olarität
mRNA	<u>m</u> essenger- <u>R</u> ibon <u>u</u> cleinsäure (- <u>A</u> cid)
MW	Molekulargewicht (<u>m</u> olecular <u>w</u> eight)
N	<u>N</u> ormalität
$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	1,25-Dihydroxyvitamin D_3 (1,25-Dihydroxycholecalciferol, Calcitriol)
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
p.A.	pro <u>A</u> nalysis
P_D	transepitheliale <u>P</u> otential <u>d</u> ifferenz
P_i	anorganisches (inorganic) <u>P</u> hosphat
p.p.	<u>p</u> ost <u>p</u> artum
PTH	<u>P</u> arath <u>o</u> rmon
PVDRI	Pseudovitamin-D-Mangelrachitis, Typ I (<u>P</u> seudo <u>V</u> itamin <u>D</u> <u>D</u> eficiency <u>R</u> ickets Type I)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (<u>S</u> tandard <u>E</u> rror of the <u>M</u> ean)
SF	<u>S</u> aug <u>f</u> erkel
SP	Aktivität der <u>s</u> auren <u>P</u> hosphatase
Tab.	<u>T</u> abelle
Tris	Tris (Hydroxymethyl) Aminomethan
VDR	Vitamin D-Rezeptor
w/v	Gewicht zu Volumen

1 Einleitung

Aus zahlreichen Untersuchungen ist bekannt, dass der vordere Dünndarm Hauptort der aktiven Ca^{2+} -Absorption beim Saug- und Absetzferkel ist. Bezüglich der Regulation gibt es zwischen diesen beiden Altersstufen grundlegende Unterschiede. Während der Ca^{2+} -Transport bei neugeborenen Ferkeln ein calcitriolunabhängiger Prozess ist, übernimmt ab der 4. Woche post partum zunehmend ein calcitriolabhängiger Mechanismus die Kontrolle.

Bei Ratten und Hühnern konnte gezeigt werden, dass Calcitriol seine Funktionen über einen genomischen Mechanismus (Bindung an einen kernständigen Vitamin D-Rezeptor) und einen nicht-genomischen Mechanismus (Bindung an einen membranständigen Vitamin D-Rezeptor) ausübt. Außerdem wurde bei diesen Tieren gezeigt, dass Elemente des Zytoskeletts und Lysosomen beim Ca^{2+} -Transport durch die Zelle eine Rolle spielen.

Frühere Arbeiten beim Saugferkel konnten bereits einen genomischen Calcitriol-Effekt auf den Ca^{2+} -Transport ausschließen. Daher stellte sich die Frage nach der möglichen Beteiligung nicht-genomischer Calcitriol-Effekte am intestinalen Ca^{2+} -Transport beim neugeborenen Ferkel und ob Elemente des Zytoskeletts oder Lysosomen an diesem Vorgang beteiligt sein könnten. Zu diesem Zweck wurden In-vitro-Untersuchungen an intakten Dünndarmepithelien in Ussing-Kammern durchgeführt und dabei die Wirkung verschiedener Antagonisten des Zytoskeletts auf den Ca^{2+} -Transport geprüft. In getrennten Untersuchungen wurde geprüft, inwiefern die akute Applikation von Calcitriol zu spontanen Änderungen des Ca^{2+} -Transportes im Ferkeldünndarm führt.

Eine weitere In-vitro-Methode zur subzellulären Fraktionierung von Enterozyten wurde angewandt, um die mögliche Beteiligung von Lysosomen am Ca^{2+} -Transport bei Saug- und Absetzferkeln zu untersuchen.

2 Literaturübersicht

2.1 Allgemeine biologische Bedeutung von Ca^{2+}

Calcium (Ca^{2+}) ist mit seinen vielzähligen Aufgaben im Organismus eines der wichtigsten kationischen Mengenelemente im Körper. Es ist ein essenzielles Strukturelement für Knochen und Zähne und von großer Bedeutung als ubiquitärer Second messenger innerhalb von Zellen. In dieser Funktion beeinflusst Ca^{2+} z.B. die molekularen Mechanismen der Muskelkontraktion, die präsynaptische Ausschüttung von Neurotransmittern sowie die Sekretionstätigkeit bestimmter exo- und endokriner Drüsen. Außerdem spielt Ca^{2+} als Aktivator der Thrombokinas eine wichtige Rolle bei der Blutgerinnung (KAUNE 1992).

Da die intrazelluläre Konzentration an freien Ca^{2+} -Ionen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Stimulation als Antwort um mehrere Zehnerpotenzen ansteigen kann, gibt es effektive zelluläre Mechanismen, die dafür sorgen, dass die erhöhten zytosolischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Spiegel auf das niedrige Ausgangsniveau zurückgeführt werden (NEMERE und NORMAN 1991). Daran beteiligt sind membranständige Ca^{2+} -Pumpen, die Ca^{2+} -Ionen aus der Zelle herausschleusen oder in Organellen wie Mitochondrien, Microsomen und dem endoplasmatischen Reticulum einlagern (CARAFOLI 1987).

Ca^{2+} -bindende Proteine wie die Calbindine oder Calmodulin sind durch ihre Ca^{2+} -puffernde Wirkung neben der subzellulären Kompartimentierung ebenfalls wesentlich an der Aufrechterhaltung der zytosolischen Ca^{2+} -Homöostase beteiligt. Dieses gilt insbesondere für Zellen wie Enterozyten des Dünndarms, die täglich große Mengen von Ca^{2+} -Ionen aus dem Darmlumen in das Blut transportieren, ohne dass dabei die Second messenger-Funktion des Ca^{2+} betroffen sein darf (SCHRÖDER et al. 1996).

2.2 Alimentäre Ca^{2+} -Aufnahme

Während des Wachstums wird Ca^{2+} in großen Mengen für die Mineralisierung des Skeletts beim Knochenaufbau benötigt. Im Laufe der frühen postnatalen Entwicklung muss der Ca^{2+} -Bedarf über die Milch gedeckt werden. Dabei variiert der Ca^{2+} -Gehalt je nach Tierart bemerkenswert. Sauenmilch enthält ca. 2,3 g Ca^{2+} /l (MEYER und KAMPHUES 1990), Rattenmilch 3 g Ca^{2+} /l (HALLORAN und DE LUCA 1980), während humane Muttermilch nur 200-350 mg Ca^{2+} /l beinhaltet (GOEDHART und BINDELS 1994). In der Regel kann die aufgenommene Ca^{2+} -Menge jedoch durch Anpassung von Saugfrequenz und Milchvolumen eingestellt werden.

Der tägliche Ca^{2+} -Bedarf für 1,3-5 kg schwere Saugferkel liegt bei 1,5-4 g pro Tier. Für 10-20 kg schwere Absetzferkel wird eine tägliche Versorgung mit 6-10 g Ca^{2+} pro Tier empfohlen. Die durchschnittliche Nettoabsorption beträgt ca. 80 % des mit der Nahrung aufgenommenen Ca^{2+} (KIRCHGESSNER 1992).

Ca^{2+} -Ionen können über die gesamte Länge des Darmtraktes absorbiert werden (BRONNER et al. 1986, VAN OS 1987). Unterschieden werden muss dabei zwischen den beteiligten Mechanismen. Während das Duodenum und das proximale Jejunum beim Schwein und bei den meisten anderen Säugetieren als Hauptorte des aktiven, Vitamin D-stimulierten Ca^{2+} -Transportes angesehen werden (FAVUS 1985, KAUNE et al. 1990a, BRONNER 1992), kann der passive Transport, der vom elektrochemischen Gradienten abhängt, im gesamten Darmtrakt erfolgen (PANSU et al. 1983a, BRONNER et al. 1986, ARMBRECHT 1990). Über die quantitativen Anteile von aktivem und passivem Ca^{2+} -Transport entlang des Intestinaltraktes liegen nur wenige Daten vor. Hierauf wird an anderer Stelle näher eingegangen (2.5.1).

2.3 Regulation der systemischen Ca^{2+} -Homöostase

Der Ca^{2+} -Plasmaspiegel liegt beim Schwein, abhängig von Alter, Geschlecht, Reproduktionsstadium und Leistung, zwischen 2,3 und 2,8 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (KOLB 1989). Die Homöostase des extrazellulären Ca^{2+} wird hauptsächlich über die Wirkung von regulierenden Hormonen auf Knochen, Niere und Darm kontrolliert (BRONNER 1997). Diese umfassen das Seco-Steroidhormon Calcitriol ($1\alpha,25$ -Dihydroxycholecalciferol, $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) und die Peptidhormone Parathormon (PTH) und Calcitonin (NORMAN 1979).

Vitamin D wird als Vitamin D_2 (Ergocalciferol) aus pflanzlicher Nahrung und als Vitamin D_3 (Cholecalciferol) aus tierischer Nahrung aufgenommen. Es kann auch aus Provitamin D_3 im Körper unter UV-Einfluss in der Haut zu Vitamin D_3 umgewandelt werden. Vitamin D_2 und Vitamin D_3 bzw. deren Metabolite haben im Säugerorganismus annähernd dieselben Wirkungen (NORMAN und ROSS 1979). Sie unterscheiden sich in ihrer Seitenketten- und Ringstruktur von den klassischen Steroidhormonen wie z.B. Östrogen. Diese besonderen Strukturmerkmale ermöglichen schnelle Konformationsänderungen und eine hohe Flexibilität der Moleküle (NORMAN et al. 1998). Unter den mehr als 37 bekannten physiologischen Metaboliten des Vitamins D_3 (HENRY und NORMAN 1984, HENRY und NORMAN 1991) stellt Calcitriol für den intestinalen Ca^{2+} -Transport die biologisch aktivste Form dar (FAVUS 1985, NEMERE und NORMAN 1990). Calcitriol wird durch zwei enzymatische Hydroxylierungsschritte in Leber und Niere entsprechend aus Vitamin D_3 und 25-OHD_3 gebildet. Es stimuliert die aktive Absorption von Ca^{2+} -Ionen aus dem Darm. In Anwesenheit von Parathormon fördert es die Auflösung von Hydroxylapatit aus der Knochenmatrix und die Resorption von Ca^{2+} in der Niere (HARMEYER und KAUNE 1988).

Neben Calcitriol wird die Ca^{2+} -Homöostase wesentlich von dem in den Zellen der Nebenschilddrüse gebildeten PTH beeinflusst. PTH wird bei niedrigem Ca^{2+} -Plasmaspiegel freigesetzt. Es erhöht die Resorption von Ca^{2+} aus der Tubulusflüssigkeit der Niere (BINDELS et al. 1991), die Freisetzung von Ca^{2+} aus

dem Knochen und stimuliert die renale 25-HydroxyvitaminD₃-1 α -Hydroxylase, wodurch es zu einem Anstieg des Plasmaspiegels von Calcitriol kommt (KOVARIK 1983).

Bei einem erhöhten Ca²⁺-Plasmaspiegel wird dagegen Calcitonin aus den C-Zellen der Nebenschilddrüse freigesetzt. Calcitonin wirkt PTH entgegen, indem es die Mobilisation von Ca²⁺ aus dem Knochen und die renale Resorption von Ca²⁺ vermindert (KOVARIK 1983). Ein direkter Einfluss auf die intestinale Ca²⁺-Absorption wurde bislang nicht beschrieben.

In der Tumorforschung wurde 1987 erstmals bei Patienten mit tumor-assoziiertes Hypercalcämie eine Substanz entdeckt, die dem PTH ähnlich ist und deshalb als „parathyroid hormone-related protein“ (PTHrP) bezeichnet wird. Bei den Tumorkranken bestand eine positive Korrelation zwischen dem Ca²⁺-Plasmaspiegel und der PTHrP-Konzentration (BLIND et al. 1993). Auch unter physiologischen Bedingungen wurde PTHrP in der laktierenden Mamma, in der Placenta und in fetalem Gewebe gefunden. Vermutlich ist das Peptid für den transplazentären Ca²⁺-Transport (RAUE und BLIND 1993) und für die Ca²⁺-Mobilisation aus dem Knochen während der Laktation von Bedeutung (PHILBRICK et al. 1996). Über Endozytose im Intestinum kann PTHrP in einem Zeitraum von Stunden bis wenigen Tagen post natum aus der Milch aufgenommen werden, jedoch findet die Produktion auch schon in der fetalen Parathyreoidea statt (RODDA et al. 1988, CARE et al. 1990, MAC ISAAK et al. 1991 und RODDA et al. 1992). Untersuchungen von fetalem Plasma haben gezeigt, dass PTH beim Fetus unter der Nachweisgrenze liegt, im fetalen Plasma jedoch höhere PTHrP-Werte als im mütterlichen Plasma vorliegen (THIEBAUD et al. 1993). Mit Hilfe von Radioimmunoassays zur Bestimmung von nativem PTHrP aus der Milch konnten im Duodenalchymus von Saugferkeln nur noch bestimmte PTHrP-Fragmente nachgewiesen werden (KLEIN 1999). Daraufhin wurde in Ussing-Kammer-Versuchen gezeigt, dass diese Fragmente von der isolierten Darmschleimhaut absorbiert werden. Die Plasmakonzentrationen der PTHrP-Fragmente waren bei einigen Saugferkeln im Vergleich zu milchfrei ernährten Ferkeln um 50 % höher. Außerdem wurde hier demonstriert, dass die

Darmschleimhaut der Saugferkel sowohl in vivo als auch in vitro mehr Ca^{2+} transportiert als die der milchfrei ernährten Altersgenossen. Aufgrund dieser Befunde wurde die Bedeutung bestimmter PTHrP-Fragmente in der Milch für den aktiven Vitamin D-unabhängigen Ca^{2+} -Transport postuliert.

Ein weiteres Peptidhormon, welches in der Lage ist, den Ca^{2+} -Haushalt zu beeinflussen, ist das Stanniocalcin (STC). Es wurde zunächst bei Knochenfischen entdeckt (STERN et al. 1991) und konnte daraufhin auch in verschiedenen Geweben von Säugern, einschließlich dem Menschen, nachgewiesen werden (WAGNER et al. 1995). Ussing-Kammer-Versuche mit rekombinantem humanem STC haben gezeigt, dass STC bei Ratten und Schweinen den duodenalen Nettotransport von Ca^{2+} -Ionen verringerte aber den P_i -Nettotransport stimulierte (MADSEN et al. 1998). Es gilt noch zu klären, auf welchen Mechanismen die Wirkung von STC beruht und in welchem Maße der Ca^{2+} -Transport beeinflusst wird sowie ob es altersbedingte Unterschiede gibt.

Eine Reihe weiterer endo- und exogener Substanzen haben einen Einfluss auf den Ca^{2+} -Haushalt. Das Hormon Prolaktin führte bei Vitamin D-defizienten Ratten zu einem Anstieg des intestinalen Ca^{2+} -Transportes und zu einer Mobilisation von Ca^{2+} aus dem Knochen (PAHUJA und DE LUCA 1981). Bei parathyroidektomierten Wassermolchen kam es unter Prolaktin-Einfluss zu einer Erhöhung des Ca^{2+} -Plasmaspiegels (MATSUDA et al. 1991). Prolaktin stimuliert außerdem die Bildung von Calcitriol in der Niere über eine positive Beeinflussung der Hydroxylaseaktivität (SPANOS et al. 1981).

Die zuletzt genannten Hormone scheinen für die spezifische Anpassung der Ca^{2+} -Homöostase an spezielle Lebensphasen wie Wachstum und Fortpflanzung wichtig zu sein. Dies muss allerdings in Zukunft noch genauer untersucht werden.

2.4 Regulation der zellulären Ca^{2+} -Homöostase

Wie eingangs bereits erwähnt, übt Ca^{2+} als Second messenger seine zellulären Effekte über einen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aus. Für nahezu alle Zellen ist die Aufrechterhaltung niedriger intrazellulärer Konzentrationen freier Ca^{2+} -Ionen ($< 5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) kennzeichnend, so dass eine schnelle Zunahme als funktionelles Signal interpretiert werden kann (NEMERE und NORMAN 1991). Außerdem wirken sich zu hohe $[\text{Ca}^{2+}]_i$ toxisch auf die Zelle aus, so dass gegenregulatorische Mechanismen, wie die Ausschleusung oder die subzelluläre Kompartimentierung von Ca^{2+} dazu beitragen, die Zellfunktionen aufrechtzuerhalten. Auch wurde bestimmten Proteinen, wie z.B. dem ubiquitär vorkommenden Calmodulin, die Funktion intrazellulärer Ca^{2+} -Puffer zugesprochen (CARAFOLI 1987). Besonders Zellen mit einer hohen Absorptionsaktivität, wie z.B. intestinale Epithelzellen, die mit hohen Ca^{2+} -Konzentrationen konfrontiert werden, brauchen zusätzliche zytosolische Puffer für freie Ca^{2+} -Ionen. Es wurde angenommen, dass hier neben Calmodulin besonders das Calbindin- $\text{D}_{9\text{K}}$ diese Funktion übernimmt (NEMERE und NORMAN 1991). Im Intestinum von Wirbeltieren gibt es zwei verschiedene calcitriolabhängige Calbindinformen, die durch die Bindung von Calcitriol an einen kernständigen Vitamin D-Rezeptor (VDR) gebildet werden (NORMAN et al. 1998). Im Vogeldarm wurde das Calbindin- $\text{D}_{28\text{K}}$ nachgewiesen, ein Protein mit einer relativen Molekülmasse von 28000 (WASSERMAN und TAYLOR 1966). Im Säugerdarm fand man ein entsprechendes Protein mit einer Molekülmasse von 9000, das Calbindin- $\text{D}_{9\text{K}}$ (WASSERMAN 1992, JOHNSON und KUMAR 1994). Im Intestinaltrakt von Hühnern, Ratten und anderen Spezies wurden die höchsten Calbindin- $\text{D}_{28\text{K}}$ - bzw. Calbindin- $\text{D}_{9\text{K}}$ -Konzentrationen jeweils im Duodenum gefunden (TAYLOR und WASSERMAN 1967, MORIUCHI et al. 1975). Auch andere Gewebe, die spezifische VDR besitzen, wie z.B. Niere, Knochen oder Haut, enthalten Calbindine (NORMAN et al. 1982).

Die Bedeutung von Calbindin- $\text{D}_{9\text{K}}$ für die Regulation der Konzentration der freien zytosolischen Ca^{2+} -Ionen konnte von SCHRÖDER et al. (1996) an isolierten

Enterozyten des Dünndarmes von Absetzferkeln gezeigt werden. Die Enterozyten stammten von Absetzferkeln mit physiologischen Calbindin-D_{9k}-Konzentrationen und von Absetzferkeln mit erblich bedingt niedrigen Calbindin-D_{9k}-Konzentrationen. Nach Stimulation der Enterozyten mit Theophyllin, einem Sekretagogum, welches im Intestinum von Schweinen zu einer erhöhten Cl⁻-Sekretion führt (SCHRÖDER et al. 1991), wurde die intrazelluläre [Ca²⁺]_i ermittelt. Diese war bei den Absetzferkeln mit Calbindin-D_{9k}-Mangel um ein Vielfaches höher als bei den Kontrolltieren.

2.5 Mechanismen des intestinalen Ca²⁺-Transportes

Zahlreiche Untersuchungen bei Schweinen haben gezeigt, dass der vordere Dünndarm den Hauptort des calcitriolabhängigen intestinalen Ca²⁺-Transportes darstellt (RADDE et al. 1980, FOX et al. 1985, KAUNE et al. 1992, SCHRÖDER et al. 1994, SCHRÖDER et al. 1998a). Prinzipiell kann Calcitriol seine Effekte über langsame, zellkernvermittelte (Stunden bis Tage) oder schnelle, nicht-genomische Mechanismen, so genannte „Fast responses“ (Sekunden bis Minuten), vermitteln. Die langsamen Zellantworten werden durch Bindung von Calcitriol an einen kernständigen VDR sowie genomische Interaktion und anschließende Produktion von Effektorproteinen ausgelöst (NORMAN et al. 1998). Das calcitriolinduzierte Genprodukt Calbindin („Ca²⁺-binding protein“) ist auf bisher nicht genau bekannte Weise an der Regulation aktiver transzellulärer Transportprozesse von Ca²⁺ beteiligt. Während seit langem schon viel über den Ablauf des genomvermittelten Ca²⁺-Transportes bekannt ist, wurden die „Fast response“-Effekte von Calcitriol erst im Laufe der letzten Jahre beschrieben. Der genaue Mechanismus ist noch nicht geklärt. Es wurde jedoch ein membranständiger VDR postuliert und später auch aus Hühnerenterozyten isoliert, dessen Bindung mit dem Seco-Steroidhormon zu einer schnellen Zellantwort führt (NEMERE et al. 1994, NEMERE et al. 1998). Für die auf

diesem Weg durch Calcitriol stimulierte aktive Ca^{2+} -Absorption im Dünndarm von Hühnern wurde der Begriff „Transcaltachia“ geprägt (NEMERE und NORMAN 1990). Im Folgenden sollen zunächst die passiven Mechanismen und dann die aktiven, genomvermittelten sowie die nicht-genomischen Mechanismen des intestinalen Ca^{2+} -Transportes näher beschrieben werden.

2.5.1 Parazellulärer Ca^{2+} -Transport

Der parazelluläre Ca^{2+} -Transport verläuft passiv und beruht auf einem nicht-sättigbaren, energieunabhängigen Prozess. Passive Transportmechanismen finden sich vor allem im distalen Dünndarm (NELLANS 1990, BRONNER 1992), können aber bei entsprechender Ca^{2+} -Konzentration im gesamten Dünndarm in etwa gleichem Ausmaß stattfinden (PANSU et al. 1983b). So wurde angenommen, dass er gegenüber dem transzellulären Transport stark ansteigt, wenn der Ca^{2+} -Gehalt in der Diät vergleichsweise hoch ist (NELLANS 1990). Es wurde geschätzt, dass unter diesen Bedingungen sein Anteil am Ca^{2+} -Gesamttransport bis zu 50 % betragen kann (NELLANS 1988). Sein Anteil am jeweiligen Gesamttransport ist, neben dem Ca^{2+} -Gehalt der aufgenommenen Diät, hauptsächlich abhängig von der Lokalisation des untersuchten Darmabschnittes und damit von der jeweiligen Aufenthaltsdauer und der vorherrschenden transmuralen Potenzialdifferenz. Die Regulationsmechanismen (wenn vorhanden) sind noch wenig erforscht. So gibt es über die Bedeutung von Calcitriol für den parazellulären Ca^{2+} -Transport gegensätzliche Auffassungen. In-situ-Untersuchungen an ligierten Darmschlingen von Ratten haben gezeigt, dass neugeborene Ratten bis zum 3. Tag p.p. Ca^{2+} fast ausschließlich auf parazellulärem Wege transportieren. Das Ausmaß des parazellulären Transportes nahm bis zum 35. Tag p.p. ab und stagnierte anschließend auf diesem Niveau. Parallel zur Abnahme der passiven Komponente kam es zu einer Zunahme der aktiven, sättigbaren Komponente des Ca^{2+} -Transportes, die mit einem Anstieg des Calbindingehaltes im Gewebe korreliert war

(PANSU et al. 1983a,b). Andere Studien mit so genannten „inside-out“ gerichteten Dünndarmschlingen von Ratten haben gezeigt, dass die sättigbare Komponente calcitriolabhängig ist und ebenfalls ein Zusammenhang zum Anstieg des Calbindingehaltes besteht (HALLORAN und DE LUCA 1980). Diese Befunde führten auch zu dem Schluss, dass es sich bei dem nicht-sättigbaren, parazellulären Ca^{2+} -Transport um einen calcitriolunabhängigen Prozess handeln muss.

In einer weiteren Studie wurde dagegen die mögliche Beteiligung von Calcitriol am parazellulären Ca^{2+} -Transport postuliert (KARBACH 1992). So wurde bei Fluxratenmessungen an Dünndarmepithelien von Ratten beobachtet, dass Calcitriol sowohl die unidirektionalen Ca^{2+} -Fluxraten als auch die Fluxraten des Parazellulärmarkers Mannit in dem selben Maße stimulierte. Dies wurde auf eine mögliche calcitriolinduzierte Veränderung der chemischen Struktur der Tight junctions zurückgeführt, die eine Zunahme der parazellulären Transportraten ermöglichte.

Auch über die Beteiligung von Kohlenhydraten, wie z.B. Lactose, am parazellulären Ca^{2+} -Transport gibt es gegensätzliche Auffassungen. Während einige Untersuchungen bei neugeborenen Kindern keinen Zusammenhang zwischen der Aufnahme von Kohlenhydraten und parazellulären Transportprozessen ergaben (WIRTH et al. 1990), wurde in anderen Arbeiten ein Einfluss von Kohlenhydraten beobachtet (STATHOS et al. 1996). Treibende Kraft für diese passive Aufnahme ist der Solvent-drag-Mechanismus, der aufgrund geringer Dichtigkeit der Interzellularräume im Dünndarm erleichtert wird. Dabei wird z.B. aufgrund eines transzellulären Symportes von Na^+ mit bestimmten Zuckern oder auch Aminosäuren ein elektrischer Gradient aufgebaut, der zu einer Erhöhung der parazellulären Cl^- -Aufnahme führt. Der auf diese Weise entstandene osmotische Gradient bewirkt einen Einstrom von H_2O in die Interzellularräume, mit dem auch Ca^{2+} -Ionen passiv transportiert werden könnten.

2.5.2 Transzellulärer Ca^{2+} -Transport

2.5.2.1 Genomischer Mechanismus der aktiven Ca^{2+} -Absorption

Der aktive Transport von Ca^{2+} -Ionen durch die Enterozyten ist ein sättigbarer Prozess, bei dem Ca^{2+} auf transzellulärem Wege transportiert wird. Vor allem, wenn die alimentäre Ca^{2+} -Aufnahme gering ist, gewinnt dieser Weg der Ca^{2+} -Absorption an Bedeutung (BRONNER et al. 1986).

Es entspricht der allgemeinen Auffassung, dass sich der transzelluläre Ca^{2+} -Transport aus mindestens drei Einzelschritten zusammensetzt: 1.) dem Eintritt von luminalem Ca^{2+} durch die Bürstensaummembran entlang eines elektrochemischen Gradienten, 2.) dem Transport durch das Zytosol von der apikalen zur basolateralen Seite der Enterozyten und 3.) der Ausschleusung aus der Zelle durch die basolaterale Membran gegen einen elektrochemischen Gradienten (BRONNER et al. 1986, VAN OS 1987, BRONNER 1988). Der genaue Mechanismus und die Rolle von Calcitriol an diesen Prozessen wird zumindest teilweise noch kontrovers diskutiert.

1. Schritt: Eintritt von Ca^{2+} durch die Bürstensaummembran

Der Ca^{2+} -Gehalt im Darmlumen ist variabel, da er von der Zusammensetzung der aufgenommenen Nahrung abhängt, liegt aber in der Regel im millimolaren Bereich (FULLMER 1992). In der Epithelzelle ist der Ca^{2+} -Gehalt dagegen um den Faktor 1000 bis 10000 niedriger (SCHRÖDER et al. 1996). Außerdem liegt eine Potenzialdifferenz von -50 mV (Zellinneres negativ) über der apikalen Membran, so dass Ca^{2+} -Ionen entlang ihres elektrochemischen Gradienten durch die Bürstensaummembran in die Zelle gelangen. Untersuchungen an isolierten Bürstensaummembranvesikeln des Dünndarmes von Hühnern, Ratten und

Schweinen und auch beim Menschen haben gezeigt, dass dieser Schritt keine Energie erfordert (GHISHAN et al. 1989, SCHEDL et al. 1990, KAUNE et al. 1992). Als Mechanismen für den Durchtritt von Ca^{2+} -Ionen durch die apikale Bürstensaummembran wurden neben Ca^{2+} -Kanälen andere Bürstensaummembranproteine sowie der Einfluss der Lipidzusammensetzung der Membran diskutiert:

Ca^{2+} -Kanäle

Eine mögliche Beteiligung spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanäle, wie sie bereits von erregbaren Zellen bekannt waren, wurde unter Verwendung spezifischer Ca^{2+} -Kanal-Blocker, wie z.B. Verapamil (Antagonist von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen) untersucht. So konnte ein durchschnittlich 45 % betragender inhibitorischer Effekt von Verapamil ($1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) auf die Ca^{2+} -Aufnahme in intestinale Bürstensaummembranvesikel von Ratten demonstriert werden (MILLER und BRONNER 1981). Fluxratenmessungen an intakten Darmepithelien von Ratten zeigten, dass Verapamil erst bei vergleichsweise hohen Konzentrationen ($5 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) die Ca^{2+} -Absorption signifikant verringerte und deshalb wurde diskutiert, dass dieses auf unspezifische Verapamil-Effekte auf das Epithel zurückzuführen sein könnte. Diese Befunde sprachen also eher gegen die Existenz solcher Ca^{2+} -Kanäle in der intestinalen Bürstensaummembran, wie sie für erregbares Gewebe beschrieben wurden. Auf dieses wirkten nämlich schon sehr niedrige Kanalblocker-Konzentrationen von ca. $10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (FAVUS und ANGEID-BACKMAN 1985). Die Existenz von Ca^{2+} -Kanälen mit anderen Eigenschaften konnte hiermit jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Interessanterweise konnten KAUNE et al. (1992) zeigen, dass sich die Ca^{2+} -Aufnahme in duodenale Bürstensaummembranvesikel von Absetzferkeln mit physiologischen Calcitriolplasmaspiegeln durch Verapamil-Applikation in pharmakologischen Dosen hemmen ließ, während das bei identischen Präparationen von Ferkeln mit unphysiologisch niedrigen Calcitriolplasmagehalten nicht stattfand. Aus diesen Befunden postulierten die Autoren eine Beteiligung von Ca^{2+} -Kanälen am intestinalen Ca^{2+} -Transport. Aktuelle Studien am Dünndarm des Kabeljaus (*Gadus morhua*), bei denen in der Bürstensaummembran

spannungsgesteuerte, dihydropyridinsensitive Ca^{2+} -Kanäle nachgewiesen wurden, konnten diese Annahme stützen (LARSSON et al. 1998).

In aktuellen Studien konnte erstmals ein intestinaler Ca^{2+} -Kanal, der ECaC genannt wurde, kloniert werden (HOENDEROP et al. 1999a,b). ECaC wird im proximalen Dünndarm des Kaninchens, aber auch in den distalen Abschnitten des Nephrons und in der Placenta exprimiert, also in calcitriolabhängigen Geweben. Die ECaC-mRNA-Gehalte waren im Duodenum am höchsten, nahmen im Verlauf des Jejunums ab und lagen im Ileum und im Colon unter der Nachweisgrenze. In *Xenopus laevis* Oozyten exprimierte ECaC zeigten eine apparente Ca^{2+} -Affinität (K_m) von ca. $0,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (HOENDEROP et al. 1999a), was in derselben Größenordnung liegt, wie die mit duodenalen Bürstensaummembranen von Absetzferkeln für die Kinetik der Ca^{2+} -Aufnahme gefundenen Werte (KAUNE et al. 1992). Membrandepolarisation durch eine „ K^+ -Klemme“ hatte ebenso wenig Einfluss auf die ECaC-vermittelte Ca^{2+} -Aufnahme in die Oozyten, wie die extrazelluläre Applikation von $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ m-Verapamil. In einer weiteren Arbeit wurden die elektrophysiologischen Eigenschaften des *Xenopus*-exprimierten ECaC näher charakterisiert (HOENDEROP et al. 1999b). Dabei zeigte sich eine hyperpolarisationsabhängige Aktivierung, eine Ca^{2+} -sensitive Regulation der Kanalleitfähigkeit und eine Abnahme der Aktivität nach mehrmaliger Stimulation. Die Autoren leiten daraus ab, dass die Kanal-Eigenschaften mit der postulierten Funktion des apikalen Ca^{2+} -Eintritts in die Zelle als geschwindigkeitslimitierender Schritt des gesamten transzellulären Ca^{2+} -Transportes in Einklang stehen.

Ein Ca^{2+} -Transportprotein mit 75 %iger Aminosäuresequenz-Homologie zum ECaC wurde kürzlich aus dem Dünndarm von Ratten kloniert und als CaT1 bezeichnet (PENG et al. 1999). Eine Northern Blot-Analyse zur Gewebeverteilung von CaT1-mRNA zeigte seine Präsenz im Duodenum, proximalen Jejunum, Caecum und Colon, nicht jedoch im Magen, restlichen Jejunum und Ileum. Auch im Nierenepithel konnte CaT1 nicht nachgewiesen werden. Die CaT1-mRNA-Gehalte im Duodenum wurden durch Behandlung der Ratten mit Calcitriol oder Fütterung mit einem Ca^{2+} -armen Futter nicht beeinflusst. Diese Befunde decken sich mit früheren Annahmen,

dass der apikale Ca^{2+} -Eintritt nicht substanziell durch Calcitriol reguliert wird (MILLER und BRONNER 1981, FAVUS und ANGEID-BACKMAN 1985).

In Übereinstimmung mit den funktionellen Eigenschaften des ECaC weist CaT1 eine apparente K_m von ca. $0,4 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ auf. CaT1-vermittelter Ca^{2+} -Transport ist elektrogen und spannungsabhängig, weist jedoch in seinem kinetischen Verhalten gegenüber membranpotenzialgesteuerten Ca^{2+} -Kanälen relevante Unterschiede auf, so dass PENG et al. (1999) den CaT1 als evolutionären Übergang zwischen Kanal und Uniporter („erleichterte Diffusion“) bezeichnen.

Zusammenfassend lässt sich jedoch festhalten, dass für inzwischen drei Wirbeltierspezies eindeutige Hinweise auf eine wesentliche Beteiligung von Ca^{2+} -Kanälen am apikalen Ca^{2+} -Eintritt vorliegen.

Bürstensaummembranproteine

Auch einigen „Nicht-Kanal“-Bürstensaummembranproteinen wird die Beteiligung am Ca^{2+} -Eintritt durch die apikale Membran der Enterozyten zugesprochen. So wurde aus intestinalen Bürstensaummembranen von Ratten ein Ca^{2+} -bindender Komplex isoliert, dessen Konzentration durch Calcitriolrepletion oder bei Ca^{2+} -armer Ernährung anstieg (KOWARSKI und SCHACHTER 1980, SCHACHTER und KOWARSKI 1982). Dieser Proteinkomplex wurde als IMCal („intestinal membrane Ca^{2+} -binding protein“) bezeichnet.

Als weiteres Protein, das die Aufnahme von Ca^{2+} -Ionen an der apikalen Membran beeinflusst, wurde Calmodulin beschrieben, denn Versuche an Bürstensaummembranvesikeln von Hühnern haben gezeigt, dass die Ca^{2+} -Aufnahme in die Bürstensaummembranen durch Calmodulin-Antagonisten gehemmt werden kann (BIKLE und MUNSON 1985). Die apikale Membran der Enterozyten des Dünndarms ist zur Vergrößerung der Oberfläche in zahlreiche Mikrovilli aufgefaltet, die eine Länge von 0,5 bis 1,5 μm haben und etwa 0,1 μm dick sind. Das Zytoskelett dieser Mikrovilli besteht aus filamentösem Aktin, welches durch ein spezielles 110 kD-Calmodulinbindungsprotein mit der Membran verbunden ist, sowie weiteren speziellen Proteinen wie Villin und Fimbrin (MOOSEKER et al. 1984, MOOSEKER 1985) Calmodulin ist an dieses als Myosin I bezeichnete

Bürstensaummembranprotein gebunden (BIKLE et al. 1991). Calcitriol erhöhte den Anteil des membrangebundenen Calmodulins, ohne den Gesamtcaldmodulin-Gehalt der Zelle zu verändern (BIKLE und MUNSON 1985). Und schließlich war der Anteil an bürstensaummembran-assoziiertem Calmodulin positiv mit der apikalen Ca^{2+} -Aufnahme korreliert (KAUNE et al. 1994).

Membranfluidität

Immer wieder wurde in der Vergangenheit auch eine Vitamin D-abhängige Beeinflussung der Membranpermeabilität als wesentlicher Faktor zur Kontrolle des apikalen Ca^{2+} -Eintritts genannt (RASMUSSEN et al. 1982, FULLMER 1992). Die Steigerung der Permeabilität der Bürstensaummembran durch Calcitriol soll danach auf einer Veränderung der Lipidzusammensetzung der Membran beruhen (FONTAINE et al. 1981, MATSUMOTO et al. 1981). In einigen Arbeiten konnte eine Änderung des Fettsäurenusters in Abhängigkeit vom Vitamin D-Status gezeigt werden. So wurde in den Enterozyten von Vitamin D-defizienten Ratten schon 3 Stunden nach Calcitriolgabe z.B. eine deutliche Aktivitätssteigerung der Phospholipase A_2 und der Lysophosphatidyl-Cholin-Acetyltransferase um das 2-3fache gemessen (O'DOHERTY 1978). Eine calcitriolinduzierte Zunahme des Membranphospholipid-Phosphors und Änderungen der Fettsäurenzusammensetzung in der Phosphatidyl-Fraktion konnte auch an isolierten Bürstensaummembranvesikeln von Hühnern demonstriert werden (MAX et al. 1978). Neuere Untersuchungen, die ebenfalls calcitriolbedingte Veränderungen der Phospholipidzusammensetzung in der Bürstensaummembran zeigen konnten, decken sich mit diesen Befunden (MATSUMOTO et al. 1981).

Die beobachteten Veränderungen des Fettsäurenusters der apikalen Membran führten zu der Annahme, dass die calcitriolinduzierte Zunahme der Bürstensaummembranpermeabilität auf einer Änderung der Membranfluidität beruht. Elektronenmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen erbrachten keinen Hinweis auf Änderungen der Membranfluidität nach Vitamin D-Applikation (PUTKEY et al. 1982). Dahingegen haben BRASITUS et al. (1986) die „statische“ und die „dynamische“ Komponente der Membranfluidität bei

calcitrioldefizienten Ratten und bei Ratten mit physiologischem Calcitriolstatus untersucht. Die so genannte „statische“ Komponente, die über eine „steady-state“-Fluoreszenztechnik bestimmt wurde, stellte sich bei beiden Gruppen gleich dar. Die „dynamische“ Komponente, die mit Hilfe von Stearinsäuren bestimmt wurde, war bei den calcitrioldefizienten Ratten herabgesetzt. Bei diesen Tieren wurde ebenfalls ein abweichendes Fettsäurenmuster der Membran festgestellt. Nach Applikation von Calcitriol passten sich die „dynamische“ Komponente der Membranfluidität und auch die Fettsäurezusammensetzung den Werten der Kontrolltiere an. Da neben diesen Veränderungen nach Calcitriolrepletion auch ein zunehmender Ca^{2+} -Transport beobachtet wurde, wurde ein Zusammenhang zwischen der Ca^{2+} -Aufnahme an der Bürstensaummembran und den calcitriolinduzierten Änderungen der Fluidität und der Lipidstruktur vermutet.

Neuere Untersuchungen an intestinalen Bürstensaummembranvesikeln von Ratten mit physiologischen Calcitriolspiegeln im Plasma, die mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren in Form von Fisch- oder Schlüsselblumenöl supplementiert wurden, decken sich mit dieser Vermutung. Die Vesikel der supplementierten Ratten zeigten einen wesentlich höheren Ca^{2+} -Transport als die der ungesupplementierten, bzw. mit Sonnenblumen- oder Kokosnussöl supplementierten Tiere. Hieraus wurde abgeleitet, dass mehrfach ungesättigte Fettsäuren möglicherweise in der Lage sind, über eine Veränderung der Membranfluidität den Ca^{2+} -Transport zu beeinflussen (COETZER et al. 1994).

2. Schritt: Transport von Ca^{2+} durch das Zytosol

Da, wie schon beschrieben, die freie Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol im nanomolaren Bereich reguliert werden muss, ist eine freie Diffusion von Ca^{2+} -Ionen durch das Zytosol wenig wahrscheinlich. Im Dünndarm von Ratten konnte gezeigt werden, dass der transzelluläre Ca^{2+} -Transport positiv mit dem zytosolischen Calbindingehalt korreliert ist (BRONNER et al. 1986, PANSU et al. 1989). Das Calbindin- $\text{D}_{9\text{K}}$ der

Säugereenterozyten ist in der Lage pro Molekül zwei Ca^{2+} - Ionen zu binden (FULLMER et. al. 1985). Schätzungen aus Versuchen mit „inside-out“ gerichteten Dünndarmsäckchen von Ratten ergaben, dass Ca^{2+} in Anwesenheit von Calbindin ungefähr um das 70fache schneller von der apikalen zur basolateralen Membran der Zelle transportiert wird als bei freier Diffusion in Abwesenheit des Proteins. Diese Kalkulation führte zu der Annahme, dass nicht die apikale Ca^{2+} -Aufnahme sondern die Ca^{2+} -Transzytose der limitierende Schritt bei der Ca^{2+} -Absorption ist (BRONNER et al. 1986). Ob dabei Ca^{2+} -Ionen mit dem Calbindin-Molekül, an das sie zuerst gebunden wurden, durch die Zelle transportiert werden oder ähnlich wie Elektronen in einem elektrischen Leiter an einer gedachten „Calbindin-Kette“ durch die Zelle von der luminalen zur contraluminalen Seite „fließen“, wird noch diskutiert (KAUNE 1992).

In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, dass Hinweise dahingehend vorliegen, dass auch zytosolische Vesikel und Elemente des Zytoskeletts am Ca^{2+} -Transport beteiligt sein können.

Bei subzellulärer Fraktionierung von Mukosahomogenaten calcitriolrepletierter Hühner, deren Dünndarm in vivo mit ^{45}Ca inkubiert wurde, fand man die höchste spezifische ^{45}Ca -Aktivität in der lysosomalen Zellfraktion und in endozytierten Vesikeln. In dieser Fraktion war außerdem Calbindin gegenwärtig, was zu dem Schluss führte, dass Calbindin mit den Membranen assoziiert sein könnte. Die ^{45}Ca Aktivität in der zytosolischen Fraktion war nur gering (NEMERE et al. 1986, NEMERE und NORMAN 1988). Der Anstieg an vesikulärem Ca^{2+} konnte in Gegenwart von Calcitriol stimuliert werden und war gleichzeitig mit einer Zunahme des intestinalen Ca^{2+} -Transportes korreliert (NEMERE und NORMAN 1988). Die Zugabe von Chloroquin, einem Antagonisten der Lysosomen, reduzierte den Ca^{2+} -Transport signifikant (NEMERE et al. 1986). Aus den Befunden entstand die Hypothese, dass Ca^{2+} -Ionen an der intestinalen Bürstensaummembran in Vesikel „verpackt“ werden. Die endozytierten Vesikel können mit Lysosomen verschmelzen und werden in dieser Form zur basolateralen Membran transportiert, wo die Ca^{2+} -Ionen schließlich die Zelle verlassen können. Einen direkten Beweis für diese

Hypothese gibt es aber bis heute nicht. Welchen Anteil der vesikuläre Ca^{2+} -Transport am Gesamttransport im Intestinum hat und welche Rolle Calcitriol und Calbindin dabei spielen ist bis heute nicht geklärt.

Die Beteiligung von Strukturelementen des Zytoskeletts am transzellulären Ca^{2+} -Transport wurde unter Verwendung von Inhibitoren, wie z.B. Colchicin oder Cytochalasin B, getestet. Colchicin verhindert durch seine Bindung an Tubulin die Polymerisation von Mikrotubuli (SKOUFIAS und WILSON 1992). Im Duodenum von 3-6 Wochen alten Hühnern konnte gezeigt werden, dass Colchicin die calcitriolstimulierte Aufnahme von Ca^{2+} hemmen konnte (NEMERE et al. 1984). Studien bei Ratten zur Untersuchung der Wirkung von Colchicin und Cytochalasin B, das als Inhibitor der Mikrofilamentorganisation verwendet wurde, auf die Ca^{2+} -Akkumulation in Enterozyten haben demonstriert, dass beide Substanzen die Ca^{2+} -Aufnahme in das Gewebe inhibieren (NASSAR et al. 1988). Dieser Effekt wurde in erster Linie auf den Zusammenhang eines möglichen Ca^{2+} -Rezeptors in der Bürstensaummembran mit Elementen des Zytoskeletts und dessen Dislokation nach Inkubation mit Colchicin, bzw. Calcitriol zurückgeführt.

Untersuchungen mit calcitriolrepletierten Hühnern konnten zeigen, dass ein Zusammenhang zwischen Calbindin- $\text{D}_{28\text{K}}$ und den Mikrotubuli besteht (NEMERE et al. 1991). Nach dem Einsetzen des calcitriolstimulierten Ca^{2+} -Transportes rückten sowohl Calbindin- $\text{D}_{28\text{K}}$ als auch Tubulin von der Bürstensaummembran zur Villusmitte. Wurden die Tubuli zuvor jedoch einer Kältepolymerisation unterzogen, war dieser Effekt nicht zu beobachten. Elektronenmikroskopisch konnte Calbindin in Vesikeln mit Lysosomen-ähnlicher Struktur nachgewiesen werden. Biochemisch wurde eine vermehrte Bindung von Calbindin- $\text{D}_{28\text{K}}$ an Tubulin nach der Stimulation des Ca^{2+} -Transportes festgestellt. Für eine funktionelle Verknüpfung dieser beiden Proteine spricht auch das ontogenetisch gleichzeitige Auftreten von Tubulin am 20. Tag p.p. und von Calbindin am 21. Tag p.p. (NEMERE et al. 1992).

Inwieweit Calcitriol einen Einfluss auf die Tubulin-Synthese hat ist nicht geklärt. Untersuchungen bei Hühnern haben jedoch gezeigt, dass calcitrioldefiziente Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren einen niedrigeren Gesamttubulin-Gehalt in den Enterozyten aufwiesen (NEMERE et al. 1987).

Mit Hilfe der Ussing-Kammer-Technik wurde auch an Dünndarmepithelien von Schweinen die Beteiligung des Zytoskeletts am intestinalen Ca^{2+} -Transport untersucht. Bei neugeborenen Ferkeln führte Colchicin zu einer signifikanten Hemmung der aktiven Ca^{2+} -Absorption im Dünndarm um etwas mehr als 30 %, während bei den älteren Ferkeln ein entsprechender Effekt ausblieb. Ähnliche, wenn auch statistisch nicht gesicherte Befunde ergaben sich nach Zugabe von Latrunculin B, einem Aktinfilament-Antagonisten (SCHRÖDER et al. 1998a). Diese Ergebnisse bei neugeborenen Ferkeln weisen also ebenfalls auf die Beteiligung des Zytoskeletts am intestinalen Ca^{2+} -Transport hin.

Zukünftige Untersuchungen müssen zeigen, welcher genaue Zusammenhang zwischen der Rolle des Zytoskeletts und dem vesikulären Ca^{2+} -Transport besteht und ob es altersbedingte Unterschiede gibt.

3. Schritt: Ausschleusung von Ca^{2+} durch die basolaterale Membran

Die Ausschleusung von Ca^{2+} -Ionen an der basolateralen Membran der Enterozyten erfolgt gegen einen elektrochemischen Gradienten und wird hauptsächlich über eine basolaterale Ca^{2+} -ATPase vermittelt (GHIJSEN et al. 1986, WASSERMAN et al. 1992a). Die Transportaktivität der Ca^{2+} -Pumpe kann durch Calmodulin gesteigert werden (GHIJSEN et al. 1986). Der spezifische Einfluss von Calcitriol ist noch nicht geklärt. In einigen Versuchen mit basolateralen Membranvesikeln von Enterozyten aus dem Dünndarm von Ratten und Schweinen hatte Calcitriol keinen Einfluss auf den ATP-abhängigen Ca^{2+} -Transport (VAN CORVEN et al. 1987, KAUNE et al. 1990b). Andere Arbeiten hingegen fanden in duodenalen Enterozyten Vitamin D-repletierter Hühner einen Anstieg der Aufnahme rate für Ca^{2+} in „inside-out“-gerichtete basolaterale Vesikel (WASSERMAN et al. 1992a) und einen Anstieg der basolateralen ATPase-Aktivität um das 3fache (WASSERMAN et al. 1992b).

Neben der ATP-abhängigen Ca^{2+} -Pumpe trägt vermutlich ein $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher zur Ausschleusung der Ca^{2+} -Ionen bei, allerdings zu einem wesentlich geringeren

Anteil (VAN OS 1987). Es wurde geschätzt, dass im Vergleich zur Ca^{2+} -Pumpe die Transportkapazität des Austauschers nur etwa 20 % beträgt (GHIJSEN et al. 1983). Der Mechanismus beruht dabei auf dem sekundär aktiven Austausch von Ca^{2+} -Ionen gegen Na^+ -Ionen. Ein Effekt von Calcitriol auf die Aktivität des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers konnte bislang nicht gezeigt werden (GHIJSEN et al. 1983).

Ob basolaterale Ca^{2+} -Kanäle für die Ausschleusung von Ca^{2+} von Bedeutung sind, ist nicht näher bekannt. Allerdings konnten mit verschiedenen Ca^{2+} -Kanalblockern zwei Typen von spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanälen in Basolateralmembranen des Ileums von Kaninchen gezeigt werden (HOMAIDAN et al. 1989).

Neben den „klassischen“ aktiven Mechanismen zur Ausschleusung von Ca^{2+} aus der Zelle in die extrazelluläre Flüssigkeit muss, besonders im Hinblick auf die Diskussion über einen vesikulären Ca^{2+} -Transport, die Möglichkeit der Ausschleusung auf dem Weg der Exozytose bedacht werden (NEMERE et al. 1986, WASSERMAN et al. 1992a).

2.5.2.2 Nicht-genomischer Mechanismus der aktiven Ca^{2+} -Absorption: „Transcaltachia“

Die Beobachtung, dass isolierte Epithelzellen von Küken und Ratten auf niedrige Calcitriolgaben innerhalb von 5-30 min mit einer stimulierten Ca^{2+} -Aufnahme und einem Anstieg lysosomaler Enzyme reagierten, führte erstmals zu der Annahme, dass nicht-genomische Mechanismen an diesem Prozess beteiligt sind (GOODMAN et al. 1972, NEMERE und SZEGO 1981a,b, RASMUSSEN et al. 1982). Für den „Fast response“ des intestinalen Ca^{2+} -Transportes wurde der Begriff „Transcaltachia“ (in Anlehnung an Tachykardie) geprägt. Der Transcaltachia-Mechanismus konnte bei Hühnern, ähnlich wie bei dem schon vorher beschriebenen vesikulären Ca^{2+} -Transport, durch den Mikrotubuli-Antagonisten Colchicin, aber auch durch Leupeptin, einen Antagonisten des lysosomalen Cathepsin B, gehemmt werden (NEMERE und NORMAN 1987). Diese Befunde führten zu der Hypothese,

dass in diesem Fall ebenfalls sowohl Lysosomen als auch das Zytoskelett für den Ablauf der Transcaltachia von Bedeutung sind. Dabei soll Ca^{2+} über Endozytose in die Zelle gelangen. Dort sollen die Ca^{2+} -haltigen endozytierten Vesikel mit Lysosomen verschmelzen und entlang der Mikrotubuli zur basolateralen Seite der Enterozyten wandern. Anschließend erfolgt eine Fusion der Vesikel mit der Basolateralmembran und die Ausschleusung mittels Exozytose. Die Exozytose soll durch die Bindung von Calcitriol an einen Membranrezeptor an der basolateralen Membran stimuliert werden (NEMERE und NORMAN 1988, NEMERE und NORMAN 1989, NEMERE et al. 1998).

Es wird angenommen, dass die Bindung von Calcitriol an den membranständigen VDR zu einer Reihe von weiteren Signalübertragungsprozessen führt. Dazu gehört die G-Protein gekoppelte Aktivierung der Proteinkinase A und der Phospholipase C, sowie die Öffnung von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen in der Basolateralmembran und die Aktivierung der Adenylatcyclase (ZANELLO et al. 1997). Die resultierende Zunahme an freiem Ca^{2+} im Zytosol fördert möglicherweise die Exozytose von Ca^{2+} -haltigen Vesikeln an der Basolateralmembran. Dementsprechend konnte an perfundierten Duodenalschlingen calcitriolrepletierter Hühner gezeigt werden, dass Forskolin als ein Aktivator der Adenylatcyclase, 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat als ein Aktivator der Proteinkinase C, Mastoparan als ein G-Protein-Aktivator und BAY K8644 als ein Aktivator spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle jeweils in der Lage sind, den Transcaltachia-Mechanismus in dem selben Maße zu stimulieren, wie physiologische Mengen an Calcitriol (DE BOLAND und NORMAN 1990a, NORMAN 1997). Da BAY K8644 als Ca^{2+} -Kanal-Agonist diesen Vorgang ebenfalls stimuliert und ähnliche Untersuchungen gezeigt haben, dass der Ca^{2+} -Kanal-Antagonist Nifedipine ihn inhibieren konnte, wurde postuliert, dass insbesondere der Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle über spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle in der Basolateralmembran für die Vermittlung des Calcitriol-Effektes entscheidend sein muss (DE BOLAND und NORMAN 1990b).

Neben dem Zielorgan Darm konnten schnelle nicht-genomische Effekte von Calcitriol auch in der Leber (BARAN et al. 1989), in Rattenosteoblasten ROS 17/2.8 (CAFFREY und FARACH-CARSON 1989, BARAN et al. 1991), im Muskel (DE

BOLAND und BOLAND 1993) und in den Zellen der Parathyreoidea (MANDLA et al. 1990) nachgewiesen werden. Über die biologische Relevanz dieses „Fast response“-Mechanismus ist bislang nichts näheres bekannt, er hat aber möglicherweise mit der Feinregulation der Zellantworten zu tun.

2.6 Besonderheiten des transzellulären Ca^{2+} -Transportes bei Saugferkeln

Zahlreiche In-vivo- und In-vitro-Studien an unterschiedlichen Spezies haben sichere Hinweise darauf ergeben, dass der aktive Ca^{2+} -Transport in der frühen postnatalen Lebensphase ein calcitriolunabhängiger Prozess ist.

Unter anderem haben In-vivo-Untersuchungen der Ca^{2+} -Absorption bei Saug- und Absetzferkeln mit einer Pseudo-Vitamin-D-Mangelrachitis Typ I (PVDRI, „Hannoversches Schweinmodell“, LACHENMAIER-CURRLE und HARMEYER 1988) zu dieser Annahme geführt. Hierbei handelt es sich um einen erblichen Defekt, bei dem die renale Produktion von Calcitriol, aufgrund mangelnder Aktivität der renalen 25-HydroxyvitaminD₃-1 α -Hydroxylase, ausbleibt (FOX et al. 1985, WINKLER et al. 1986). Die Ferkel sind bei der Geburt normocalcämisch und die intestinalen Ca^{2+} -Absorptionsraten liegen während der ersten 4 Lebenswochen, trotz reduzierter Plasmacalcitriolspiegel, in derselben Größenordnung wie bei den Kontrolltieren ohne erblichen Defekt (LACHENMAIER-CURRLE und HARMEYER 1988). Mit Beginn der 4. Lebenswoche kommt es bei den PVDRI-Tieren, neben einem nachweislich abnehmenden Ca^{2+} -Transport und einer Hypocalcämie zu deutlich klinischen Symptomen einer Rachitis, wie z.B. Knochendeformation, Muskelschwäche und Inappetenz (HARMEYER und KAUNE 1990). Der renale Defekt der Calcitriolproduktion hat dabei keinen Einfluss auf die Bindungseigenschaften des Calcitriol-Rezeptors (SCHRÖDER et al. 1990). Pharmakologische Dosen von Vitamin D₃ können bei PVDRI-Tieren den Calcitriolspiegel wieder auf Normalwerte anheben, vermutlich aufgrund der Wirkung

unspezifischer, extrarenaler 1α -Hydroxylasen (WINKLER et al. 1986, KAUNE et al. 1990a). Die ursprünglich vertretene Meinung, dass in der frühen postnatalen Phase passive Mechanismen für den Ca^{2+} -Transport verantwortlich sind, basiert auf Versuchen mit neugeborenen Ratten (HALLORAN und DE LUCA 1980, PANSU et al. 1983a). Bei diesen Tieren wurde keine sättigbare Komponente der Ca^{2+} -Absorption festgestellt, außerdem konnten weder Vitamin D-Rezeptoren noch Calbindin aus der Mukosa isoliert werden. Bei 1 bis 14 Tage alten Saugferkeln wurde Ca^{2+} dagegen nachweislich unter Beteiligung aktiver Mechanismen absorbiert (RADDE et al. 1980). Offen blieb damals, inwieweit eine Regulation durch Calcitriol erfolgte. Dieses wurde später in Ca^{2+} -Fluxratenmessungen mit Dünndarmepithelien von PVDRI-Schweinen näher untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass unabhängig vom Calcitriolplasmaspiegel bei neugeborenen Ferkeln aktive Transportmechanismen für Ca^{2+} existieren, die später im Absetzalter bei PVDRI-Ferkeln verschwinden und damit die aktive Ca^{2+} -Absorption zum Erliegen bringen (SCHRÖDER et al. 1993).

Die Konzentration des intestinalen VDR betrug bei neugeborenen Ferkeln im Vergleich mit abgesetzten Ferkeln nur 1/9 bis 1/6. Trotzdem hatten die neugeborenen Tiere normale Plasmacalciumwerte und keine Anzeichen einer Rachitis (SCHRÖDER et al. 1993). Mit dem niedrigen Plasmacalcitriolspiegel bei PVDRI-Ferkeln waren auch niedrige Calbindin- $\text{D}_{9\text{K}}$ -Gehalte korreliert (SCHRÖDER 1996). Diese Befunde unterstützen die Annahme, dass in der frühen postnatalen Lebensphase aktive calcitriolunabhängige Mechanismen des Ca^{2+} -Transportes vorliegen, die im Laufe der ersten Lebenswochen unter die Kontrolle von Calcitriol gelangen. Die Mechanismen des calcitriolunabhängigen aktiven Ca^{2+} -Transportes im Dünndarm neugeborener Ferkel sind bislang nicht geklärt.

In-vitro-Versuche zum Ca^{2+} -Transport an Dünndarmepithelien neugeborener und wachsender Ferkel in Anwesenheit von Colchicin oder Latrunculin B haben gezeigt, dass das Zytoskelett bei neugeborenen Ferkeln, nicht jedoch bei Absetzferkeln für den transepithelialen Ca^{2+} -Transport von Bedeutung ist (SCHRÖDER et al. 1998a,c). Daraus ergibt sich die Frage, ob möglicherweise der vesikuläre Ca^{2+} -

Transport oder der Transcaltachia-Mechanismus den intestinalen Ca^{2+} -Transport bei neugeborenen Ferkeln erklären kann.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

3.1.1 Kontrollferkel

Bei den Kontrolltieren handelte es sich um Schweine aus Kreuzungen der *Deutschen Landrasse*. Sie stammten aus dem Lehr- und Forschungsgut Ruthe der Tierärztlichen Hochschule Hannover. Die Saugferkel (SF) wurden bis zur Schlachtung bei der Muttersau gehalten und von Sauenmilch ernährt. Die Absetzferkel (AF) waren bis zum Zeitpunkt des Absetzens am Ende der 5. Lebenswoche bei der Muttersau und wurden dann mit handelsüblichem Ferkelaufzuchtfutter gefüttert.

Das durchschnittliche Alter und Gewicht der Saug- und Absetzferkel wird gesondert für die jeweiligen Versuchsabschnitte im Ergebnisteil beschrieben.

3.1.2 Ferkel mit Calcitriolmangel

Bei den Ferkeln mit einem erblichen Calcitriolmangel handelte es sich um Kreuzungen aus *Deutscher Landrasse* und *Göttinger Miniaturschwein*. Sie stammten aus der Zucht des Physiologischen Instituts der Tierärztlichen Hochschule Hannover („Hannoversches Schweinmodell“, HARMEYER et al. 1982). Bis zum Absetzen wurden diese Tiere von Sauenmilch ernährt und anschließend mit handelsüblichem Ferkelaufzuchtfutter gefüttert. Sie werden als calcitrioldefiziente Absetzferkel (AF Def) bezeichnet. Auch hier wird auf das durchschnittliche Alter und Gewicht der Tiere im Ergebnisteil eingegangen.

3.2 Probenentnahmen und Präparation der Darmepithelien

3.2.1 Probenentnahmen

Die Tiere wurden durch Bolzenschuss betäubt und anschließend durch Aufschneiden der Aa. carotides communes entblutet. Gleich im Anschluss erfolgte die Eröffnung der Bauchhöhle und die Entnahme eines 30 cm langen Dünndarmstückes 5 cm distal der Mündung des Ductus pancreaticus accessorius. Hiermit wurden distale Teile des Duodenums und der proximale Anteil des Jejunums entnommen. Um Reste des Darminhaltes zu entfernen wurden die Darmstücke mit eiskalter physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl, w/v) gespült.

Bis zum Beginn der Versuche, nach spätestens 20 min, wurden die Darmstücke in eiskaltem serosalem Inkubationspuffer (Tab. 1) unter ständiger Begasung mit Carbogen (95% O₂/5% CO₂) aufbewahrt.

3.2.2 Präparation der Darmepithelien für die Fluxratenmessungen in den Ussing-Kammern

Für die Fluxratenmessungen in den Ussing-Kammern wurden ca. 3 cm lange Darmsegmente am Mesenterialansatz aufgeschnitten und unter ständiger Befeuchtung mit serosalem Inkubationspuffer (Tab. 1) weiterverarbeitet.

Bei den Absetzferkeln erfolgte nun das so genannte „vollständige Strippen“, bei dem mit Hilfe eines Metallspatels die Darmwand im Bereich der Tunica mucosa, bestehend aus Lamina epithelialis mucosae und Lamina propria mucosae, von der Lamina muscularis mucosae, der Tela submucosa, der Tunica muscularis und von den Resten der Serosa getrennt wurde. Der mukosale Anteil diente für weitere Messungen, während der serosale Anteil verworfen wurde. Bei den Saugferkeln wurde die Darmwand in ihrer Gesamtheit verwendet. Es erfolgte hier nur das

„partielle Strippen“, bei dem lediglich der serosale Mesenterialansatz abgetrennt wurde.

3.3 Messung der unidirektionalen Fluxraten für Ca^{2+} , P_i und Mannit

3.3.1 Pufferlösungen

Tab. 1: Zusammensetzung der Inkubationspufferlösungen für die Messungen der Ca^{2+} -, P_i und Mannit-Fluxraten (in $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$).

Substanz	Ca^{2+} und P_i		Mannit	
	<i>mukosal</i>	<i>serosal</i>	<i>mukosal</i>	<i>serosal</i>
NaCl	113,6	113,6	113,6	113,6
KCl	5,4	5,4	5,4	5,4
HCl (1 N)	0,2	0,4	0,2	0,2
$\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	1,2	1,2	1,2	1,2
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	1,2	1,2	1,2	1,2
NaHCO_3	21,0	21,0	21,0	21,0
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	1,2	1,2	1,5	1,5
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0,3	0,3	-	-
Glucose (wasserfrei)	-	10,0	-	10,0
Mannit	32,0	23,0	2,0	2,0
Hepes	-	-	20,0	7,0
NaOH (2 N)	-	-	6,0	-
Natrium-Glukonat	-	-	-	3,0

Die Zusammensetzungen der Inkubationspuffer für die Messung der Ca^{2+} , P_i - und Mannit-Fluxraten sind in Tab. 1 dargestellt.

Der pH-Wert der Inkubationspuffer stellte sich nach 20minütiger Carbogenbegasung bei 37°C auf pH 7,4 ein. Die Osmolarität lag bei $300 \text{ mosmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Um mögliche Wirkungen von Prostaglandinen auf den Ionentransport des Gewebes gering zu halten, wurde allen Inkubationspuffern der Cyclooxygenase-Hemmer Indomethacin ($0,01 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) zugesetzt (FIELD et al. 1981, SMITH et al. 1981).

3.3.2 Inkubation der Epithelien

Der transepitheliale Transport von Ca^{2+} , P_i und Mannit wurde mit der Ussing-Kammer-Technik gemessen, die ursprünglich von USSING und ZEHRRAHN (1951) für Untersuchungen an der Froschhaut entwickelt wurde und in der Arbeitsgruppe für Messungen mit Darmepithelien von Saug- und Absetzferkeln modifiziert wurde (SCHRÖDER et al. 1998b).

Im Detail standen für jeden Versuchsdurchlauf 12 Ussing-Kammern (Eigenbau des Physiologischen Instituts) zur Verfügung. Zwischen die beiden Hälften dieser aus Plexiglas gefertigten Kammern wurden die präparierten Darmepithelien eingespannt. Eine Hälfte bildete die serosale Seite, die andere Hälfte die mukosale Seite. Es wurden Kammern mit einer offenen Fläche von $1,13 \text{ cm}^2$ verwendet. Bei den teilgestrippten Epithelien der Saugferkel wurde Silikonpaste (Baysilone-Paste mittelviskös, Bayer AG, Leverkusen) zum Abdichten der Kammerränder verwendet. Bei den vollständig gestrippten Epithelien der Absetzferkel wurden die Kammern mit Silikonringen (1 mm breit) auf beiden Seiten des Gewebes abgedichtet und Polyethylenetze (Reichert Chemietechnik, Heidelberg) zur Unterstützung der Epithelien eingelassen. Nach dem Einspannen des Epithels wurde die jeweilige Ussing-Kammer in die Versuchsanordnung eingesetzt und an ein Gasliftsystem angeschlossen, welches aus zwei doppelwandigen Glassäulen bestand. Der äußere Flüssigkeitskreislauf wurde von einem 37°C warmen Wasserbad gespeist, von dem aus das Wasser in die Flüssigkeitsräume der Gaslifte gepumpt wurde, um eine konstante Temperatur zu gewährleisten. Im inneren Kreislauf wurde durch die Begasung mit Carbogen die Sauerstoffversorgung des Gewebes, ein konstanter pH-Wert der Inkubationslösungen und deren gleichmäßige Durchmischung innerhalb

der Flüssigkeitsräume gewährleistet. Die benachbarten Säulen wurden mit je 10 ml serosalem bzw. mukosalem carbogenbegastem Inkubationspuffer beschickt.

3.3.3 Messung der elektrophysiologischen Parameter

Die Ussing-Kammern waren an drei computergesteuerte 4-Kanal-Strom-Spannungsklemmapparaturen (K. Mußler, Aachen, www.Kmsci.de) angeschlossen. Als elektrische Parameter der Dünndarmepithelien wurden der Kurzschlussstrom I_{sc} und die Gewebeleitfähigkeit G_t protokolliert.

I_{sc}

Durch unterschiedliche ionale Konzentrationen zu beiden Seiten des Epithels und durch eine unterschiedliche Permeabilität des Gewebes für einzelne Ionen baut sich aufgrund der daraus resultierenden Netto-Ionenströme eine transepitheliale Potenzialdifferenz P_D auf.

Die P_D wurde von der Microclamp-Apparatur, welche über beidseitig gewebsnah angebrachte Agar-Puffer-Brücken (Polyethylen-Schlauch, Agar 3 %ig in mukosalem Inkubationspuffer) und über $Ag^+/AgCl$ -Elektroden mit der Ussing-Kammer in Verbindung stand, kontinuierlich gemessen. Um den passiv getriebenen, parazellulären Ionentransport auszuschließen, wurde die Potenzialdifferenz während der eigentlichen Versuchsphase durch einen externen Stromkreis, welcher ebenfalls über $Ag^+/AgCl$ -Elektroden und Agar-Puffer-Brücken mit der Kammer verbunden war, auf 0 mV geklemmt (Kurzschlussstrom-Bedingungen).

Dazu wurde in jeder Kammerhälfte eine 3 cm vom Gewebe entfernte Elektrode (Polyethylen-Schlauch, Agar 3%ig in mukosalem Inkubationspuffer) angebracht. Über diese Elektroden wurde ein externer Strom, welcher als Klemmstrom I_c definiert ist, in die Kammern geleitet. Mit dem I_c wurde die Potenzialdifferenz auf 0 mV eingestellt. Der negative Klemmstrom entspricht dem I_{sc} , der als Maß für die Summe aller elektrogenen Ionentransporte des Epithels zu interpretieren ist. Dabei bedeutet

ein positiver I_{sc} entweder eine Nettosekretion von Anionen oder eine Nettoabsorption von Kationen. Ein negativer I_{sc} steht für eine Nettoabsorption von Anionen oder eine Nettosekretion von Kationen.

G_t

Die Gewebeleitfähigkeit G_t ist als der reziproke Wert des Gewebewiderstandes definiert, der sich aus der Potenzialdifferenzänderung (ΔP) nach Applikation eines definierten, bipolaren Strompulses von 100 μA (ΔI) nach einer Form des Ohm'schen Gesetzes ($R = \Delta P / \Delta I$) errechnet. Die G_t gilt als Maß für die Integrität und die Dichtigkeit des Gewebes.

Vor Versuchsbeginn wurde das Eigenpotenzial der Elektroden und der Flüssigkeitswiderstand der Inkubationspufferlösungen zwischen den Elektroden bestimmt, um die während der Versuche ermittelten Daten um diese Werte zu korrigieren. Aufgrund der isoionalen Zusammensetzung der serosalen und der mukosalen Inkubationspuffer konnte ein chemischer Gradient ebenfalls ausgeschlossen werden. Unter diesen Bedingungen ist eine signifikant von Null verschiedene Nettoabsorption bzw. Nettosekretion der betrachteten Substanz ein sicherer Hinweis auf die Beteiligung aktiver Transportmechanismen am Transport.

3.3.4 Messung der unidirektionalen Fluxraten

Nach dem Einspannen der Epithelien in die Kammern schloss sich eine 15minütige Äquilibrationsphase an, in der 6 ms-Kammern zur Bestimmung der unidirektionalen Fluxraten von mukosal nach serosal (J_{ms}) und 6 sm-Kammern zur Bestimmung der unidirektionalen Fluxraten in die umgekehrte Richtung (J_{sm}) festgelegt wurden, bevor die Zugabe des gewünschten Radioisotopes –bei den ms-Kammern in die mukosale Kammerhälfte und bei den sm-Kammern in die serosale Kammerhälfte– erfolgte.

Nach ca. 15 min wurden zur Bestimmung der spezifischen Aktivität von der „heißen Seite“ jeder Kammer ein 10 μl Aliquot („heiße Probe 1“) entnommen. Gleich im

Anschluss erfolgte die erste Entnahme (P1) eines 500 µl Aliquots von der so genannten „kalten Seite“ („kalte Probe“). Weitere Entnahmen (P2-P8 bzw. P2-P11) erfolgten in 10minütigen Abständen. Die aus den Säulen entnommenen Volumina wurden durch entsprechende Inkubationspuffer ersetzt.

Nach P4 wurden diejenigen Substanzen mukosal bzw. serosal zugegeben, deren Effekt auf das Gewebe bezüglich der Ca^{2+} -, P_i - oder Mannitabsorption untersucht werden sollte. In einigen Versuchsdurchläufen wurde nach der 7. Entnahme eine zweite Substanz zugegeben und 4 weitere Intervalle erfasst. Bei den übrigen Versuchen wurden die Fluxratenmessungen nach der 8. Entnahme beendet. Nach Beendigung der Fluxratenmessungen wurden erneut 10 µl Aliquot von der heißen Seite entnommen („heiße Probe 2“). Anschließend wurden die heißen Proben mit Inkubationspuffer auf einheitliche Volumina (500 µl) aufgefüllt und heiße sowie kalte Proben mit 4,5 ml Szintillationsflüssigkeit (Luma Safe Plus, Canberra Packard GmbH, Dreieich) gemischt, um die Anzahl der Zerfälle pro minute (dpm) in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (Tri-Carb 2500, Canberra Packard GmbH, Dreieich) zu bestimmen. Die Zähldauer betrug dabei für jede Probe 10 min. Der Zählfehler lag bei 0,2 % Sigma.

3.3.4.1 Messung der Ca^{2+} - und P_i -Fluxraten

Die zugegebene Aktivität betrug pro Kammer für ^{45}Ca (NEN Life Science Products, Köln) $1,85 \cdot 10^5$ Bq (5 µCi) und für $^{32}\text{P}_i$ (NEN Life Science Products, Köln) $1,11 \cdot 10^5$ Bq (3 µCi). Die Ca^{2+} - und die P_i -Fluxraten wurden parallel in den gleichen Kammern bestimmt, demzufolge waren auch die zugegebenen Substanzen, deren Einfluss auf die Ca^{2+} - und P_i -Fluxraten untersucht wurde, dieselben. Verwendet wurden folgende Substanzen (Konzentrationsangaben bedeuten Endkonzentrationen in 10 ml Inkubationspuffer einer Kammerhälfte):

a) Cytochalasin D

Cytochalasin D (Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden), das Toxin des Pilzes *Zygosporium mansonii* ist ein Aktinfilament-Antagonist. Es wurde mukosal in einer Konzentration von $16 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ in pulverisierter Form zugegeben.

b) Latrunculin B

Bei dem Meeresalgen-Toxin Latrunculin B (Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden), welches aus der Alge *Latrunculia magnifica* gewonnen wird, handelt es sich um einen Aktinfilament-Antagonisten. In einem Vorversuch sollte unter Verwendung steigender Latrunculin B-Konzentrationen ($0,25$, $1,25$ und $2,53 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) die Konzentration bestimmt werden, bei der die Hemmung der J_{ms} für Ca^{2+} und P_i im Duodenum von Saugferkeln (1 Ferkel, 1,5 Tage p.p., 0,8 kg LM, 2-3 Epithelien) maximal war. Die maximale Hemmung um jeweils ca. 60 % war für Ca^{2+} und P_i bei einer Konzentration von $1,25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Latrunculin B erreicht. Bei Verdopplung dieser Konzentration nahm die inhibitorische Wirkung wieder ab. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde der Aktinfilament-Antagonist bei den Hauptversuchen in einer Konzentration von $1,25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, gelöst in $10 \mu\text{l}$ DMSO (Dimethylsulphoxid), eingesetzt. Bei DMSO-Konzentrationen in dieser Größenordnung (unter 0,1 %) treten keine zytotoxischen Effekte auf (COUÉ et al. 1987).

c) Colchicin

Das Toxin der Herbstzeitlosen (*Colchicum autumnale*) Colchicin (Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen) zerstört die Mikrotubuli der Zelle. Es wurde mukosal in einer Konzentration von $1 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ in ungelöster Form zugegeben.

d) Calcitriol (1,25-Dihydroxycholecalciferol)

Die Untersuchung zur Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von 60 , 150 , 500 , 1000 und $2000 \text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ auf die J_{ms} für Ca^{2+} wurde in einem Vorversuch durchgeführt. Bei den Hauptversuchen erfolgte die Zugabe von Calcitriol (MW 419; Hoffmann-La Roche AG, Basel) serosal in einer Konzentration von $500 \text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$, gelöst in $10 \mu\text{l}$

Ethanol (Ethanol absolut). Als Kontrolle wurde in getrennten Kammern lediglich 10 μl Ethanol zugegeben. Zunächst wurde die alleinige Wirkung von Calcitriol untersucht und anschließend in denselben Kammern die zusätzliche Wirkung von 1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Colchicin beobachtet. Bei Kontrollkammern mit Ethanol zeigte sich, dass diese Zugabe die Ca^{2+} -Fluxraten veränderte, indem Ethanol die J_{ms} reduzierte und die J_{sm} stimulierte, so dass daraus verminderte J_{net} für Ca^{2+} resultierten. Bei beiden geprüften Altersgruppen wurde dieser Effekt beobachtet. Zum Vergleich der Wirkung von Calcitriol mit und ohne Colchicinzugabe mussten die Fluxraten unter Calcitriol-Einfluss rechnerisch um diesen Ethanol-Effekt korrigiert werden. Auf die elektrischen Parameter der Epithelien hatte Ethanol keinen nennenswerten Einfluss.

e) BAY K8644

BAY K8644 (Bayer AG, Leverkusen) ist ein Agonist spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle des L-Typs. Die Substanz wurde in Ethanol (Ethanol absolut) gelöst und in Konzentrationen von 0,1 und 1,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ mukosal zugegeben.

3.3.4.2 Messung der Mannit-Fluxraten

Die Zugabe des Radioisotopes ^3H -Mannit (NEN Life Science Products, Köln) betrug $1,85\cdot 10^5$ Bq (5 μCi). Mannit wird u.a. aufgrund seiner Molekülgröße rein parazellulär transportiert und gilt somit als Markersubstanz für den parazellulären Transportweg (FAVUS und ANGEID-BACKMAN 1984).

3.3.5 Berechnung der unidirektionalen und der Nettofluxraten

Die Berechnung der unidirektionalen Fluxraten J_{ms} und J_{sm} erfolgte in Anlehnung an die Formel von SCHULTZ und ZALUSKY (1964):

$$J = \left(dpm_n - \frac{V_s - V_p}{V_s} \cdot dpm_{n-1} \right) \cdot \left(\frac{V_s \cdot M_i}{dpm_H \cdot t \cdot A} \right)$$

Hierbei gilt:

J = Fluxrate [$\mu\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}$],

dpm_n = Zerfälle pro Minute in der Probe n [dpm],

dpm_{n-1} = Zerfälle pro Minute in der Probe n-1 [dpm],

V_s = Volumen der Pufferlösung in der Säule [ml],

V_p = Volumen der entnommenen Probenlösung („kalte Seite“) [ml],

M_i = Konzentration des unmarkierten Ca^{2+} , P_i bzw. Mannits in der Pufferlösung [$\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$],

dpm_H = Zerfälle pro Minute extrapoliert auf 0,5 ml Aliquot von der „heißen Seite“ (Mittelwert aus den heißen Proben 1 und 2) [dpm],

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

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

Die Nettofluxraten (J_{net}) von Ca^{2+} , P_i und Mannit ergaben sich aus der Differenz der unidirektionalen Fluxraten J_{ms} und J_{sm} .

3.4 Bestimmung der Kompartimentierung von Ca^{2+} in jejunalen Enterozyten: Subzelluläre Fraktionierung

In den folgenden Versuchen wurden jejunale Epithelien von Saug- und Absetzferkeln und von calcitrioldefizienten Absetzferkeln mit ^{45}Ca inkubiert. Eine subzelluläre Fraktionierung der Enterozytenhomogenate mittels Differenzial- und Dichtegradientenzentrifugationen, Messungen der aufgenommenen Aktivität sowie

Protein- und Enzymbestimmungen in den einzelnen Fraktionen sollten Aufschluss über die intrazelluläre Verteilung von Ca^{2+} geben. Eine von NEMERE et al. (1986) bereits am Hühnerduodenum etablierte Methode der subzellulären Fraktionierung sollte hier auf das Jejunum vom Schwein angewendet werden.

3.4.1 Pufferlösungen

Die Dünndarmepithelien wurden in serosalem Inkubationspuffer, der auch für die Messung der Ca^{2+} - und P_i -Fluxraten in den Ussing-Kammern verwendet wurde, inkubiert (Tab. 1).

Außerdem wurde für die Homogenisierung der Epithelien ein Homogenisierungspuffer verwendet, der folgendermaßen zusammengesetzt war:

Saccharose	0,25 mmol·l ⁻¹
Tris (basisch)	10 mmol·l ⁻¹
EGTA	2 mmol·l ⁻¹
Rutheniumrot	10 µg/ml

Die Lösung wurde bei 4°C mit HCl auf pH 7,0 eingestellt.

3.4.2 Schichtung des Dichtegradienten

Für die Schichtung des Saccharosegradienten wurde dem Homogenisierungspuffer (3.4.1) die Saccharose 10%ig (w/v) und 50%ig (w/v) zugesetzt. Je 5 ml beider Lösungen wurden in einen Gradientenmischer (H. Hölzel, Dorfen) überführt, aus dem sie mit einer Pumpe (Abimed Minipuls 2, Langenfeld) unter ständiger Durchmischung in ein Zentrifugenröhrchen gepumpt wurden. Da die Saccharoselösung am Boden des Röhrchens mit kontinuierlich steigenden

Konzentrationen eingebracht wurde, kam es zu einer ständigen Unterschichtung der bereits im Röhrchen vorhandenen Lösung. Dies hatte einen Konzentrationsanstieg von oben (10 %) nach unten (50 %) zur Folge.

3.4.3 Probenentnahmen und Präparation der Dünndarmepithelien

Die Probennahmen und der Transport erfolgten im Prinzip wie bereits unter 3.2.1 beschrieben. Ein 30 cm langes Dünndarmstück wurde hier allerdings 35 cm distal der Mündung des Ductus pancreaticus accessorius entnommen, so dass es sich hierbei um den proximalen Anteil des Jejunums handelte.

Auch für die Inkubationsversuche mit ^{45}Ca wurden die jejunalen Darmsegmente bei den Absetzferkeln vollständig und bei den Saugferkeln partiell gestrippt. Sie wurden anschließend auf Epithelstücke mit einer Fläche von 10 cm^2 (5 cm Länge, 2 cm Breite) zurechtgeschnitten. Bei den Saugferkeln wurde die Tunica muscularis und der serosale Anteil am Ende der Inkubation von der Tunica mucosa mit einem Objektträger abgeschabt und verworfen. Auf diese Weise war während der Inkubation die Stabilität des Gewebes gewährleistet und die weitere Verarbeitung vereinfacht.

3.4.4 Inkubation der Dünndarmepithelien

Jedes präparierte Darmstück wurde jeweils in ein Becherglas mit 10 ml serosalem carbogenbegastem Inkubationspuffer (Tab. 1) gegeben, die in einem 37°C warmen Schüttelwasserbad standen, so dass eine gleichmäßige Durchmischung der Lösung und die Umwälzung der Epithelien gewährleistet war. Eine Begasung der Inkubationslösung mit Carbogen erfolgte über die gesamte Versuchsdauer. Nach einer 15minütigen Vorlaufzeit erfolgte die Zugabe von $2,59 \cdot 10^5\text{ Bq}$ ($7\text{ }\mu\text{Ci}$) ^{45}Ca . Die Epithelien wurden nach einer Inkubationsdauer von 20 min aus dem Puffer

entnommen und mit eiskalter physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl, w/v) gespült. Die weitere Verarbeitung erfolgte bei 4°C auf Eis. Die Epithelstücke wurden zunächst mit einem Skalpell grob zerkleinert, mit 7 ml eiskaltem Homogenisierungspuffer versetzt und im Anschluss mit einem Dispergierer (10 Schübe; DIAX 900, Fa. Heidolph, Kehlheim) homogenisiert. Danach erfolgte der Aufschluss der Enterozyten mittels eines Dounce-Homogenisators (50 Schübe von Hand, Fa. Braun, Melsungen). Die Homogenate („heiße Homogenate“) wurden in 1 ml-Portionen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

Zeitgleich zur Inkubation mit ^{45}Ca wurden Epithelstücke ohne Aktivitätszugabe inkubiert. Ansonsten wurde mit diesen Epithelien genauso verfahren wie oben beschrieben. Die hieraus gewonnenen „kalten Homogenate“ dienten später für Protein- und Enzymbestimmungen.

3.4.5 Zeitabhängigkeit der Aufnahme von ^{45}Ca in jejunale Epithelien

Hierbei handelte es sich um einen Vorversuch, der wie vorher beschrieben durchgeführt wurde. Die Epithelien wurden hierbei 15, 30, 45 und 60 min mit ^{45}Ca inkubiert. Vor und nach der Inkubation wurden 100 µl Aliquots aus dem Inkubationspuffer entnommen, um die Aktivität im Flüssigkeitsszintillationszähler zu messen. Die Differenz der hierbei gemessenen Aktivitäten im Inkubationsmedium diente als relatives Maß für die Aufnahme von ^{45}Ca in das Epithel.

3.4.6 Zentrifugation der Enterozytenhomogenate

Die „heißen“ und „kalten“ Homogenate wurden auf Eis aufgetaut und bei 4°C weiterverarbeitet. Die einzelnen Zentrifugationsschritte sind in Abb. 1 dargestellt. Von den „heißen“ Homogenaten, den Pellets, den Überständen und den 10 Fraktionen des Dichtegradienten wurden jeweils Proben genommen („heiße Proben“), in denen später die Aktivität von ^{45}Ca bestimmt werden sollte. Dafür wurden sie zunächst im Wasserbad 1,5 h bei 60 °C mit 1 ml Gewebelöser (Solvable, Canberra Packard GmbH, Dreieich) pro 1 ml Probenlösung inkubiert und nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur mit 200 µl Wasserstoffperoxid (H_2O_2 30%ig), wegen des durch Rutheniumrot erhöhten Quench bei der Flüssigszintillationszählung, 0,5 h bei 60 °C entfärbt. Nach Zugabe von 10 ml Szintillationsflüssigkeit für Proben mit hoher Ionenstärke (Hionic Fluor, Canberra Packard GmbH, Dreieich), wurde die Anzahl der Impulse pro Minute (cpm) mittels Flüssigkeitsszintillationszählung gemessen. Die „kalten“ Proben, die der Zentrifugation der „kalten“ Homogenate entstammten, und die entsprechenden Fraktionen des Dichtegradienten wurden für spätere Protein- und Enzymbestimmungen herangezogen und deshalb zunächst bei -20 °C eingefroren.

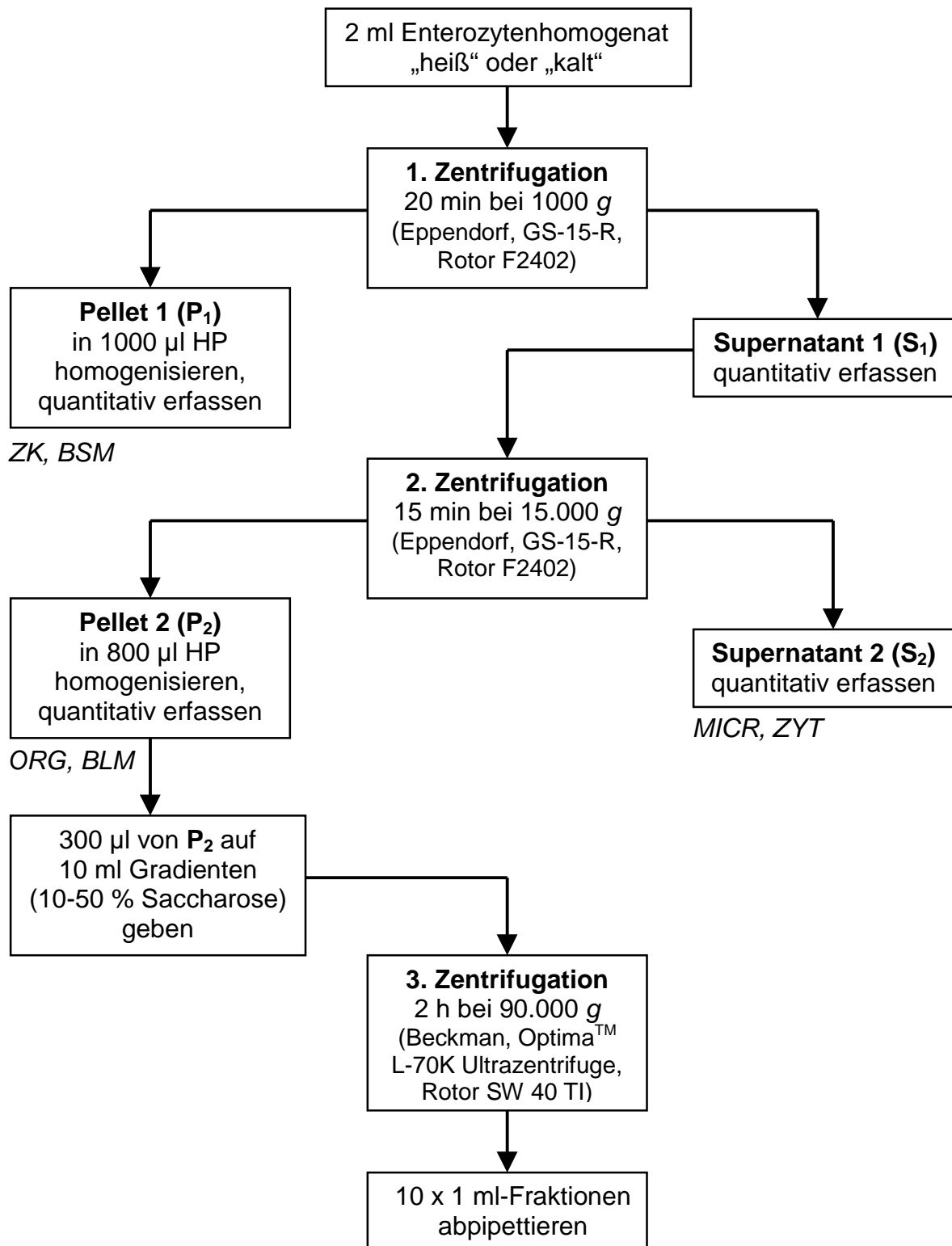


Abb. 1: Schematische Darstellung der einzelnen Zentrifugationsschritte zur subzellulären Fraktionierung der jejunalen Enterozyten (g = Zentrifugalbeschleunigung, HP = Homogenisierungspuffer, ZK = Zellkerne, BSM = Bürstensaummembranen, ORG = Zellorganellen, BLM = Basolateralmembranen, MICR = Microsomen, ZYT = Zytosol).

3.5 Analytische Methoden

3.5.1 Bestimmung der Proteinkonzentrationen

Die Proteinkonzentrationen im Ausgangshomogenat und in den Fraktionen der Differenzial- und Dichtegradientenzentrifugation wurde fotometrisch mit einem Standardassay der Fa. Bio-Rad GmbH (München) durchgeführt. Das Prinzip wurde von BRADFORD (1976) beschrieben und beruht auf einer Farbstoffreaktion von Coomassie Brillant Blau. Nach Bindung von Proteinen entsteht eine saure Lösung, wodurch sich das Absorptionsmaximum dieses Farbstoffes von 465 nm auf 595 nm verschiebt. Das rote Farbmolekül liegt ursprünglich als Kation vor. Durch die Bindung an Proteine wird es als Anion stabilisiert und es kommt zu einem Farbumschlag von rot nach blau. Die Menge des gebildeten blauen Farbstoffes wird bei 595 nm fotometrisch bestimmt (Spektralfotometer DU 8-Beckman, München).

Als Proteinstandard zur Erstellung der Eichkurve wurde bovines γ -Globulin verwendet.

3.5.2 Bestimmung der Aktivitäten der alkalischen Phosphatase

Die Aktivitäten der alkalischen Phosphatase (AP) wurden nach einer optischen Standardmethode bestimmt. Bei Raumtemperatur wurden hierfür 50 μ l Probe mit 3 ml Reagenz (1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Diethanolamin, 0,5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ MgCl_2 , pH 9,8 mit 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Natrium-p-Nitrophenylphosphat) versetzt und die Extinktionszunahme bei einer Wellenlänge von 405 nm nach 1,2 und 3 min gemessen.

Das Testprinzip beruht auf der hydrolytischen Spaltung von p-Nitrophenylphosphat durch die AP in Phosphat und p-Nitrophenol.

Die Extinktionsdifferenzen pro Minute wurden bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Die pro Zeiteinheit gebildete Menge an p-Nitrophenol war der Extinktionsänderung und damit der AP proportional.

3.5.3 Bestimmung der Aktivitäten der sauren Phosphatase

Die Aktivitäten der sauren Phosphatase (SP) wurden mit einem Testkit der Firma Sigma-Diagnostics Inc. (St. Louis, USA) bestimmt. Das Prinzip wurde von ANDERSCH und SZCZYPINSKI (1947) beschrieben und beruht, in Analogie zur AP, auf der Hydrolyse von p-Nitrophenylphosphat zu p-Nitrophenol und anorganischem Phosphat. Hierfür wurde die Probe mit Citratpuffer ($90 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Citrat, $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Chlorid, pH 4,8) und p-Nitrophenylphosphat versetzt. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C wurde die Reaktion mit $0,1 \text{ N NaOH}$ abgestoppt. Durch die Alkalisierung kam es zu einer Gelbfärbung der Lösung. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Aus einer zuvor mit p-Nitrophenol, gelöst in $0,02 \text{ N NaOH}$, erstellten Kalibrierungskurve konnte die SP in Sigma Units/ml ($1 \text{ Sigma Unit} \hat{=} \text{Enzymaktivität, die } 1 \text{ } \mu\text{mol p-Nitrophenol pro Stunde freisetzt}$) entnommen werden.

3.5.4 Bestimmung der Aktivitäten der Na^+/K^+ -ATPase

Die Aktivitäten der Na^+/K^+ -ATPase wurden nach der Methode von MIRCHEFF und WRIGHT (1971) fotometrisch bestimmt. Das Testprinzip beruht auf der spezifischen Hemmung der Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität durch Ouabain (5 mg/ml Inkubationsmedium). Die Enzymaktivität ergab sich aus der Differenz der Aktivität mit und ohne Ouabainzusatz. Nach einer Inkubation der Probe bei 37°C für 30 min in einem Inkubationspuffer ($5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ MgCl}$, $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NaCl}$, $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ KCl}$, $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ ATP}$, $3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ EDTA}$, $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Tris/HCl}$, pH 7,4) wurde die Reaktion mit 5%iger Trichloressigsäure abgestoppt und die Messansätze weitere 30 min mit einem Farbreagenz ($40 \text{ mg FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ pro ml 1%iger Ammoniumheptamolybdatlösung in $1,15 \text{ M H}_2\text{SO}_4$) bei Raumtemperatur inkubiert.

Das frei werdende anorganische Phosphat bildete mit Molybdat in saurer Lösung komplexe Phosphomolybdänsäure die zu Molybdänblau reduziert wurde. Es

entstand ein blauer Farbkomplex, dessen Extinktion bei einer Wellenlänge von 690 nm fotometrisch bestimmt wurde (Spektralfotometer DU-8, Beckman, München).

3.6. Chemikalien

Alle Chemikalien hatten wenigstens Analysenqualität (p.A.) und wurden, falls es im Einzelfall nicht anders vermerkt wurde, von der Firma Merck KGaA (Darmstadt) und von der Firma Sigma Chemie GmbH (Deisenhofen) bezogen.

3.7 Statistik

Aus den Versuchsdaten wurden arithmetische Mittelwerte (\bar{x}) und Standardabweichungen vom Mittelwert (SEM) berechnet. Aus früheren Untersuchungen mit vergleichbaren Tiergruppen und Messparametern war bekannt, dass die zu erhaltenden Werte normalverteilt sind (SCHRÖDER et al. 1993, SCHRÖDER et al. 1998b). Die statistische Prüfung der vorliegenden Werte erfolgte daher mit parametrischen Testverfahren, wie z.B. der zweifaktoriellen Varianzanalyse. Ergaben sich daraus signifikante Unterschiede, erfolgte der paarweise Gruppenvergleich über einen Student's t-Test.

Insgesamt wurden folgende statistische Verfahren angewandt:

- zweifaktorielle Varianzanalyse (BMDP 2V)
- Student's t-Test für verbundene oder unverbundene Stichproben sowie Student's t-Test gegen Null (Graph Pad Prism, Software Inc., San Diego, USA)

Für die Signifikanzangaben gilt:

n.s. = nicht signifikant mit $p \geq 0,05$,

$p < 0,05$ = *, schwach signifikant,

$p < 0,01$ = **, signifikant,

$p < 0,001$ = ***, hoch signifikant.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zum Einfluss des Zytoskeletts auf den transepithelialen Ca^{2+} - und P_i -Transport im Duodenum von Saug- und Absetzferkeln

4.1.1 Einfluss von Cytochalasin D auf Aktinfilamente

In diesem Versuchsabschnitt sollte der Effekt des Aktinfilament-Inhibitors Cytochalasin D ($16 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, mukosal) auf den aktiven Ca^{2+} - und P_i -Transport im Duodenum von Saugferkeln untersucht werden. Die Ergebnisse sind in Tab. 1 zusammengefasst.

Die Zugabe des Agens verursachte eine signifikante Abnahme des I_{sc} um im Mittel 25 %, während die G_t unbeeinflusst blieb. Die J_{ms} für Ca^{2+} wurden durch Cytochalasin D signifikant um im Mittel 40,1 % gehemmt (siehe auch Abb. 1). Da die J_{sm} nicht wesentlich beeinflusst wurden, resultierte daraus eine Hemmung der J_{net} von Ca^{2+} um durchschnittlich 52,6 %. Die basalen J_{ms} für P_i waren durch eine hohe interindividuelle Streuung charakterisiert, so dass der inhibitorische Effekt von Cytochalasin D auf die P_i -Fluxraten von im Mittel 32,3 % statistisch nicht gesichert werden konnte (siehe auch Abb. 1). Allerdings verursachte das Agens eine signifikante Zunahme der J_{sm} für P_i , so dass sich tendenziell eine Abnahme der J_{net} für P_i ergab.

Tab. 1: Wirkung von Cytochalasin D
 Elektrische Parameter (I_{sc} in $\mu\text{Eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$, G_t in $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-2}$) sowie unidirektionale (J_{ms} , J_{sm} in $\text{nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) und Nettofluxraten (J_{net} in $\text{nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) von Ca^{2+} und P_i im Duodenum von Saugferkeln ($6,6 \pm 1,2$ Tage p.p., $2,7 \pm 0,6$ kg LM, $n = 5$ Tiere; $\bar{x} \pm \text{SEM}$) unter Kontrollbedingungen und nach Zugabe von $16 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Cytochalasin D zur mukosalen Gewebeseite ($\bar{x} \pm \text{SEM}$;
 a,b $p < 0,05$ in denselben Spalten, Student's t-Test für verbundene Stichproben).

Cytochalasin D (-/+)	Elektrische Parameter		Ca^{2+}			P_i		
	I_{sc}	G_t	J_{ms}	J_{sm}	J_{net}	J_{ms}	J_{sm}	J_{net}
-	$0,8^a$ $\pm 0,2$	$19,2$ $\pm 1,4$	$67,0^a$ $\pm 22,5$	$12,4$ $\pm 1,7$	$54,6^a$ $\pm 22,6$	$103,3$ $\pm 46,7$	$20,7^a$ $\pm 2,4$	$82,6$ $\pm 46,1$
+	$0,6^b$ $\pm 0,2$	$18,7$ $\pm 1,6$	$39,8^b$ $\pm 13,0$	$13,9$ $\pm 1,0$	$25,9^b$ $\pm 13,7$	$69,9$ $\pm 26,9$	$25,3^b$ $\pm 1,3$	$44,3$ $\pm 26,4$

4.1.2 Einfluss von Latrunculin B auf Aktinfilamente

Das marine Toxin Latrunculin B, ein Aktinfilament-Antagonist, ist nach Literaturangaben 10-100fach wirksamer als Cytochalasin D (SPECTOR et al. 1989). Diese Eigenschaft ließ eine spezifischere Wirkung auf den Ca^{2+} -Transport als bei Verwendung von Cytochalasin D möglich erscheinen.

4.1.2.1 Altersabhängigkeit der Wirkung von Latrunculin B

Unabhängig vom Alter verursachte Latrunculin B eine signifikante Abnahme der I_{sc} von im Mittel 17-30 % und eine signifikante Reduktion der G_{t} um 6-11 % (Tab. 2).

Die J_{ms} für Ca^{2+} wurden durch das Agens bei Saugferkeln um $38,3 \pm 3,5$ % und bei Absetzferkeln um $14,3 \pm 6,5$ % reduziert, allerdings war der Effekt nur bei Saugferkeln signifikant (Abb. 1, Wechselwirkung in Tab. 2). Während Latrunculin B bei Saugferkeln keinen Effekt auf die J_{sm} für Ca^{2+} zeigte, erhöhte die Substanz bei Absetzferkeln diese Fluxrate signifikant um im Mittel 46,7 % (Wechselwirkung in Tab. 2). Aus diesem Grunde lag die Latrunculin B-induzierte Hemmung der J_{net} für Ca^{2+} bei Absetzferkeln mit im Mittel 31,9 % in ähnlicher Größenordnung wie bei den Saugferkeln mit 44,9 %.

Die Wirkung von Latrunculin B auf die unidirektionalen und die Nettofluxraten von P_i war der Wirkung auf die Ca^{2+} -Fluxraten prinzipiell vergleichbar (Tab. 2, Abb. 1).

Tab. 2: Wirkung von Latrunculin B
 Elektrische Parameter (I_{sc} in $\mu\text{Eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$, G_t in $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-2}$) sowie unidirektionale (J_{ms} , J_{sm} in $\text{nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) und Nettofluxraten (J_{net} in $\text{nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) von Ca^{2+} und P_i im Duodenum von Saugferkeln (SF, $3,5 \pm 0,8$ Tage p.p., $1,8 \pm 0,1$ kg LM, $n = 5$ Tiere; $\bar{x} \pm \text{SEM}$) und Absetzferkeln (AF, $56,0 \pm 25,2$ Tage p.p., $21,5 \pm 1,9$ kg LM, $n = 5$ Tiere; $\bar{x} \pm \text{SEM}$) unter Kontrollbedingungen und nach Zugabe von $1,25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Latrunculin B zur mukosalen Gewebeseite ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; n.s. nicht signifikant mit $p \geq 0,05$).

Gruppe	Latrunculin B (-/+)	Elektrische Parameter		Ca^{2+}			P_i			
		I_{sc}	G_t	J_{ms}	J_{sm}	J_{net}	J_{ms}	J_{sm}	J_{net}	
SF	-	1,2 $\pm 0,1$	22,5 $\pm 1,7$	90,8 $\pm 20,8$	19,6 $\pm 2,8$	71,2 $\pm 18,6$	128,6 $\pm 23,8$	23,5 $\pm 2,4$	105,1 $\pm 22,5$	
	+	1,0 $\pm 0,1$	20,0 $\pm 1,8$	57,6 $\pm 15,5$	18,4 $\pm 3,2$	39,2 $\pm 12,8$	85,8 $\pm 17,1$	24,7 $\pm 2,4$	61,1 $\pm 15,6$	
AF	-	1,0 $\pm 0,2$	22,3 $\pm 2,1$	92,6 $\pm 12,7$	19,5 $\pm 2,8$	73,1 $\pm 11,4$	106,5 $\pm 11,1$	18,1 $\pm 2,4$	88,4 $\pm 10,4$	
	+	0,7 $\pm 0,2$	20,9 $\pm 1,9$	78,4 $\pm 11,0$	28,6 $\pm 4,1$	49,8 $\pm 8,5$	96,0 $\pm 13,5$	30,6 $\pm 4,1$	65,4 $\pm 10,8$	
Varianzursache		Signifikanz einer zweifaktoriellen Varianzanalyse								
Alter		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
Latrunculin B		$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,001$	$p < 0,05$	$p < 0,001$	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,001$	
Alter x Latrunculin B		n.s.	n.s.	$p < 0,01$	$p < 0,01$	n.s.	$p < 0,05$	$p < 0,01$	n.s.	

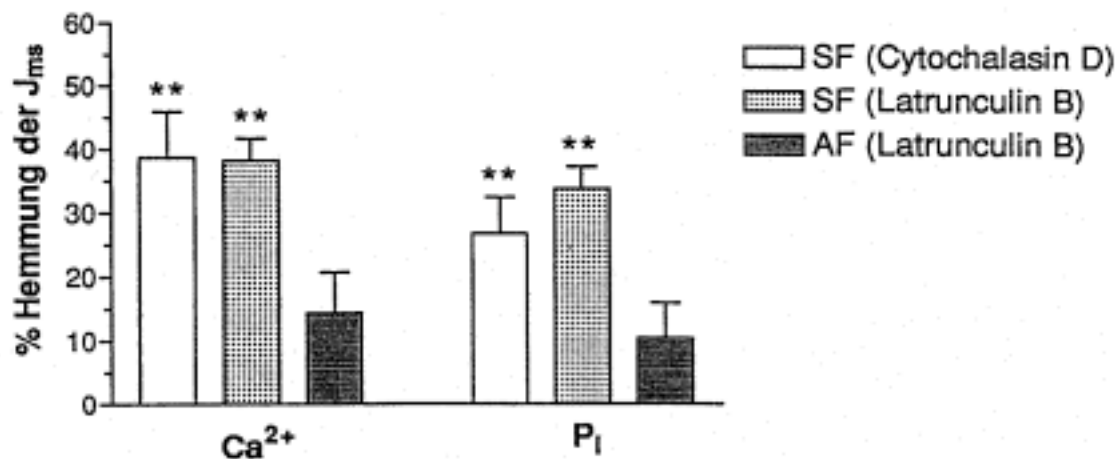


Abb. 1: Vergleich der Wirkung von Cytochalasin D bei Saugferkeln (SF, $6,6 \pm 1,2$ Tage p.p., $2,7 \pm 0,6$ kg LM, $n = 5$ Tiere; $\bar{x} \pm \text{SEM}$) mit der Wirkung von Latrunculin B bei Saug- (SF, $3,5 \pm 0,8$ Tage p.p., $1,8 \pm 0,1$ kg LM, $n = 5$ Tiere; $\bar{x} \pm \text{SEM}$) und Absetzferkeln (AF, $56,0 \pm 25,2$ Tage p.p., $21,5 \pm 1,9$ kg LM, $n = 5$ Tiere; $\bar{x} \pm \text{SEM}$) auf die Hemmung der J_{ms} für Ca^{2+} - und P_i (Daten aus Tab. 1 und Tab. 2 abgeleitet; $\bar{x} \pm \text{SEM}$; ** $p < 0,01$, Student's t-Test gegen Null).

Die Untersuchungen mit den Aktinfilament-Antagonisten Cytochalasin D und Latrunculin B haben insgesamt gezeigt, dass beide Agenzien bei Saugferkeln die J_{ms} und J_{net} von Ca^{2+} signifikant hemmen, während dieser Effekt auf die entsprechenden P_i -Fluxraten nur unter Verwendung von Latrunculin B statistisch gesichert werden konnte.

Bei den Absetzferkeln kam es zu keiner signifikanten Hemmung der J_{ms} von Ca^{2+} und P_i durch Latrunculin B.

Um einen Vergleich der Hemmwirkung von Cytochalasin D und Latrunculin B auf die J_{ms} von Ca^{2+} bzw. P_i zu ermöglichen, sind in Abb. 1 die Hemmungen in % der nicht beeinflussten Fluxraten dargestellt. Es wird dabei ersichtlich, dass bei Saugferkeln die prozentuale Hemmung der J_{ms} von Ca^{2+} und P_i nicht wesentlich verschieden war und ungefähr 30 % betrug. Auch bei Absetzferkeln ergab sich eine Inhibition von ca. 10 %, allerdings war dieser Effekt nicht signifikant.

4.1.3 Einfluss von Colchicin auf Mikrotubuli

In dieser Versuchsreihe wurde der Mikrotubuli-Antagonist Colchicin mukosal in einer Konzentration von $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ verwendet, um die Wirkung auf die unidirektionalen Fluxraten von Ca^{2+} und P_i im Duodenum von Saug- und Absetzferkeln zu untersuchen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tab. 3 zusammengefasst. Abhängig vom Alter bewirkte Colchicin eine Abnahme der I_{sc} von im Mittel um 13 % bei den Saugferkeln und um 25 % bei den Absetzferkeln, während die G_t nicht nennenswert beeinflusst wurden.

Die J_{ms} für Ca^{2+} wurden bei Saugferkeln im Mittel um 18 % und bei Absetzferkeln um 4 % gehemmt. Die J_{sm} für Ca^{2+} blieben bei beiden Altersgruppen nahezu unverändert, so dass die Abnahmen der J_{net} für Ca^{2+} um durchschnittlich 23 % bei Saugferkeln und 6 % bei Absetzferkeln mit der Hemmung der J_{ms} vergleichbar waren. Dieser Effekt war nur bei den Saugferkeln signifikant (siehe auch Abb. 2). Die J_{ms} und die J_{net} für P_i nahmen im Verlauf der Entwicklung signifikant ab, aber es traten keine signifikanten Colchicin-Effekte auf.

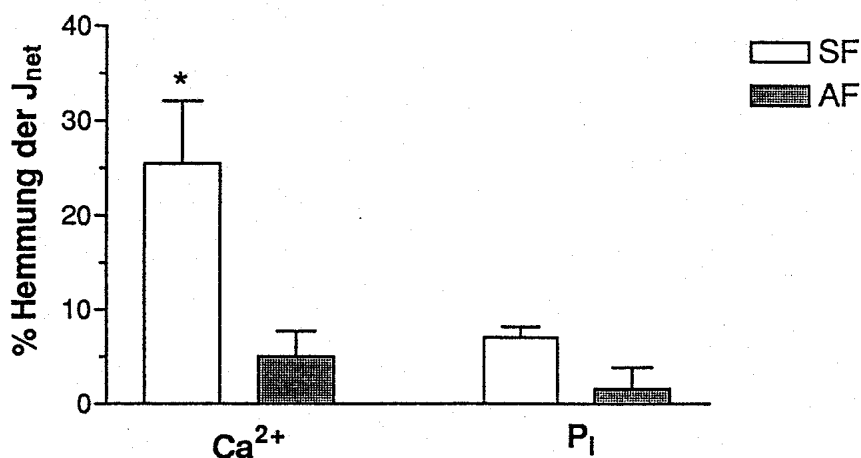


Abb. 2: Ausmaß der Hemmung der J_{net} für Ca^{2+} und P_i in % bei Saugferkeln (SF, $1,6 \pm 0,4$ Tage p.p., $1,7 \pm 0,1$ kg LM, $n = 5$ Tiere; $\bar{x} \pm \text{SEM}$) und bei Absetzferkeln (AF; für Ca^{2+} : $60,2 \pm 7,7$ Tage p.p., $13,0 \pm 1,4$ kg LM, $n = 6$ Tiere; für P_i : $42,0 \pm 0$ Tage p.p., $9,9 \pm 0,1$ kg LM, $n = 4$ Tiere; $\bar{x} \pm \text{SEM}$) durch mukosal $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Colchicin ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; * $p < 0,05$, Student's t-Test für unverbunden Stichproben).

Tab. 3: Wirkung von Colchicin

Elektrische Parameter (I_{sc} in $\mu\text{Eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$, G_t in $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-2}$) sowie unidirektionale (J_{ms} , J_{sm} in $\text{nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) und Nettofluxraten (J_{net} in $\text{nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) von Ca^{2+} und P_i im Duodenum von Saugferkeln (SF, $1,6 \pm 0,4$ Tage p.p., $1,7 \pm 0,1$ kg LM, $n = 5$ Tiere; $\bar{x} \pm \text{SEM}$) und Absetzferkeln (AF, für Ca^{2+} : $60,2 \pm 7,7$ Tage p.p., $13,0 \pm 1,4$ kg LM, $n = 6$ Tiere; für P_i : $42,0 \pm 0$ Tage p.p., $9,9 \pm 0,1$ kg LM, $n = 4$ Tiere; $\bar{x} \pm \text{SEM}$) unter Kontrollbedingungen und nach Zugabe von $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Colchicin zur mukosalen Gewebeseite ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; n.s. nicht signifikant mit $p \geq 0,05$).

Gruppe	Colchicin (-/+)	Elektrische Parameter		Ca^{2+}			P_i			
		I_{sc}	G_t	J_{ms}	J_{sm}	J_{net}	J_{ms}	J_{sm}	J_{net}	
SF	-	1,6 $\pm 0,2$	22,3 $\pm 2,5$	81,2 $\pm 6,7$	21,4 $\pm 2,5$	59,8 $\pm 7,6$	150,1 $\pm 16,8$	22,3 $\pm 1,5$	127,8 $\pm 16,6$	
	+	1,4 $\pm 0,1$	21,9 $\pm 2,0$	66,6 $\pm 7,7$	20,5 $\pm 1,9$	46,1 $\pm 7,8$	144,7 $\pm 17,0$	23,1 $\pm 3,3$	121,6 $\pm 16,3$	
	-	0,4 $\pm 0,1$	20,4 $\pm 1,0$	71,3 $\pm 5,9$	29,2 $\pm 1,8$	42,1 $\pm 4,3$	86,0 $\pm 5,8$	29,1 $\pm 1,3$	58,0 $\pm 5,8$	
AF	-	0,3 $\pm 0,1$	19,9 $\pm 1,2$	68,2 $\pm 5,7$	28,8 $\pm 1,6$	39,4 $\pm 4,4$	90,1 $\pm 6,4$	32,1 $\pm 0,8$	56,9 $\pm 4,6$	
	+									
Varianzursache		Signifikanzen einer zweifaktoriellen Varianzanalyse								
Alter	Alter	$p < 0,001$	n.s.	n.s.	$p < 0,05$	n.s.	$p < 0,05$	n.s.	$p < 0,05$	
	Colchicin	$p < 0,01$	n.s.	$p < 0,01$	n.s.	$p < 0,01$	n.s.	n.s.	n.s.	
Alter x Colchicin	Alter x Colchicin	$p < 0,01$	n.s.	$p < 0,05$	n.s.	$p < 0,05$	n.s.	n.s.	n.s.	

4.1.4 Einfluss von Colchicin auf den parazellulären Transportweg

In diesem Versuchsabschnitt wurde die Wirkung von $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Colchicin (mukosal) auf die unidirektionalen Fluxraten für Mannit bestimmt.

Das Agens hatte keinen nennenswerten Einfluss auf die elektrischen Eigenschaften des Dünndarmepithels und die J_{ms} , J_{sm} und J_{net} für Mannit (Tab. 4).

Tab. 4: Elektrische Parameter (I_{sc} in $\mu\text{Eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$, G_t in $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-2}$) sowie unidirektionale (J_{ms} , J_{sm} in $\text{nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) und Nettofluxraten (J_{net} in $\text{nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) für Mannit im Duodenum von Saugferkeln ($5,0 \pm 0,3$ Tage p.p., $2,0 \pm 0,1$ kg LM, $n = 4$ Tiere; $\bar{x} \pm \text{SEM}$) unter Kontrollbedingungen und nach Zugabe von $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Colchicin zur mukosalen Gewebeseite.

Colchicin (-/+)	Elektrische Parameter		Mannit		
	I_{sc}	G_t	J_{ms}	J_{sm}	J_{net}
-	0,7 $\pm 0,1$	17,2 $\pm 1,0$	37,0 $\pm 3,1$	33,5 $\pm 2,0$	3,5 $\pm 2,5$
+	0,9 $\pm 0,2$	14,6 $\pm 0,8$	35,3 $\pm 2,2$	32,7 $\pm 1,3$	2,6 $\pm 2,3$

4.2 Untersuchungen zur Stimulierbarkeit der duodenalen Ca^{2+} - und P_i -Resorption durch Calcitriol

Der klassische Weg der Stimulation der aktiven Ca^{2+} -Absorption verläuft über die Bindung von Calcitriol an einen kernständigen VDR mit anschließender Expression von Calbindin- $\text{D}_{9\text{K}}$. Es war bekannt, dass bei Saugferkeln bis zur 4. Lebenswoche p.p. dieser Weg bei der Ca^{2+} -Absorption keine wesentliche Rolle spielt. In den nachfolgenden Versuchen sollte eine mögliche Bedeutung des schnellen, nicht-genomischen Effektes ("Fast response") von Calcitriol über die Bindung an einen

membranständigen VDR für die aktive Ca^{2+} - und P_i -Resorption im Duodenum von Saug- und Absetzferkeln untersucht werden.

4.2.1 Dosis-Wirkungs-Beziehung

Zunächst sollte diejenige Konzentration von Calcitriol bestimmt werden, bei der nach serosaler Zugabe die größte Stimulation der J_{ms} für Ca^{2+} im Dünndarm von Saugferkeln auftrat. Hierfür standen Epithelien von 4 Tieren im Alter von 4-6 Tagen p.p. zur Verfügung. Es ergab sich aber, dass die J_{ms} für Ca^{2+} hierbei weder durch $150 \text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$, noch $500 \text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ oder $1000 \text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ gesteigert werden konnten. Im Gegensatz dazu ergab derselbe Versuchsansatz mit Geweben von Absetzferkeln einen dosisabhängigen Effekt mit einer maximalen Stimulation der J_{ms} für Ca^{2+} um ungefähr 20 % bei $500 \text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Abb.3). Interessanterweise nahm der Stimulationseffekt bei Dosen über $500 \text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ bis $2000 \text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ vollständig ab.

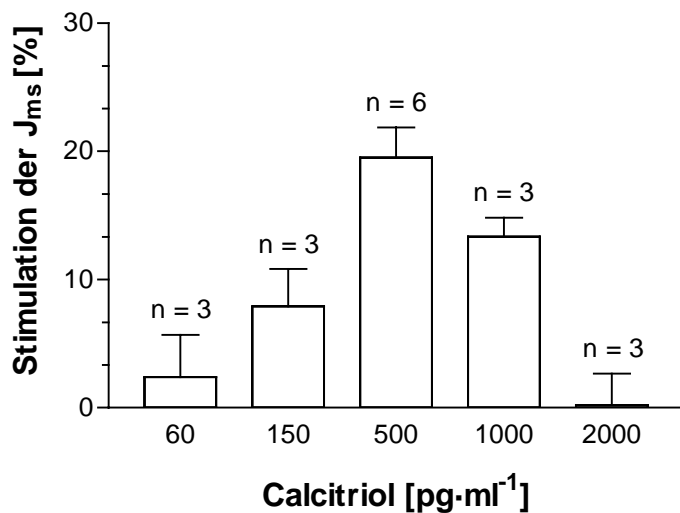


Abb. 3: Konzentrationsabhängige Stimulation der J_{ms} für Ca^{2+} bei Absetzferkeln (84 ± 0 Tage p.p., $19,3 \pm 2,2$ kg LM, n = Anzahl der Epithelien von jeweils ein bis zwei Ferkeln, $\bar{x} \pm \text{SEM}$).

4.2.2 Altersabhängigkeit der Wirkung von Calcitriol

Im Folgenden wurde der schnelle Effekt von $500 \text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ Calcitriol auf die elektrischen Parameter sowie die unidirektionalen und Nettofluxraten von Ca^{2+} und P_i bei Dünndarmepithelien von Saug- und Absetzferkeln vergleichend untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. 5 zusammengefasst und zur besseren Verdeutlichung sind Teilergebnisse in den Abb. 4-7 grafisch dargestellt.

Die basalen I_{sc} betragen bei den Saugferkeln im Vergleich zu den Absetzferkeln mehr als das 3fache, die G_t -Werte waren nicht nennenswert verschieden. Calcitriol hatte jedoch bei beiden Altersgruppen keinen sichtbaren Effekt auf diese Parameter. Unabhängig vom Alter verursachte Calcitriol eine minimale Steigerung der J_{ms} für Ca^{2+} von im Mittel um 1,7 % bei Saugferkeln und eine größere Stimulation von 13,3 % bei Absetzferkeln. Dieser Effekt war bei den Absetzferkeln signifikant. Da die J_{sm} bei beiden Versuchsgruppen unverändert blieben, war auch die jeweilige Zunahme der J_{net} für Ca^{2+} in ähnlicher Größenordnung und bei den Absetzferkeln mit $23,5 \pm 3,5 \%$ signifikant (siehe auch Abb. 4 und Abb. 5).

Unter nichtstimulierten Bedingungen waren die J_{ms} und J_{net} für P_i bei Saugferkeln signifikant höher als bei Absetzferkeln, während sich die J_{sm} nicht wesentlich unterschieden. Calcitriol bewirkte einen signifikanten Anstieg der J_{ms} für P_i im Mittel um 17,0 % bei den Saugferkeln und um 13,0 % bei den Absetzferkeln. Während die Substanz zu keiner Änderung der J_{sm} führte, resultierte daraus eine mit den J_{ms} vergleichbare signifikante Zunahme der J_{net} für P_i bei Saugferkeln um $24,9 \pm 6,4 \%$ und bei Absetzferkeln um $20,0 \pm 2,2 \%$ (siehe auch Abb. 6 und Abb. 7).

Die jeweiligen Effekte von Calcitriol auf den Ca^{2+} - und P_i -Transport wurden zwischen 10-40 min nach Zugabe beobachtet und zeigten während dieses Zeitraumes ihr Maximum.

Tab. 5: Wirkung von Calcitriol
 Elektrische Parameter (I_{sc} in $\mu\text{Eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$, G_i in $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-2}$) sowie unidirektionale (J_{ms} , J_{sm} in $\text{nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) und Nettofluxraten (J_{net} in $\text{nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) von Ca^{2+} und P_i im Duodenum von Saugferkeln (SF, $1,6 \pm 0,4$ Tage p.p., $1,7 \pm 0,1$ kg LM, $n = 5$ Tiere; $\bar{x} \pm \text{SEM}$) und Absetzferkeln (AF, für Ca^{2+} : $60,2 \pm 7,7$ Tage p.p., $13,0 \pm 1,4$ kg LM, $n = 6$ Tiere; für P_i : $42,0 \pm 0$ Tage p.p., $9,9 \pm 0,1$ kg LM, $n = 4$ Tiere; $\bar{x} \pm \text{SEM}$) unter Kontrollbedingungen und nach Zugabe von $500 \text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ Calcitriol zur serosalen Gewebesseite ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; n.s. nicht signifikant mit $p \geq 0,05$).

Gruppe	Calcitriol (-/+)	Elektrische Parameter		Ca^{2+}			P_i			
		I_{sc}	G_i	J_{ms}	J_{sm}	J_{net}	J_{ms}	J_{sm}	J_{net}	
SF	-	1,3 $\pm 0,02$	21,8 $\pm 1,1$	99,2 $\pm 6,0$	24,4 $\pm 2,2$	74,8 $\pm 6,9$	120,1 $\pm 7,9$	24,2 $\pm 1,8$	95,9 $\pm 8,8$	
	+	1,4 $\pm 0,1$	22,2 $\pm 1,8$	100,9 $\pm 8,3$	23,6 $\pm 2,0$	77,3 $\pm 9,9$	140,5 $\pm 6,0$	23,6 $\pm 1,7$	116,8 $\pm 6,6$	
	-	0,4 $\pm 0,1$	23,8 $\pm 0,7$	90,3 $\pm 9,9$	28,8 $\pm 0,4$	61,6 $\pm 9,9$	89,8 $\pm 5,7$	25,2 $\pm 2,8$	64,6 $\pm 2,9$	
AF	+	0,4 $\pm 0,1$	23,9 $\pm 1,2$	102,3 $\pm 11,2$	28,4 $\pm 1,2$	74,0 $\pm 10,4$	101,5 $\pm 5,7$	24,2 $\pm 3,4$	77,3 $\pm 2,3$	
Signifikanz einer zweifaktoriellen Varianzanalyse										
Varianzursache										
Alter		$p < 0,001$	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	$p < 0,05$	n.s.	$p < 0,05$	
Calcitriol		n.s.	n.s.	$p < 0,05$	n.s.	$p < 0,05$	$p < 0,001$	n.s.	$p < 0,01$	
Alter x Calcitriol		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	

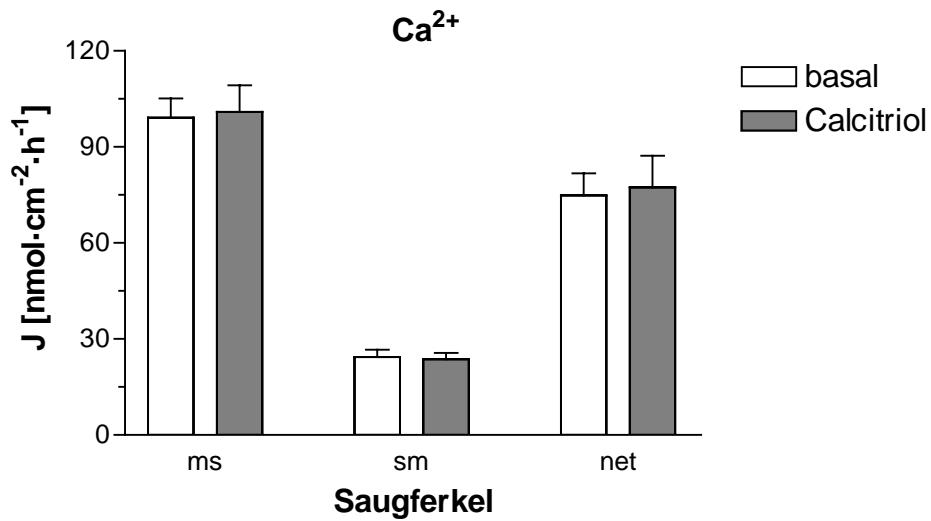


Abb. 4: Einfluss von Calcitriol auf die Ca²⁺-Fluxraten bei Saugferkeln (1,6 ± 0,4 Tage p.p., 1,7 ± 0,1 kg LM, n = 5 Tiere; $\bar{x} \pm \text{SEM}$; basal = ohne Calcitriolzugabe; Calcitriol = Calcitriolzugabe von 500 pg·ml⁻¹ in das serosale Kompartiment; ms = Ca²⁺-Fluxrate von mukosal nach serosal; sm = Ca²⁺-Fluxrate von serosal nach mukosal; net = ms – sm = Ca²⁺-Nettofluxrate).

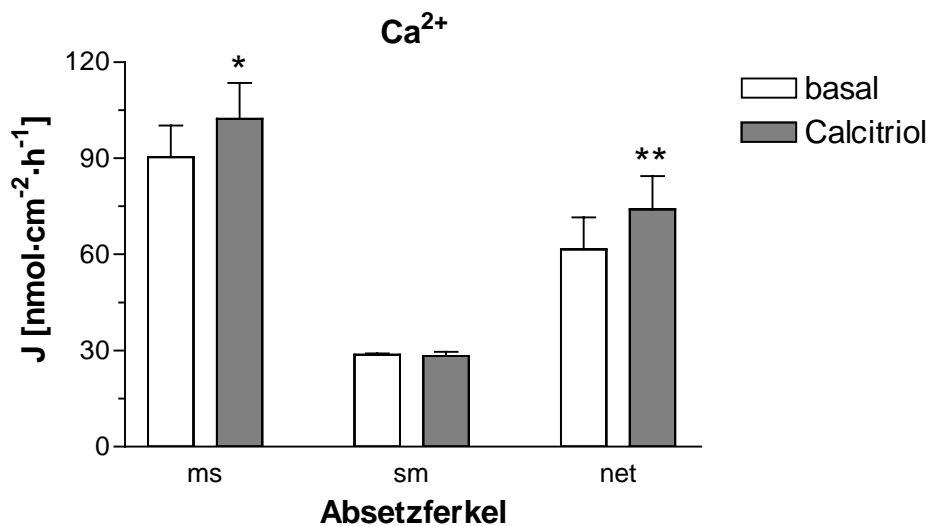


Abb. 5: Einfluss von Calcitriol auf die Ca²⁺-Fluxraten bei Absetzferkeln (60,2 ± 7,7 Tage, 13,0 ± 1,4 kg, n = 6 Tiere; $\bar{x} \pm \text{SEM}$; ** p < 0,01, * p < 0,05, Student's t-Test für verbundene Stichproben; weitere Erklärungen siehe Abb. 4).

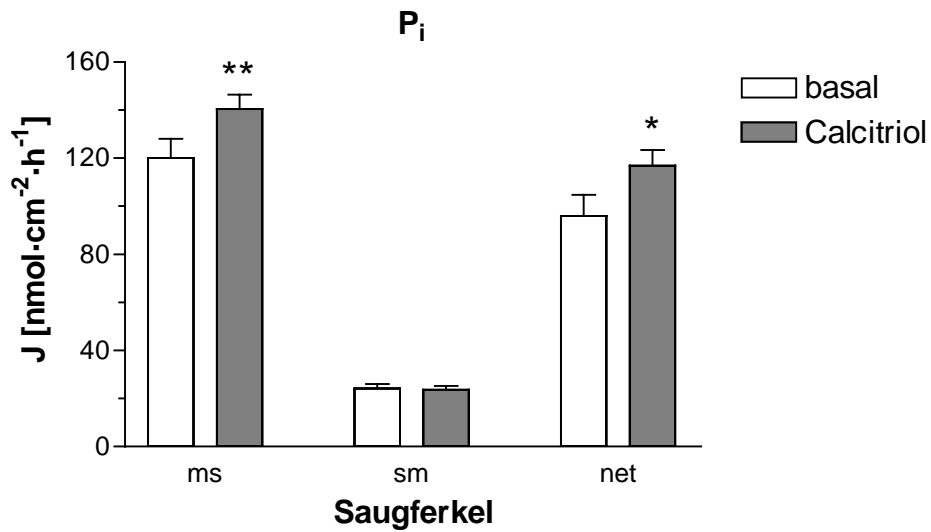


Abb. 6: Einfluss von Calcitriol auf die P_i -Fluxraten bei Saugferkeln ($1,6 \pm 0,4$ Tage p.p., $1,7 \pm 0,1$ kg LM, $n = 5$ Tiere; $\bar{x} \pm \text{SEM}$; ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, Student's t-Test für verbundene Stichproben; weitere Erklärungen siehe Abb. 4).

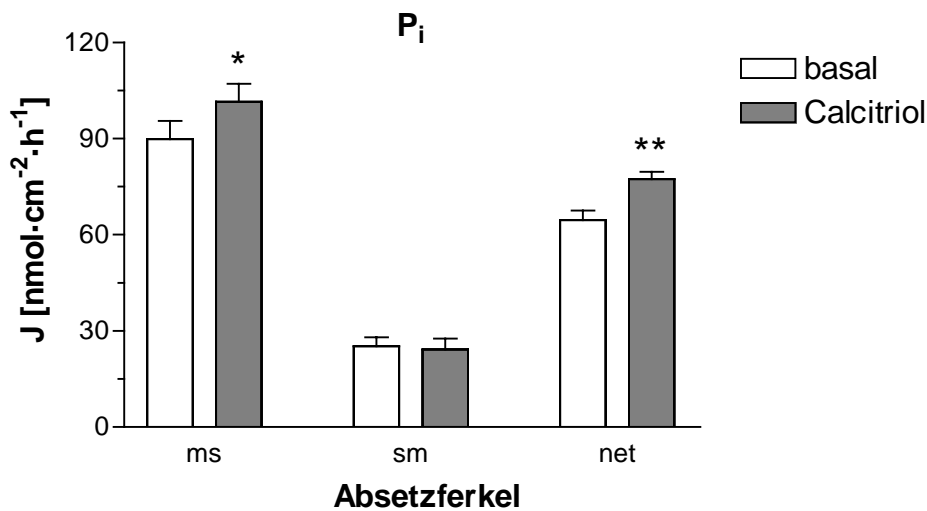


Abb. 7: Einfluss von Calcitriol auf die P_i -Fluxraten bei Absetzferkeln ($42,0 \pm 0$ Tage p.p., $9,9 \pm 0,1$ kg LM, $n = 4$ Tiere; $\bar{x} \pm \text{SEM}$; ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, Student's t-Test für verbundene Stichproben; weitere Erklärungen siehe Abb. 4).

4.2.3 Der Calcitriol-Effekt unter dem Einfluss von Colchicin

In diesem Versuchsabschnitt sollte untersucht werden, ob an dem zuvor beobachteten Calcitriol-Effekt auf die Ca^{2+} - und P_i -Nettofluxraten Mikrotubuli beteiligt sein könnten. Dazu wurden die calcitriolstimulierten Ca^{2+} - und P_i -Fluxraten in An- und Abwesenheit des Mikrotubuli-Antagonisten Colchicin ($1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, mukosal) erfasst. In Tab. 6 sind die Ergebnisse zusammengestellt. Zur besseren Verdeutlichung und zum Vergleich der alleinigen Colchicin- bzw. kombinierten Calcitriol/Colchicin-Effekte wurde die jeweilige Hemmung der J_{net} für Ca^{2+} und P_i aus den Tab. 5 und 6 als % Hemmung in Abb. 8 dargestellt.

Die I_{sc} und die G_t wurden bei Saug- und Absetzferkeln durch Colchicin nicht beeinflusst, allerdings betragen die I_{sc} wie schon vorher gesehen (Tab. 5) bei den Saugferkeln mehr als das 3fache als die der Absetzferkel.

Unabhängig vom Alter wurden die J_{ms} für Ca^{2+} im Mittel um 20,4 % bei den Saugferkeln und um 9,6 % bei den Absetzferkeln signifikant gehemmt. Die J_{sm} der Absetzferkel für Ca^{2+} überstiegen die der Saugferkel um ca. 43 %. Colchicin hatte bei beiden Altersgruppen keinen Einfluss auf die J_{sm} für Ca^{2+} . Demzufolge verringerten sich die J_{net} für Ca^{2+} in ähnlicher Weise wie die J_{ms} und dieser Effekt war signifikant. Die Hemmung der J_{net} für Ca^{2+} betrug $26,8 \pm 7,9$ % bei den Saugferkeln und $22,1 \pm 5,4$ % bei den Absetzferkeln (Abb. 8).

Die J_{ms} für P_i lagen bei den Saugferkeln wie vorher gesehen (Tab. 5) um ca. 50 % über den J_{ms} bei den Absetzferkeln. Colchicin hatte unabhängig vom Alter keinen signifikanten Effekt auf die J_{ms} . Auch die J_{sm} blieben bei Saug- und Absetzferkeln nahezu unverändert, so dass die Änderungen der J_{net} für P_i wie die der J_{ms} nicht signifikant waren. Im Einzelnen wurden die J_{net} für P_i bei den Saugferkeln um $2,6 \pm 8,3$ % und bei den Absetzferkeln um $13,4 \pm 3,9$ % gehemmt (Abb. 8).

Tab. 6: Einfluss von Colchicin auf die Calcitriolwirkung
 Elektrische Parameter (I_{sc} in $\mu\text{Eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$; G_t in $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-2}$) sowie unidirektionale (J_{ms} , J_{sm} in $\text{nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) und Nettofluxraten (J_{net} in $\text{nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) von Ca^{2+} und P_i im Duodenum von Saugferkeln (SF, $1,6 \pm 0,4$ Tage p.p., $1,7 \pm 0,1$ kg LM, $n = 5$ Tiere, $\bar{x} \pm \text{SEM}$) und Absetzferkeln (AF, für Ca^{2+} : $60,2 \pm 7,7$ Tage p.p., $13,0 \pm 1,4$ kg LM, $n = 6$ Tiere; für P_i : $42,0 \pm 0$ Tage p.p., $9,9 \pm 0,1$ kg LM, $n = 4$ Tiere; $\bar{x} \pm \text{SEM}$) vor und nach Zugabe von $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Colchicin zur mukosalen Gewebeseite in Anwesenheit von $500 \text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ Calcitriol ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; n.s. nicht signifikant mit $p \geq 0,05$).

Gruppe	Colchicin (-/+)	Elektrische Parameter		Ca^{2+}			P_i		
		I_{sc}	G_t	J_{ms}	J_{sm}	J_{net}	J_{ms}	J_{sm}	J_{net}
SF	-	1,4 $\pm 0,1$	22,2 $\pm 1,8$	92,6 $\pm 7,1$	23,2 $\pm 1,6$	69,3 $\pm 7,1$	154,1 $\pm 7,6$	27,0 $\pm 1,8$	127,1 $\pm 7,9$
	+	1,3 $\pm 0,2$	21,2 $\pm 2,0$	73,7 $\pm 8,1$	22,5 $\pm 1,7$	51,3 $\pm 8,1$	150,2 $\pm 11,4$	27,6 $\pm 1,9$	122,5 $\pm 9,5$
	-	0,4 $\pm 0,1$	23,9 $\pm 1,2$	91,0 $\pm 9,2$	33,0 $\pm 0,8$	58,0 $\pm 9,0$	101,2 $\pm 5,8$	30,4 $\pm 3,6$	70,7 $\pm 4,0$
AF	-	0,3 $\pm 0,02$	23,6 $\pm 1,2$	82,3 $\pm 9,6$	34,4 $\pm 0,7$	48,0 $\pm 9,9$	91,8 $\pm 7,2$	29,6 $\pm 3,4$	62,2 $\pm 5,8$
	+								
Varianzursache		Signifikanzen einer zweifaktoriellen Varianzanalyse							
Alter		$p < 0,001$	n.s.	n.s.	$p < 0,01$	n.s.	$p < 0,01$	n.s.	$p < 0,01$
Colchicin		n.s.	n.s.	$p < 0,01$	n.s.	$p < 0,01$	n.s.	n.s.	n.s.
Alter x Colchicin		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

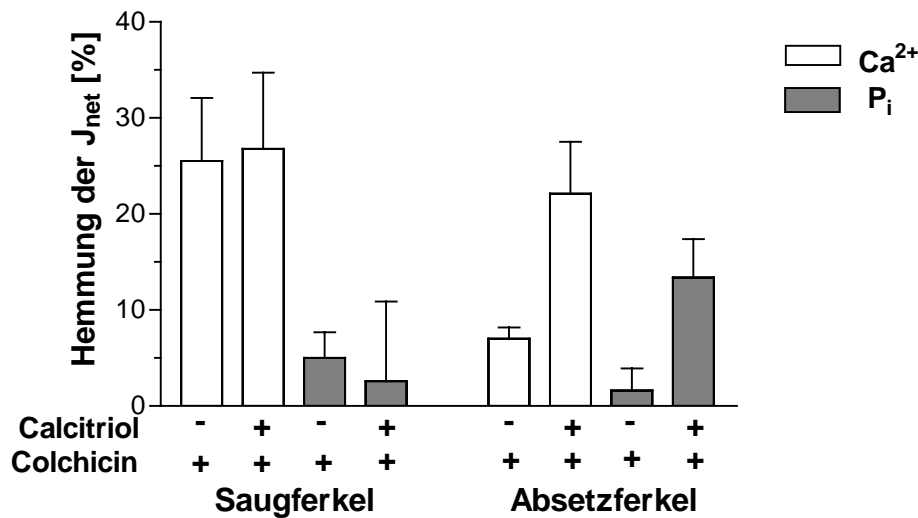


Abb. 8: Einfluss von $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Colchicin auf die Hemmung der Ca^{2+} - und P_i -Nettofluxraten (J_{net}) bei Saugferkeln ($1,6 \pm 0,4$ Tage p.p., $1,7 \pm 0,1$ kg LM, $n = 5$ Tiere; $\bar{x} \pm \text{SEM}$) und Absetzferkeln (für Ca^{2+} : $60,2 \pm 7,7$ Tage p.p., $13,0 \pm 1,4$ kg LM, $n = 6$ Tiere; für P_i : $42,0 \pm 0$ Tage p.p., $9,9 \pm 0,1$ kg LM; $\bar{x} \pm \text{SEM}$) in Anwesenheit von $500 \text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ Calcitriol (+) und ohne Calcitriolzugabe (-).

4.3 Einfluss von BAY K8644 auf den duodenalen Ca^{2+} -Transport

In diesem Versuchsabschnitt sollte geprüft werden, inwiefern sich der Ca^{2+} -Transport im Schweinedünndarm durch den Ca^{2+} -Kanal-Agonisten BAY K8644 in Analogie zu Befunden am Pansen (WADHWA 1998) stimulieren lässt. Die Ergebnisse der Untersuchungen an Präparaten von Saug- und Absetzferkeln mit $0,1$ bzw. $1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ des Kanal-Agonisten sind in Tab. 7 zusammengefasst.

Die basalen I_{sc} lagen bei Saugferkeln im Mittel 40% über entsprechenden I_{sc} bei Absetzferkeln. Die basalen G_t waren bei Saugferkeln um im Mittel 36% niedriger. Bei beiden Versuchstiergruppen hatte die Zugabe von BAY K8644 keinen Einfluss auf die elektrischen Parameter. Entsprechend den niedrigeren G_t -Werten bei der Saugferkelgruppe ergaben sich niedrigere unidirektionale Fluxraten für Ca^{2+} und P_i als bei den älteren Artgenossen. In keinem Fall hatte BAY K8644 einen nennenswerten Effekt.

Tab. 7: Wirkung von BAY K8644
 Elektrische Parameter (I_{sc} in $\mu\text{Eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$, G_i in $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-2}$) sowie unidirektionale (J_{ms} , J_{sm} in $\text{nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) und Nettofluxraten (J_{net} in $\text{nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) von Ca^{2+} und P_i im Duodenum von Saugferkeln (SF, $3,9 \pm 1,3$ Tage p.p., $2,1 \pm 0,4$ kg LM, $n = 5$ Tiere; $\bar{x} \pm \text{SEM}$) und Absetzferkeln (AF, $56,0 \pm 0$ Tage p.p., $16,5 \pm 0,5$ kg LM, $n = 3$ Tiere; $\bar{x} \pm \text{SEM}$) vor und nach Zugabe von BAY K8644 zur mukosalen Gewebeseite ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, n.s. nicht signifikant mit $p \geq 0,05$).

Gruppe	BAY K8644 ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	Elektrische Parameter		Ca^{2+}			P_i		
		I_{sc}	G_i	J_{ms}	J_{sm}	J_{net}	J_{ms}	J_{sm}	J_{net}
AF	0	$1,0 \pm 0,2$	$16,0 \pm 1,7$	$48,1 \pm 5,8$	$13,4 \pm 2,6$	$34,7 \pm 5,6$	$75,6 \pm 12,1$	$18,1 \pm 3,0$	$57,5 \pm 12,1$
	0,1	$1,1 \pm 0,3$	$14,0 \pm 1,5$	$37,4 \pm 5,5$	$12,1 \pm 2,5$	$25,3 \pm 4,3$	$79,9 \pm 15,0$	$16,7 \pm 3,4$	$63,2 \pm 14,4$
	1,0	$1,0 \pm 0,4$	$13,5 \pm 1,3$	$32,9 \pm 5,2$	$11,5 \pm 2,8$	$21,4 \pm 3,1$	$68,2 \pm 13,3$	$18,2 \pm 3,4$	$50,0 \pm 11,9$
SF	0	$0,6 \pm 0,1$	$25,0 \pm 2,5$	$125,4 \pm 28,2$	$25,8 \pm 6,5$	$99,6 \pm 28,3$	$92,5 \pm 2,5$	$21,3 \pm 6,7$	$71,2 \pm 7,2$
	0,1	$0,5 \pm 0,1$	$25,2 \pm 2,8$	$116,1 \pm 28,1$	$31,2 \pm 8,4$	$85,0 \pm 29,5$	$108,3 \pm 8,3$	$29,0 \pm 10,2$	$79,3 \pm 16,9$
	1,0	$0,5 \pm 0,1$	$27,9 \pm 4,7$	$109,2 \pm 29,2$	$33,7 \pm 8,4$	$75,5 \pm 30,5$	$107,5 \pm 12,5$	$34,0 \pm 10,4$	$73,6 \pm 17,2$
Signifikanzen einer zweifaktoriellen Varianzanalyse									
Varianzursache									
Alter		$p < 0,05$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	n.s.
BAY K8644		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Alter x BAY K8644		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

4.4 Untersuchungen zur Kompartimentierung von exogenem Ca^{2+} in jejunalen Enterozyten

Ein calcitriolabhängiger vesikulärer Ca^{2+} -Transport wurde schon früher für Hühner und Ratten postuliert (NEMERE et al. 1986, NEMERE und SZEGO 1981). Die Beobachtung, dass der Ca^{2+} -Gehalt der Enterozyten im Anschluss an einen calcitriolstimulierten Ca^{2+} -Transport nicht im Zytosol, sondern in endozytierten Vesikeln und Lysosomen am höchsten war sowie die Hemmung des Ca^{2+} -Transportes durch Colchicin, führte zu der Annahme, dass Ca^{2+} in vesikulärer Form unter Beteiligung der Mikrotubuli durch die Zelle transportiert wird und an der Basolateralmembran mittels Exozytose ausgeschleust wird.

Ziel des vorliegenden Versuchsabschnittes war es, die Möglichkeit eines vesikulären Ca^{2+} -Transportes bei Ferkeln zu untersuchen. Die subzelluläre Lokalisation von Ca^{2+} , nach Inkubation von Dünndarmepithelien mit ^{45}Ca , sollte in Anlehnung an eine vorher beschriebene Technik (NEMERE et al. 1986) mittels subzellulärer Fraktionierung, einer Kombination aus Differenzial- und Dichtegradientenzentrifugation, bestimmt werden.

4.4.1 Zeitabhängige Aufnahme von ^{45}Ca in Dünndarmepithelien von Absetzferkeln

In diesem Vorversuch wurden intakte Dünndarmepithelien (10 cm^2 Fläche) von Absetzferkeln mit ^{45}Ca inkubiert, um den Zeitverlauf der ^{45}Ca -Aufnahme in das Gewebe zu ermitteln. Die Aktivitätsabnahme in cpm in jeweils $100 \mu\text{l}$ Inkubationspufferlösung wurde über 60 min in 15minütigen Abständen erfasst und ist in Abb. 9 dargestellt. Sie sollte als indirektes, aber einfach zu erfassendes Maß für die ins Gewebe aufgenommene Aktivität dienen.

Bis 45 min Inkubation nahm die ^{45}Ca -Aktivität in der Inkubationslösung linear ab, während nach 60 min der 15 min-Wert wieder erreicht war. Die maximale ^{45}Ca -

Aufnahme in das Gewebe wurde also nach 45 min Inkubation erreicht. Die Zunahme der ^{45}Ca -Aktivität in der Pufferlösung im weiteren Inkubationsverlauf kann unterschiedliche Ursachen haben. So wäre es möglich, dass während der 45 min Inkubation die Aufnahme von ^{45}Ca ins Epithel überwog und anschließend ^{45}Ca vermehrt ausgeschleust wurde. Zu welchem Zeitpunkt ein Steady-state, also ein Gleichgewicht zwischen Aufnahme und Ausschleusung erreicht war, kann aufgrund dieser Befunde nicht ausgesagt werden. Auf der anderen Seite lässt sich nicht ausschließen, dass eine Schädigung des Gewebes für den Wiederanstieg der Radiotracermenge im Puffer verantwortlich war.

Um eine möglichst maximale Aufnahme ins Gewebe zu erreichen, bei gleichzeitiger Geringhaltung einer Gewebeschädigung durch zu lange Inkubationszeiten, wurde für die nachfolgenden Versuche eine Inkubationsdauer von 20 min ausgewählt.

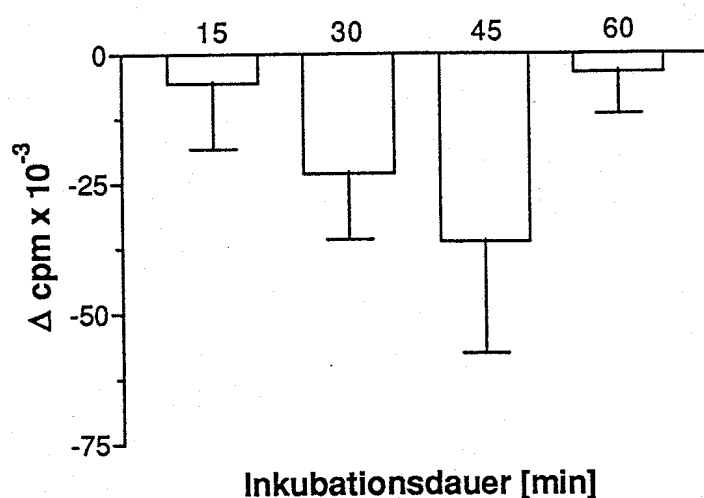


Abb. 9: Aktivitätsabnahme (Δcpm) von ^{45}Ca im Vergleich zum Startzeitpunkt in 100 μl Inkubationspufferlösung während 15-60 min Inkubation von isolierten, intakten Darmepithelien (vorderes Jejunum, Absetzferkel, 84 Tage p.p., 22,2 kg LM, jeweils 2 Epithelien mit 10 cm^2 Fläche von 2 Ferkeln ($\bar{x} \pm \text{SEM}$ der Epithelien)).

4.4.2 Verteilung der Markerenzym-Aktivitäten im Gesamthomogenat und in den Fraktionen der Differenzialzentrifugation sowie deren Anreicherungen

Nach 20minütiger Inkubation der Dünndarmepithelien von Absetzferkeln mit physiologischen Calcitriolplasmaspiegeln und calcitrioldefizienten Absetzferkeln sowie von neugeborenen Kontrollferkeln mit ^{45}Ca , erfolgte die subzelluläre Fraktionierung der hieraus angefertigten Homogenate. Die Proteinkonzentrationen und die spezifischen ^{45}Ca -Aktivitäten in den Homogenaten und den unterschiedlichen Fraktionen der Differenzialzentrifugation wurden bestimmt. Außerdem wurden die Aktivitäten wichtiger Leitenzyme, nämlich der alkalischen Phosphatase (Marker der Bürstensaummembranen), der Na^+/K^+ -ATPase (Marker der Basolateralmembranen) und der sauren Phosphatase (Lysosomen-Marker) gemessen. In Tab. 8 sind die Ergebnisse zusammengefasst:

Proteinkonzentrationen

Bei den Absetzferkeln gab es unabhängig vom Calcitriolstatus im Gesamthomogenat sowie in P_1 , P_2 und S_2 keine nennenswerten Unterschiede in den Proteinkonzentrationen. Bei den Saugferkeln war die Proteinkonzentration im Gesamthomogenat und in der P_1 -Fraktion signifikant um ca. 45 % bzw. 30 % niedriger als bei den Kontrollferkeln im Absetzalter. In der S_2 -Fraktion lag die Proteinkonzentration der Saugferkelpräparate sogar um fast 60 % niedriger als der Vergleichswert von Absetzferkeln.

Spezifische ^{45}Ca -Aktivitäten

Bei Absetzferkeln mit Calcitriolmangel betrug die spezifische ^{45}Ca -Aktivität in allen Fraktionen höchstens 45 % des Wertes bei gleichaltrigen gesunden Artgenossen. Aufgrund der relativ hohen Streuungen der Einzelwerte waren diese Unterschiede jedoch nicht in allen Fällen signifikant.

Die höchsten spezifischen ^{45}Ca -Aktivitäten ergaben sich unabhängig vom Alter und vom Calcitriolstatus in der S_2 -Fraktion. Dies bedeutet, dass es bei den AF Kon-Tieren zu einer Anreicherung um das $2,0 \pm 0,3$ fache kam, während diese bei den Saugferkeln $2,8 \pm 0,2$ betrug ($p = 0,08$). Die entsprechende Anreicherung bei den AF Def-Tieren betrug $2,1 \pm 0,3$.

Aktivitäten der alkalische Phosphatase

Generell waren die AP-Werte in der P_2 -Fraktion angereichert und in S_2 abgereichert (Tab. 9). Dies traf auch für die AP-Werte bei den Saugferkeln zu, wenn auch die Aktivitäten insgesamt um das 3-4fache über den Werten bei abgesetzten Kontrolltieren lagen.

Aktivitäten der Na^+/K^+ -ATPase

Die Aktivitäten der Na^+/K^+ -ATPase lagen bei den Saugferkeln in allen Fraktionen tendenziell höher als bei AF Kon-Tieren. Es kam zu Anreicherungen in der P_2 -Fraktion und zu Abreicherungen in der S_2 -Fraktion gegenüber dem Gesamthomogenat (Tab. 9).

Aktivitäten der sauren Phosphatase

Die Aktivitäten der sauren Phosphatase (SP) waren in der P_2 -Fraktion bei allen Versuchsgruppen deutlich um das 2-4fache angereichert, in der S_2 -Fraktion dagegen um ca. die Hälfte abgereichert. Insgesamt lagen die SP-Werte bei SF Kon-Ferkeln niedriger als bei AF Kon-Tieren.

Tab.8: Vergleich der Proteinkonzentrationen, der spezifischen ^{45}Ca -Aktivitäten, der Aktivitäten der alkalischen Phosphatase, der Na^+/K^+ -ATPase und der sauren Phosphatase im Gesamthomogenat und den unterschiedlichen Fraktionen der Differenzialzentrifugation bei jejunalen Schleimhautpräparationen von Absetzferkeln mit physiologischen Calcitriolplasmaspiegeln (AF Kon, $49,0 \pm 3,5$ Tage p.p., $13,2 \pm 2,7$ kg LM, $n = 4$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$) und mit erniedrigten Calcitriolplasmaspiegeln (AF Def, $49,0 \pm 3,5$ Tage p.p., $8,1 \pm 2,2$ kg LM, $n = 4$; $\bar{x} \pm \text{SEM}$) sowie von Saugferkeln (SF Kon, $2,3 \pm 0,8$ Tage p.p., $1,5 \pm 0,1$ kg LM, $n = 4$; $\bar{x} \pm \text{SEM}$); [$\bar{x} \pm \text{SEM}$, n.b. nicht bestimmt, Student's t-Test für unverbundene Stichproben zwischen AF Kon und AF Def sowie AF Kon und SF Kon; a,b $p < 0,1$; a,c $p < 0,05$; a,d $p < 0,01$; a,e $p < 0,001$, in den selben Zeilen].

	Gesamthomogenat				P ₁				P ₂				S ₂			
	<u>AF</u> <u>Kon</u>	<u>AF</u> <u>Def</u>	<u>SF</u> <u>Kon</u>	<u>SF</u> <u>Kon</u>	<u>AF</u> <u>Kon</u>	<u>AF</u> <u>Def</u>	<u>SF</u> <u>Kon</u>	<u>SF</u> <u>Kon</u>	<u>AF</u> <u>Kon</u>	<u>AF</u> <u>Def</u>	<u>SF</u> <u>Kon</u>	<u>SF</u> <u>Kon</u>	<u>AF</u> <u>Kon</u>	<u>AF</u> <u>Def</u>	<u>SF</u> <u>Kon</u>	<u>SF</u> <u>Kon</u>
Protein (mg/ml)	16,6 ^a ± 1,8	14,7 ± 1,0	9,0 ^c ± 1,1	7,5 ^b ± 0,8	11,1 ^a ± 1,4	11,9 ± 0,7	5,1 ± 0,8	4,1 ^b ± 0,8	21,2 ^a ± 4,2	8,5 ^c ± 1,6	9,0 ^c ± 2,4	2,0 ± 0,4	8,3 ^a ± 0,3	8,0 ± 0,7	3,5 ^e ± 0,4	3,5 ^e ± 0,4
^{45}Ca (cpm x 10 ⁻³ / mg Protein)	32,6 ^a ± 9,1	11,9 ^b ± 1,0	16,7 ± 4,1	4,1 ^b ± 0,8	16,6 ^a ± 6,1	5,1 ± 0,7	5,1 ± 0,7	4,1 ^b ± 0,8	298,6 ^a ± 88,6	8,5 ^c ± 1,6	9,0 ^c ± 2,4	1086,1 ^e ± 69,0	37,3 ^a ± 5,5	29,3 ± 3,9	166,5 ^b ± 63,4	166,5 ^b ± 63,4
Alkalische Phosphatase (U/g Protein)	139,2 ^a ± 22,3	141,8 ± 36,9	510,0 ^d ± 64,3	521,1 ^c ± 99,1	186,6 ^a ± 43,2	151,8 ± 24,8	151,8 ± 24,8	521,1 ^c ± 99,1	83,9 ± 7,1	62,1 ± 14,4	135,2 ± 41,5	1086,1 ^e ± 69,0	2,2 ± 0,6	5,2 ± 1,7	4,1 ± 1,4	4,1 ± 1,4
Na^+/K^+ -ATPase (U/g Protein)	26,0 ± 3,1	25,3 ± 2,3	51,5 ± 16,3	61,5 ± 17,8	37,3 ± 8,6	29,0 ± 2,3	29,0 ± 2,3	61,5 ± 17,8	83,9 ± 7,1	62,1 ± 14,4	135,2 ± 41,5	1086,1 ^e ± 69,0	2,2 ± 0,6	5,2 ± 1,7	4,1 ± 1,4	4,1 ± 1,4
Saure Phosphatase (U/g Protein)	80,0 ± 17,3	80,0 ± 7,5	50,8 ± 7,1	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	306,8 ^a ± 74,1	325,0 ± 55,1	109,0 ^b ± 20,5	1086,1 ^e ± 69,0	43,3 ± 3,3	42,0 ± 3,5	38,8 ± 5,6	38,8 ± 5,6

Tab. 9: Vergleich der Anreicherungsfaktoren der Aktivitäten der alkalischen Phosphatase, der Na⁺/K⁺-ATPase und der sauren Phosphatase in der P₂- und der S₂-Fraktion im Vergleich zum Ausgangshomogenat jejunaler Schleimhautpräparationen von Absetzferkeln mit physiologischen Calcitriolplasmaspiegeln (AF Kon, 49,0 ± 3,5 Tage p.p., 13,2 ± 2,7 kg, n = 4) und mit erniedrigten Calcitriolplasmaspiegeln (AF Def, 49 ± 3,5 Tage p.p., 8,1 ± 2,2 kg LM, n = 4), sowie von neugeborenen Kontrollferkeln (SF Kon, 2,3 ± 0,8 Tage p.p., 1,5 ± 0,1 kg LM, n = 4), [$\bar{x} \pm \text{SEM}$].

Marker	Fraktion	AF Kon	AF Def	SF Kon
Alkalische Phosphatase	P2	2,0 ± 0,4	1,4 ± 0,1	2,2 ± 0,3
	S2	0,3 ± 0,02	0,2 ± 0,02	0,3 ± 0,1
Na⁺/K⁺-ATPase	P2	3,4 ± 0,2	2,3 ± 0,3	2,7 ± 0,3
	S2	0,1 ± 0,02	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,03
Saure Phosphatase	P2	4,4 ± 1,2	4,0 ± 0,4	2,1 ± 0,1
	S2	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,05	0,8 ± 0,1

4.4.3 Dichtegradientenzentrifugation der P₂-Fraktion

In diesem Versuchsabschnitt wurde die P₂-Fraktion auf einem 10-50%igen Saccharosegradienten aufgetrennt. Die Verteilung innerhalb des Gradienten wurde bei Saugferkeln, bei Absetzferkeln mit physiologischen Calcitriolplasmaspiegeln und bei calcitrioldefizienten Absetzferkeln untersucht. Nach der Zentrifugation wurde der Gradient in 10 Fraktionen aufgeteilt und in jeder Fraktion die spezifische ⁴⁵Ca-Aktivität in cpm/mg Protein bestimmt.

Abb. 10 zeigt die ^{45}Ca -Verteilung der P_2 -Unterfraktionen. Die ^{45}Ca -Aktivitäten lagen bei AF Kon in allen Fraktionen höher als bei den anderen Gruppen. Wesentliche Unterschiede im ^{45}Ca -Verteilungsmuster der Fraktionen 1-10 ergaben sich jedoch zwischen den Tiergruppen nicht.

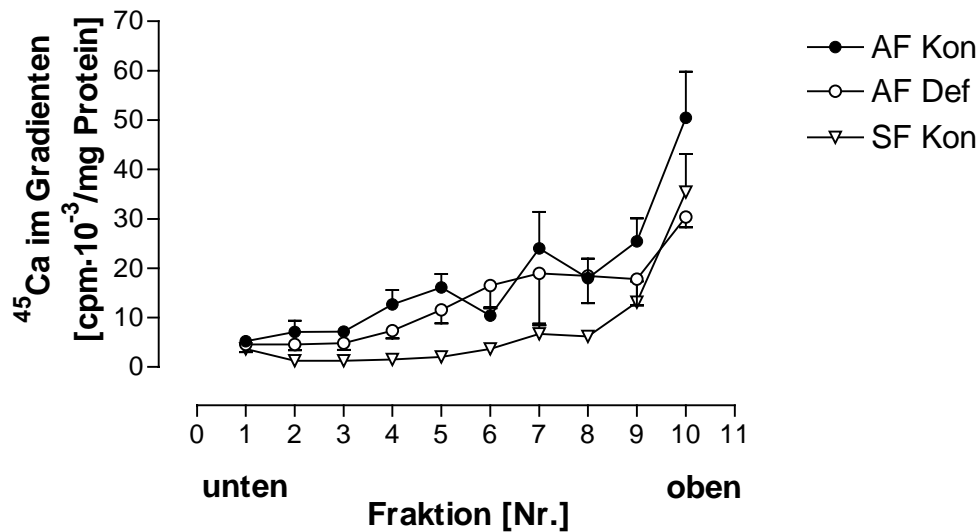


Abb. 10: Verteilung der spezifischen ^{45}Ca -Aktivitäten in den 10 Fraktionen eines 10-50%igen Saccharosegradienten, ausgehend von P_2 , bei jejunalen Schleimhautpräparationen von Absetzferkeln mit physiologischen Calcitriolplasmaspiegeln (AF Kon, $49,0 \pm 3,5$ Tage p.p., $13,2 \pm 2,7$ kg LM, $n = 4$) und mit erniedrigten Calcitriolplasmaspiegeln (AF Def, $49,0 \pm 3,5$ Tage p.p., $8,1 \pm 2,2$ kg LM, $n = 4$), sowie von Saugferkeln (SF Kon, $2,3 \pm 0,8$ Tage p.p., $1,5 \pm 0,1$ kg LM, $n = 4$); [$\bar{x} \pm \text{SEM}$].

4.5 Protein-, ⁴⁵Ca- und Enzym-Recoveries

Die jeweiligen Recoveries der Proteinkonzentrationen, der ⁴⁵Ca-Aktivitäten, der Aktivitäten der Na⁺/K⁺-ATPase und der alkalischen Phosphatase sind in Tab. 10 dargestellt. Die Recoveries der sauren Phosphatase konnten nicht errechnet werden, da die Vergleichsaktivitäten der P₁- bzw. S₁-Fraktion nicht bestimmt wurden.

Tab. 10: Recoveries (in %) der Proteinkonzentrationen, der spezifischen ⁴⁵Ca-Aktivitäten und der Markerenzym-Aktivitäten bei Saugferkeln (SF Kon, 2,3 ± 0,8 Tage p.p., 1,5 ± 0,1 kg LM, n = 4; $\bar{x} \pm \text{SEM}$), bei Absetzferkeln (AF Kon, 49,0 ± 3,5 Tage p.p., 13,2 ± 2,7 kg LM, n = 4; $\bar{x} \pm \text{SEM}$) und bei calcitrioldefizienten Absetzferkeln (AF Def, 49,0 ± 3,5 Tage p.p., 8,1 ± 2,2 kg LM, n = 4; $\bar{x} \pm \text{SEM}$); [**a** = Recovery-Summe von P₁, P₂ und S₂ relativ zum Gesamthomogenat. **b** = Recoveries der Summe der 10 Fraktionen im Saccharosegradienten relativ zur Ausgangsaktivität in P₂; $\bar{x} \pm \text{SEM}$].

	AF Kon	AF Def	SF Kon
Protein (a)	89,0 ± 6,0	98,0 ± 1,5	93,0 ± 3,0
Protein (b)	54,0 ± 8,0	56,0 ± 11,0	82,0 ± 9,0
⁴⁵ Ca ²⁺ (a)	92,0 ± 1,0	95,0 ± 2,0	96,0 ± 0,3
⁴⁵ Ca ²⁺ (b)	85,0 ± 5,0	92,0 ± 5,0	97,0 ± 1,0
Na⁺/K⁺-ATPase (a)	87,0 ± 2,0	89,0 ± 3,0	88,0 ± 3,0
Alkalische Phosphatase (a)	87,0 ± 3,0	90,0 ± 4,0	80,0 ± 4,0

Mit Ausnahme der Protein-Recoveries der gesammelten 10 Fraktionen des Dichtegradienten bei den Absetzferkeln, lagen die dargestellten Recoveries zwischen 80 und 98 % und können als ausreichend angesehen werden.

5 Diskussion

5.1 Beurteilung der Methoden

Zur Charakterisierung der Mechanismen des transepithelialen Ca^{2+} -Transportes im vorderen Dünndarm neugeborener Ferkel wurden in der vorliegenden Arbeit zwei unterschiedliche In-vitro-Methoden angewendet: die Ussing-Kammer-Technik zur Erfassung der unidirektionalen Ca^{2+} -Fluxraten und die Inkubation von 10 cm^2 großen jejunalen Schleimhautpräparationen mit ^{45}Ca und anschließende subzelluläre Fraktionierung. Parallel zu den Untersuchungen bei Saugferkeln wurden mit der Ussing-Kammer-Technik auch Untersuchungen bei Absetzferkeln mit physiologischem Calcitriolstatus durchgeführt. Auf diese Weise sollten Rückschlüsse auf die Altersabhängigkeit der jeweiligen Effekte gezogen werden. Außerdem wurden in denselben Kammern, zeitgleich mit der Messung der Ca^{2+} -Fluxraten auch die P_i -Fluxraten bestimmt, um die Spezifität möglicher Effekte für die Ca^{2+} -Fluxraten besser beurteilen zu können.

Die subzelluläre Fraktionierung wurde bei Saugferkeln, bei Absetzferkeln mit physiologischen Calcitriolplasmaspiegeln und bei calcitrioldefizienten Absetzferkeln durchgeführt. Neben der Altersabhängigkeit sollte auf diese Weise auch die Calcitriolabhängigkeit der intrazellulären Kompartimentierung von Ca^{2+} untersucht werden.

Ussing-Kammer-Technik

Die Ussing-Kammer-Technik wurde ursprünglich für Untersuchungen ionaler Transportvorgänge an der Froschhaut entwickelt (USSING und ZEHRAN 1951) und später für zahlreiche Studien intestinaler Transportvorgänge bei Säugetieren, wie z.B. bei Schweinen, in modifizierter Form angewendet (SCHRÖDER et al. 1991). Mit der Ussing-Apparatur können unidirektionale Fluxraten von Ionen, die in Form eines Radioisotopes zugegeben werden, von mukosal nach serosal (J_{ms}) und in die

umgekehrte Richtung (J_{sm}) ermittelt werden. Nettofluxraten errechnen sich aus der Differenz der beiden unidirektionalen Fluxraten ($J_{net}=J_{ms}-J_{sm}$). Die verwendeten Pufferlösungen sind in der Regel isoional zusammengesetzt, um chemische Gradienten zu eliminieren, und die transepitheliale Potenzialdifferenz kann technisch auf 0 mV abgeglichen werden, um elektrische Gradienten, die passive Ionenbewegungen antreiben könnten, auszuschließen. Wenn unter diesen Messbedingungen signifikant von Null verschiedene J_{net} auftreten, kann dies als sicherer Hinweis für das Vorliegen aktiver, transzellulärer Transportvorgänge am beobachteten Prozess gewertet werden (FAVUS et al. 1985). Positive J_{net} bedeuten dabei eine aktive Nettoabsorption. Dementsprechend stehen negative J_{net} für aktive Nettosekretionsvorgänge.

Neben der Ermittlung der unidirektionalen Fluxraten wurden auch elektrische Kenngrößen wie der Kurzschlussstrom und die Gewebeleitfähigkeit ermittelt. Unspezifische Effekte auf das Gewebe, wie z.B. Einflüsse der Versuchsdauer und der verwendeten Substanzen, lassen sich mit Hilfe dieser beiden Kenngrößen ermitteln. Da der Kurzschlussstrom ein Maß für die elektrogenen intestinalen Transportvorgänge ist und die Gewebeleitfähigkeit die Ionenpermeabilität des Gewebes charakterisiert, lassen diese beiden Kenngrößen Rückschlüsse auf die Vitalität und die Integrität des Gewebes zu. Die unter basalen Bedingungen gemessenen Kurzschlussströme und Gewebeleitfähigkeiten bei Saug- und Absetzferkeln entsprechen in ihrer Größenordnung den Daten aus früheren Untersuchungen (SCHRÖDER et al. 1991, SCHRÖDER et al. 1993, SCHRÖDER et al. 1998a,b).

Während der Fluxratenmessungen unter unbeeinflussten Bedingungen veränderten sich I_{sc} und G_t nicht nennenswert. Unter dem Einfluss der Zytoskelett-Antagonisten kam es zumindest teilweise zu signifikanten Veränderungen der elektrischen Gewebeparameter, die dann in den entsprechenden Abschnitten diskutiert werden. Bezüglich der I_{sc} -Werte gab es bis auf die Untersuchungen mit Latrunculin B (Tab. 2) altersabhängige Unterschiede. Die bei den Saugferkeln im Gegensatz zu den Absetzferkeln allgemein beobachteten höheren Kurzschlussströme, lassen sich durch entsprechend höhere Nettoionenfluxraten bei diesen Tieren erklären und

wurden auch schon früher gefunden (SCHRÖDER et al. 1998a,b). Warum dieser Effekt bei den mit Latrunculin B verwendeten Darmabschnitten nicht zu beobachten war, konnte nicht geklärt werden. Möglicherweise hängt dieses aber mit dem im Vergleich höheren Alter der entsprechenden Saugferkel zusammen (3,5 Tage p.p. gegenüber 1,5 Tage p.p.).

Subzelluläre Fraktionierung

Die Methode der subzellulären Fraktionierung wurde in der vorliegenden Arbeit von einer Methode abgeleitet, die bereits bei Hühnern durchgeführt wurde (NEMERE et al. 1986). Das Zentrifugationsschema entstammte der Arbeit von WEISER et al. (1978). Intakte jejunale Epithelstücke (10 cm^2) von Saugferkeln, Absetzferkeln mit physiologischen Calcitriolplasmaspiegeln und calcitrioldefizienten Absetzferkeln wurden in einer Inkubationslösung mit ^{45}Ca inkubiert. Nach einem Vorversuch zur Bestimmung der Zeitabhängigkeit der ^{45}Ca -Aufnahme ins Gewebe, wurde eine Inkubationsdauer von 20 min ausgewählt. Diese Inkubationsdauer wurde gewählt, um eine Aufnahme von ^{45}Ca in das Gewebe zu erzielen und gleichzeitig unspezifische inkubationsbedingte Effekte auf das Epithel möglichst gering zu halten. Die weiteren Homogenisierungsschritte erfolgten in einem Homogenisierungspuffer, der neben Saccharose und Tris (basisch) auch $10 \mu\text{g/ml}$ Rutheniumrot und $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EGTA enthielt. Die beiden letztgenannten Agenzien sollten den Eintritt von ^{45}Ca in die Ca^{2+} -speichernden Mitochondrien verhindern. Ca^{2+} -Ionen werden hierbei von EGTA komplexiert und Rutheniumrot verhindert die Aufnahme von Ca^{2+} in die Mitochondrien (SEVERSON et al. 1974, SEVERSON et al. 1976, NEMERE et al. 1986).

Zwei Differenzialzentrifugationsschritte ergaben die Aufteilung der mittels eines Dounce-Homogenisators rupturierten Enterozyten in Zellkerne und Bürstensaummembranen (P_1), in Zellorganellen und Basolateralmembranen (P_2) und in eine zytosolische Fraktion einschließlich microsomalier Bestandteile (S_2). Die Bestimmung von Markerenzym-Aktivitäten für Bürstensaummembranen (Aktivitäten der alkalischen Phosphatase), Basolateralmembranen (Aktivitäten der Na^+/K^+ -

ATPase) und Lysosomen (Aktivitäten der sauren Phosphatase) im Gesamthomogenat sowie in P_1 , P_2 und S_2 ergab eine vergleichbare Aufteilung der Zellfraktionen und entsprechenden Anreicherungs-faktoren der Markerenzyme wie vormals von NEMERE et al. (1986) beschrieben (Tab. 8, Tab. 9). Auf die Ergebnisse der Dichtegradientenzentrifugation der P_2 -Fraktion wird später eingegangen.

5.2 Aktinfilamente und Ca^{2+} -Transport

Versuche mit Cytochalasin D

Das Toxin Cytochalasin D des Pilzes *Zygosporium mansonii* zerstört Aktinfilamente und damit die organisierte Netzstruktur des Zytoskeletts (SCHLIWA 1982).

Es wurde hier der mukosalen Gewebeseite des Duodenums von Saugferkeln in einer Konzentration von $16 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ als Festsubstanz zugegeben. Die J_{ms} für Ca^{2+} wurden dadurch signifikant um ca. 40 % gehemmt (Tab. 1). Da die J_{sm} nahezu unverändert blieben, lag die Hemmung der Ca^{2+} -Nettofluxraten bei durchschnittlich 53 %. Ähnlich verhielt es sich für die entsprechenden P_i -Fluxraten. Hier konnte der inhibitorische Effekt jedoch aufgrund der relativ hohen interindividuellen Streuung statistisch nicht gesichert werden (Tab. 1).

Diese Befunde weisen darauf hin, dass die Integrität der Aktinfilamente für den aktiven intestinalen Ca^{2+} -Transport bei Saugferkeln von großer Bedeutung ist. Auch für P_i scheint dies, wenn auch nur tendenziell, möglich zu sein. Vergleichbare Versuchsansätze in der Literatur finden sich kaum. In einer Untersuchung mit dem Aktinfilamentinhibitor Cytochalasin B konnte keine Hemmung des durch Calcitriol stimulierten intestinalen Ca^{2+} -Transportes bei Hühnern erreicht werden (NEMERE und NORMAN 1987).

Die signifikante Hemmung des Kurzschlussstromes durch das Agens um etwa 25 % lässt sich durch eine entsprechende Abnahme der Nettoionenfluxrate erklären. Um welche Ionenarten es sich in diesem Fall handeln könnte, wurde nicht untersucht. Der deutliche Effekt auf den I_{sc} zeigt aber, dass neben dem Ca^{2+} - und P_i -Transport

noch weitere Transportmechanismen oder Zellfunktionen durch Cytochalasin D beeinflusst werden. Die Spezifität des Effektes von Cytochalasin D auf den Ca^{2+} - oder P_i -Transport erschien deshalb für die weiteren Untersuchungen als nicht in ausreichendem Maße gegeben. Möglicher Grund dafür war die relativ hohe Konzentration von $16 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, die verwendet werden musste, um eine signifikante Wirkung auf den Ca^{2+} -Transport zu erzielen. Aus diesem Grunde wurde ein weiterer Aktinfilamentinhibitor, das Latrunculin B, geprüft.

Versuche mit Latrunculin B

Latrunculin B ist ein marines Toxin aus dem Meeresschwamm *Latrunculia magnifica* (SPECTOR et al. 1983). Es zerstört die Organisation von Aktinfilamenten, indem es deren Polymerisation verhindert. Es bindet an G-Aktin (=globuläres Aktin), welches daraufhin F-Aktin (=filamentöses Aktin) polymerisiert. Dadurch wird die Filamentbildung verhindert. Latrunculin B ist 10-100fach wirksamer als Cytochalasin (SPECTOR et al. 1989). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Fluxratenmessungen am Duodenum von Saugferkeln haben gezeigt, dass bei einer Konzentration von $1,25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Latrunculin B auf der mukosalen Gewebeseite sowohl der Ca^{2+} - als auch der P_i -Transport von mukosal nach serosal maximal gehemmt wurden. Die Hemmung betrug jeweils etwa 60 %. Bei Verdopplung der Latrunculin B-Konzentration nahm die inhibitorische Wirkung wieder ab. Daraufhin wurde die Wirkung von Latrunculin B auf die Ca^{2+} - und P_i -Fluxraten bei Saug- und Absetzferkeln unter Verwendung von $1,25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ der Substanz untersucht.

Bei den Saugferkeln kam es zu einer signifikanten Hemmung der Ca^{2+} -Nettofluxraten um etwa 45 %, die ausschließlich auf die Hemmung der J_{ms} zurückging, während die J_{sm} nahezu unverändert blieben (Tab. 2).

Die Verminderung des Ca^{2+} -Nettotransportes bei den Absetzferkeln um ca. 32 % beruhte dagegen auf einer Erhöhung der J_{sm} , nicht aber der J_{ms} . Der Einfluss von Latrunculin B auf die P_i -Fluxraten entsprach dem jeweiligen Effekt auf die Ca^{2+} -Fluxraten. Insgesamt handelte es sich also um altersabhängige, nur bei Saugferkeln

zu beobachtende inhibitorische Effekte von Latrunculin B auf die J_{ms} von Ca^{2+} und P_i .

Diese Ergebnisse decken sich mit vergleichbaren Befunden aus einer vorausgegangenen Arbeit (DAHL 1999), bei der aber eine geringere Anzahl an Versuchstieren zur Verfügung stand.

Neben den Auswirkungen von Latrunculin B auf das Zytoskelett, können auch bei Verwendung von Latrunculin B unspezifische Effekte auf das Epithel, wie sie auch schon für Cytochalasin D beschrieben wurden, nicht vollständig ausgeschlossen werden, denn die I_{sc} - und G_t -Werte waren jeweils geringfügig aber signifikant reduziert (Tab. 1). Allerdings waren die Veränderungen bei beiden Altersgruppen gleichgerichtet, während die J_{ms} von Ca^{2+} - und P_i nur bei den Saugferkeln signifikant gehemmt wurden, so dass es sich dabei wahrscheinlich um einen spezifischen Effekt handelt. Daraus lässt sich ableiten, dass während der frühen postnatalen Lebensphase intakte Aktinfilamente sowohl für die Ca^{2+} - als auch für die P_i -Transzytose von Bedeutung sind. Unklar ist, warum das Toxin bei den Absetzferkeln die J_{sm} von Ca^{2+} und P_i so deutlich stimulierte, nicht jedoch bei Saugferkeln. Dies ist ein wesentlicher Unterschied zum Mikrotubuli-Antagonisten Colchicin, dessen Effekte im Folgenden diskutiert werden sollen.

5.3 Mikrotubuli und Ca^{2+} -Transport

Colchicin, ein aus der Herbstzeitlosen *Colchicum autumnale* gewonnenes Alkaloid, depolymerisiert Mikrotubuli (BURNS 1992, UPPULURI 1993).

In der vorliegenden Arbeit wurde $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Colchicin mukosal zugegeben und die Wirkung auf die unidirektionalen Ca^{2+} - und P_i - Fluxraten bei Saug- und Absetzferkeln untersucht. Diese Konzentration wurde auch in früheren Arbeiten bei Küken, Ratten und Schweinen eingesetzt (NEMERE et al. 1984, NASSAR et al. 1988, GHISHAN 1992, SCHRÖDER et al. 1998a,c). Colchicin führte nur bei den Saugferkeln, jedoch nicht bei den Absetzferkeln zu einer signifikanten Hemmung der

Ca^{2+} -Nettofluxraten um im Mittel 23 %, die auf einer signifikanten Hemmung der J_{ms} beruhte, während die J_{sm} unverändert blieben. Die entsprechenden P_i -Fluxraten wurden bei beiden Altersgruppen nicht nennenswert beeinflusst (Tab. 3). Diese Befunde decken sich mit Angaben aus der Literatur. Bei Ratten lag die colchicininduzierte Hemmung des Ca^{2+} -Transportes bei ca. 34 % und bei Küken wurde eine Hemmung von ca. 40 % beobachtet (NEMERE et al. 1984, NASSAR et al. 1988). Fluxratenmessungen in Ussing-Kammern am Schweinedünndarm haben in einer vorausgegangenen Arbeit bereits ebenfalls vergleichbare Ergebnisse gezeigt (DAHL 1999).

Die Ergebnisse deuten demnach auf zwei verschiedene Transportwege für Ca^{2+} bei Saug- und Absetzferkeln hin, wobei der Ca^{2+} -Transport nur bei Saugferkeln intakte Mikrotubuli voraussetzt. Dadurch, dass Colchicin keinen Effekt auf den gleichzeitig stattfindenden P_i -Transport und nur einen geringen Effekt auf die I_{sc} hatte, kann von einer spezifischen Colchicinwirkung auf die J_{ms} für Ca^{2+} ausgegangen werden.

Um auszuschließen, dass Colchicin einen Einfluss auf den parazellulären Ca^{2+} -Transport hatte, der die Reduktion der J_{ms} erklären könnte, wurden die Fluxraten des Parazellulärmarkers Mannit (FAVUS und ANGEID-BACKMAN 1984) in An- und Abwesenheit von Colchicin gemessen. Colchicin hatte keinen wesentlichen Einfluss auf die Mannitfluxraten (Tab. 4), was die Annahme einer relativ großen Spezifität der Colchicinwirkung auf den J_{ms} und J_{net} von Ca^{2+} hervorhebt.

5.4 „Schnelle“ Wirkung von Calcitriol auf den Ca^{2+} -Transport

Bislang war nicht bekannt, ob bei Ferkeln ein calcitriolinduzierter „Fast response“ des Ca^{2+} -Transportes existiert, wie er schon für Ratten und Hühner beschrieben wurde (GOODMAN et al. 1972, NEMERE und SZEGO 1981a,b, RASMUSSEN et al. 1982, NEMERE et al. 1984).

Die serosale Zugabe von Calcitriol führte bei den Saugferkeln zu keiner nennenswerten Stimulation der J_{ms} für Ca^{2+} , während die J_{ms} für P_i innerhalb von 10-

40 min nach Applikation um durchschnittlich 17 % anstiegen (Tab. 5). Da die J_{sm} für P_i nahezu unverändert waren, ergab sich ein signifikanter Anstieg der P_i -Nettofluxraten um 22 %. Aus früheren Untersuchungen bei Saugferkeln wurde geschlossen, dass während dieser Lebensphase an der aktiven Ca^{2+} - und P_i -Absorption keine zellkernvermittelten Calcitriol-Effekte beteiligt sind (SCHRÖDER et al. 1998a,b, SCHRÖDER et al. 1996). Durch die vorliegende Untersuchung erscheint es nunmehr auch als unwahrscheinlich, dass nicht-genomische Effekte von Calcitriol auf den Ca^{2+} -Transport existieren. Im Gegensatz dazu scheinen schnelle Calcitriol-Effekte auf den P_i -Transport bei Saugferkeln an der aktiven P_i -Absorption beteiligt zu sein. Ob dieses eine physiologische Relevanz hat, muss erst in weiteren Untersuchungen abgeklärt werden.

Bei den Absetzferkeln kam es zu einer schnellen, von Calcitriol innerhalb von 10-40 min induzierten Stimulation des Ca^{2+} - und des P_i -Transportes. Die Nettofluxraten beider Ionen stiegen, aufgrund einer Stimulation der J_{ms} bei nahezu unveränderten J_{sm} , um jeweils etwa 20 % signifikant an (Abb. 5, Abb. 7). Ergänzend zu den Beobachtungen, dass bei Absetzferkeln Calcitriol auf genomischem Wege den intestinalen Ca^{2+} - und P_i -Transport stimuliert (SCHRÖDER et al. 1994), konnten damit auch nicht-genomische Calcitriol-Effekte auf beide Transportvorgänge bei Absetzferkeln gezeigt werden. Auch in diesem Fall ist noch unklar, welche physiologische Funktion und welchen quantitativen Anteil an der Ca^{2+} - bzw. P_i -Gesamtabsorption dieser calcitriolinduzierte „Fast response“ besitzt.

Durch Verwendung von Colchicin bei calcitriolinduziertem „Fast response“ des Ca^{2+} - bzw. P_i -Transportes sollte geprüft werden, ob dieser Mechanismus die Unversehrtheit der Mikrotubuli voraussetzt. Es war schon vorher gezeigt worden, dass der Inhibitor auf die basalen Transportraten bei Epithelien von Absetzferkeln keinen Einfluss hatte (Tab. 3).

Bei den Saugferkeln führte Colchicin zwar zu einer Reduktion der J_{net} für Ca^{2+} um etwa 20 %, die bei gleich bleibenden J_{sm} auf einer Abnahme der unidirektionalen Fluxrate von mukosal nach serosal beruhte (Tab. 6). Da Calcitriol aber zuvor zu keiner Stimulation geführt hatte, decken sich diese Befunde mit dem vorher in Tab. 3 gezeigten Effekt von Colchicin auf den Ca^{2+} -Transport. Die P_i -Nettofluxraten der

Saugferkel blieben ebenfalls wie vorher und wie zu erwarten unverändert (siehe auch Abb. 8).

Bei den Absetzferkeln dagegen wurden die calcitriolstimulierten J_{ms} für Ca^{2+} und P_i durch Colchicin signifikant um jeweils etwa 20 % signifikant gehemmt (Tab. 6). Das Ausmaß der Inhibition entsprach weitestgehend der Höhe der vorausgegangenen Stimulation durch Calcitriol, was bedeutet, dass die schnellen nicht-genomischen Effekte des Calcitriols auf den Ca^{2+} - und P_i -Transport bei Absetzferkeln unter Beteiligung von Mikrotubulifunktionen vermittelt werden (siehe auch Abb. 8). Es bleibt zu klären, ob dieses auch die Beteiligung von Vesikeln beinhaltet (NEMERE und NORMAN 1988, NEMERE und NORMAN 1989).

Bemerkenswert ist, dass sich der calcitriolinduzierte „Fast response“ des P_i -Transportes bei Saugferkeln nicht mit Colchicin hemmen ließ. Dieses ist als weiterer Hinweis auf unterschiedliche transzelluläre Transportmechanismen für Ca^{2+} und P_i zu werten. Es wäre deshalb für zukünftige Untersuchungen interessant, zu prüfen, ob Latrunculin B den „Fast response“ inhibieren kann.

5.5 Beteiligung von Ca^{2+} -Kanälen am Ca^{2+} -Transport

Bislang ist unklar, durch welchen Mechanismus Ca^{2+} -Ionen aus dem Darmlumen in die Enterozyten gelangen. Als eine wichtige Möglichkeit wurden Ca^{2+} -Kanäle diskutiert und zumindest für Pansenepithelzellen von Schafen (WADHWA 1998) und Darmschleimhautzellen des Kabeljaus (LARSSON et al. 1998) zeigen indirekte Befunde mit dem L-Typ Ca^{2+} -Kanal-Agonisten BAY K8644 die Existenz solcher Kanäle an. In der vorliegenden Arbeit hatte BAY K8644 in einer Konzentration von $0,1-1,0 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ keinen nennenswerten Effekt auf die J_{ms} von Ca^{2+} im vorderen Dünndarm von Saug- und Absetzferkeln. Diese Befunde sprechen also gegen die Existenz spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ in der duodenalen Bürstensaummembran von Ferkeln. Dies steht in Übereinstimmung mit früheren Ca^{2+} -Fluxratenmessungen im Intestinum von Ratten, bei denen der Ca^{2+} -

Kanalblocker Verapamil erst ab einer pharmakologischen Konzentration von $5 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ zu einer signifikanten Hemmung der Ca^{2+} -Absorption führte (MILLER und BRONNER 1981). Inzwischen konnten intestinale Ca^{2+} -Kanäle des Dünndarms von Kaninchen und Ratten erstmals kloniert werden (HOENDEROP et al. 1999a,b, PENG et al. 1999). Die Auswertung dieser Befunde ergab neben einer ausgeprägten Speziesabhängigkeit eine Bestätigung der früheren Annahmen bezüglich großer funktioneller Unterschiede zu Ca^{2+} -Kanälen erregbarer Zellen.

5.6 Subzelluläre Kompartimentierung von Ca^{2+}

Aus Untersuchungen mit Hühner- und Rattendarm ergaben sich Hinweise darauf, dass sowohl das Zytoskelett als auch Lysosomen bzw. endozytierte Vesikel am Ablauf der Transcaltachia beteiligt sind (NEMERE und SZEGO 1981a,b, NEMERE und NORMAN 1987). Es wurde geprüft, ob ein solcher vesikulärer Ca^{2+} -Transport als Möglichkeit zur Erklärung der Vitamin D-unabhängigen aktiven Ca^{2+} -Absorption neugeborener Ferkel in Frage kommt.

Zu diesem Zweck wurden subzelluläre Fraktionierungen von homogenisierten, zuvor mit ^{45}Ca inkubierten jejunalen Epithelstücken von Saugferkeln, abgesetzten Kontrollferkeln und calcitrioldefizienten Kontrollferkeln durchgeführt.

Bei den Saugferkeln lagen die Proteinkonzentrationen im Gesamthomogenat um ca. 45 %, in P_1 um ca. 30 % und in S_2 um ca. 60 % unter den Proteinkonzentrationen der entsprechenden Fraktionen von AF Kon- und AF Def-Tieren (Tab. 8).

Möglicherweise hängt dies mit den unterschiedlichen Entwicklungsstadien des Darmes zusammen. Während der postnatalen Lebensphase unterliegen die Enterozyten des Schweinedarmes einem fein regulierten Reifungsprozess (KELLY 1994). So kommt es unter anderem zu einer Zellproliferation und zum Längenwachstum der Villi und damit zu einer Zunahme der Oberfläche (SMITH und JARVIS 1977, XU et al. 1992). Möglicherweise sind diese Prozesse dafür

verantwortlich, dass der Proteingehalt im Intestinum der Saugferkel geringer als bei älteren Tieren war.

Die Aktivitäten der alkalischen Phosphatase lagen bei den Saugferkeln in allen Fraktionen um das 3-4fache höher als bei den beiden Absetzferkelgruppen (Tab. 8). Es ist denkbar, dass hier ein Zusammenhang mit den gesteigerten resorptiven Vorgängen an der Bürstensaummembran in dieser Lebensphase besteht. Aufgrund eines erhöhten Energie- und Nährstoffbedarfes ist der intestinale Transport von Glucose und anderen Nährstoffen bei neugeborenen Ferkeln am höchsten und nimmt mit zunehmendem Alter ab (BUDDINGTON 1992).

Während die gemessenen Enzymaktivitäten bei allen drei Versuchstiergruppen in der S₂-Fraktion abgereichert waren, kam es zu den höchsten Anreicherungen in der P₂-Fraktion (Tab. 9). Eine Anreicherung der Aktivitäten der alkalischen Phosphatase wäre nach dem Zentrifugationsschema jedoch eher in der P₁-Fraktion zu erwarten gewesen, so dass eine Verunreinigung der P₂-Fraktion mit Bürstensaummembranen nicht ausgeschlossen werden kann. Die erwartete Anreicherung von Lysosomen und Basolateralmembranen in der P₂-Fraktion hat sich durch höchste Anreicherungen der sauren Phosphatase und der Na⁺/K⁺-ATPase in dieser Fraktion um das 2-4fache bei allen Versuchstiergruppen bestätigt (Tab. 9).

Aus vergleichbaren Untersuchungen bei Hühnern ging hervor, dass die ⁴⁵Ca-Aktivität größtenteils mit den Lysosomen assoziiert war (NEMERE et al. 1986). In Anlehnung an diese Arbeit wurde auch in der vorliegenden Untersuchung die P₂-Fraktion auf einem Saccharosegradienten aufgetrennt. Die spezifischen ⁴⁵Ca-Aktivitäten nahmen von der unteren zur oberen Fraktion kontinuierlich zu. Es lagen keine wesentlichen Unterschiede des ⁴⁵Ca-Verteilungsmusters in den Fraktionen zwischen den einzelnen Tiergruppen vor (Abb. 10). Es gab außerdem keine Hinweise auf die Assoziation der ⁴⁵Ca-Aktivität mit Lysosomen, so dass die Existenz vesikulärer Transportmechanismen bei Saug- und Absetzferkeln aufgrund dieser Ergebnisse fraglich erscheint.

Bei den Absetzferkeln mit Calcitriolmangel betrug die spezifische ⁴⁵Ca-Aktivität in allen Fraktionen nur etwa knapp die Hälfte verglichen mit den abgesetzten Kontrolltieren (Tab. 8). Dies war zu erwarten, da die aktive intestinale Ca²⁺-

Absorption bei abgesetzten Ferkeln und adulten Schweinen ein calcitriolabhängiger Prozess ist (FOX et al. 1985, SCHRÖDER et al. 1990, KAUNE et al. 1992, SCHRÖDER et al. 1993, SCHRÖDER et al. 1998a,b)

Unabhängig vom Alter kam es in allen 3 Gruppen zu einer Anreicherung der ^{45}Ca -Aktivitäten in der S_2 -Fraktion. Gegenüber der Ausgangsfraktion war diese bei Saugferkeln um das $2,8 \pm 0,2$ fache angereichert im Vergleich zu den abgesetzten Kontrolltieren, bei denen die Anreicherung $2,0 \pm 0,3$ betrug, so dass hier ein tendenzieller Unterschied vorlag ($p=0,08$). Bei Betrachtung der Anreicherungsfaktoren der gemessenen Enzymaktivitäten zeigte sich in der S_2 -Fraktion für jedes Enzym eine Abreicherung, unabhängig vom Alter und vom Calcitriolstatus der Tiere. Da nur die Aktivitäten der Leitenzyme für Bürstensaummembranen, Basolateralmembranen und Lysosomen gemessen wurden, die S_2 -Fraktion aber Microsomen und die zytosolische Komponente enthält, war eine Abreicherung der Enzyme sogar zu erwarten. Diese Befunde decken sich auch mit einer vergleichbaren Arbeit, die mit calcitrioldefizienten Hühnern und Kontrollhühnern durchgeführt wurde (NEMERE et al. 1986). Die dort beschriebenen Abreicherungsfaktoren in der S_2 -Fraktion entsprechen den in der vorliegenden Arbeit dargestellten Werten.

Aus den Befunden ergibt sich die Frage, warum bei den Saugferkeln die Anreicherung der spezifischen ^{45}Ca -Aktivität gegenüber den abgesetzten Kontrolltieren signifikant höher war, und ob sich die Aktivität eher im Zytosol oder in den Microsomen angereichert hatte. Ein weiterer Zentrifugationschritt an dieser Stelle, zur Auftrennung von Zytosol und Microsomen, würde möglicherweise Klarheit darüber verschaffen. Als Microsomen werden Fragmente des endoplasmatischen Reticulums bezeichnet, die bei der Zentrifugation von Zellhomogenaten künstlich entstehen (LEONHARDT 1990). Aufgrund von Untersuchungen am Rattendünndarm wurde die Rolle des endoplasmatischen Reticulums als Ca^{2+} -Puffer postuliert. Hier war die Ca^{2+} -Aufnahme in eine mit endoplasmatischem Reticulum angereicherte Membranfraktion ATP-abhängig und konnte bei hoher Ca^{2+} -Aufnahme mit der Nahrung auf bis zu 80 % gesteigert werden (RUBINOFF und NELLANS 1985). Studien zur Altersabhängigkeit der Aufnahmekinetik von Ca^{2+} in microsomale

Vesikel haben bei saugenden Ratten eine höhere Affinität und Aufnahmekapazität im Vergleich zu der wesentlich geringeren Aufnahmekapazität bei heranwachsenden Ratten gezeigt. Aus diesen Ergebnissen wurde die mögliche Bedeutung des endoplasmatischen Reticulums für die intestinale zytosolische Ca^{2+} -Homöostase abgeleitet (GHISHAN und ARAB 1988).

Ebenso lässt sich eine vermehrte Anreicherung von ^{45}Ca im Zytosol nicht ausschließen. Bei älteren Tieren mit physiologischen Calcitriolspiegeln im Plasma liegt nahe, dass das Kation mit Calbindin-D assoziiert ist, das sich in der S_2 -Fraktion angereichert haben könnte. Allerdings wurden auch bei neugeborenen Ferkeln vergleichbare Calbindin-D-Konzentrationen in der Dünndarmschleimhaut nachgewiesen (THIENENKAMP 1996) und trotzdem war die relative ^{45}Ca -Anreicherung in der S_2 -Fraktion höher. Daraus ist abzuleiten, dass sich in der S_2 -Fraktion bei neugeborenen Ferkeln mindestens eine zur S_2 -Fraktion abgesetzter Schweine unterschiedliche Komponente zur Ca^{2+} -Kompartimentierung befindet. Hierbei könnte es sich um Microsomen handeln.

6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, die Mechanismen der intestinalen Ca^{2+} -Absorption beim Saugferkel (SF) näher zu charakterisieren. Der P_i -Transport wurde in gleicher Weise untersucht, um Rückschlüsse auf die Spezifität der jeweiligen Effekte ziehen zu können. Parallel dazu durchgeführte Untersuchungen bei Absetzferkeln (AF) sollten altersbedingte Unterschiede aufzeigen.

Inwiefern an diesen Transportprozessen Elemente des Zytoskeletts und Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ beteiligt sind, wurde mit Hilfe von Inhibitoren der Aktinfilamente (Cytochalasin D, Latrunculin B) und der Mikrotubuli (Colchicin) sowie unter Verwendung eines Ca^{2+} -Kanal-Agonisten (BAY K8644) untersucht. Außerdem wurde mit Calcitriol die Möglichkeit eines „Fast response“ auf die Ca^{2+} - und P_i -Fluxraten sowie mit Colchicin die Bedeutung von Mikrotubuli für diese schnellen Calcitriol-Effekte untersucht. Die Versuche wurden in vitro mit der Ussing-Kammer-Technik, unter Ausschluss elektrochemischer Gradienten, an isolierten, intakten Dünndarmepithelien durchgeführt.

Hinsichtlich der Diskussion über den Transcaltachia-Mechanismus und einen vesikulären Ca^{2+} -Transport wurde außerdem die Beteiligung von Lysosomen bzw. Vesikeln am intestinalen Ca^{2+} -Transport bei Saugferkeln im Vergleich zu Absetzferkeln mit physiologischen Calcitriolplasmaspiegeln und calcitrioldefizienten Absetzferkeln untersucht. Diese Untersuchungen wurden mit Hilfe einer subzellulären Fraktionierung von Homogenaten des vorderen Dünndarms durchgeführt.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

1. Cytochalasin D führte bei Saugferkeln zu einer signifikanten Hemmung der Ca^{2+} -Nettofluxraten um etwa 53 % und zu einer Hemmung der P_i -Nettofluxraten in ähnlicher Größenordnung, wobei dieser Effekt aufgrund hoher individueller Streuungen statistisch nicht gesichert werden konnte.

Diese Ergebnisse zeigen eine Beteiligung von Aktinfilamenten am duodenalen Ca^{2+} -Transport bei Saugferkeln. Hinweise dafür sind auch für den P_i -Transport gegeben, aufgrund der vorliegenden Daten ist jedoch keine statistisch gesicherte Aussage darüber möglich.

2. Latrunculin B führte bei Saugferkeln zu einer signifikanten Hemmung der duodenalen Ca^{2+} - und P_i -Nettofluxraten um jeweils ca. 45 %. Bei den Absetzferkeln wurden diese Transportraten durch Latrunculin B nicht signifikant gehemmt. Diese Ergebnisse zeigen eine Beteiligung von Aktinfilamenten am intestinalen Ca^{2+} - und P_i -Transport für Saugferkel, während dies für Absetzferkel nicht gezeigt werden konnte.

3. Colchicin führte bei Saugferkeln zu einer Hemmung der J_{net} für Ca^{2+} um ca. 23 %, während die J_{net} für P_i durch das Agens nicht nennenswert beeinflusst wurden. Außerdem hatte Colchicin bei Absetzferkeln keine maßgeblichen Auswirkungen auf die J_{net} für Ca^{2+} und P_i . Diese Ergebnisse zeigen, dass Mikrotubuli am duodenalen Ca^{2+} -Transport bei Saugferkeln beteiligt sind. Für den P_i -Transport existieren schon in dieser Lebensphase differente Transportmechanismen im Zytosol.

4. Calcitriol führte bei Saugferkeln innerhalb von 10-40 min zu einer Stimulation der duodenalen J_{net} für P_i um ca. 22 %, hatte aber keinen nennenswerten Einfluss auf die J_{net} für Ca^{2+} . Bei Absetzferkeln wurden beide Transportraten innerhalb von 10-40 min nach Calcitriolzugabe um jeweils ca. 20 % gesteigert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei Saugferkeln nicht-genomische Effekte von Calcitriol auf den P_i -Transport, nicht aber auf den Ca^{2+} -Transport existieren. Bei den Absetzferkeln konnten mit Calcitriol schnelle Effekte auf den Transport beider Ionenarten erzielt werden.

5. Colchicin führte bei Saugferkeln zu keiner Hemmung der zuvor mit Calcitriol stimulierten J_{net} für P_i . Bei Absetzferkeln wurde die calcitriolinduzierte Stimulation der Ca^{2+} - und P_i -Nettofluxraten durch Colchicin um etwa 20% gehemmt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass für die schnellen Calcitriol-Effekte auf den P_i -

Transport bei Saugferkeln keine intakten Mikrotubuli vorausgesetzt werden. Dahingegen scheinen intakte Mikrotubuli für die schnellen Effekte von Calcitriol auf den Ca^{2+} - und P_i -Transport bei Absetzferkeln zumindest für einen Teil des Transportes unentbehrlich zu sein.

6. BAY K8644 hatte in den beiden angewendeten Konzentrationen ($0,1$ und $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, mukosal) bei Saug- und Absetzferkeln keinen Einfluss auf die Ca^{2+} - und P_i -Transporte. Diese Befunde sprechen gegen die Existenz spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ in der duodenalen Bürstensaummembran von Saug- und Absetzferkeln.

7. Die subzelluläre Fraktionierung ergab die höchsten Anreicherungen der spezifischen ^{45}Ca -Aktivitäten in der microsomalen und zytosolischen Fraktion bei den Saugferkeln (ca. 3fach), gegenüber den AF Kon- und AF Def-Tieren (ca. 2fach). Die Aktivitäten der alkalischen und sauren Phosphatase und der Na^+/K^+ -ATPase waren unabhängig vom Alter und vom Calcitriolstatus in der lysosomalen Fraktion am stärksten angereichert. Nach der Auftrennung dieser Fraktion über einem Saccharosegradienten ergab sich für alle 3 Versuchsgruppen ein ähnliches Verteilungsmuster der spezifischen ^{45}Ca -Aktivitäten im Gradienten.

Diese Befunde haben nicht gezeigt, dass Ca^{2+} beim Saugferkel mit Lysosomen im Zuge eines vesikulären Transportes assoziiert sein könnte. Es liegen jedoch bei Saugferkeln Hinweise auf eine mögliche Assoziation von Ca^{2+} mit Microsomen oder anderen zytosolischen Komponenten zur Ca^{2+} -Kompartimentierung vor. Auch bei den Absetzferkeln konnten unabhängig vom Calcitriolstatus keine Hinweise auf einen vesikulären Ca^{2+} -Transport erbracht werden.

Die Ergebnisse weisen eindeutig auf eine Beteiligung des Zytoskeletts am neonatalen Ca^{2+} -Transport hin, die im Laufe der Entwicklung abnimmt. Außerdem wurde die Bedeutung des Zytoskeletts für schnelle nicht-genomische Calcitriol-Effekte deutlich. Das Vorliegen vesikulärer Transportmechanismen für Ca^{2+} , wie sie bei anderen Tierarten gezeigt wurden, kann durch die vorliegenden Ergebnisse nicht

bestätigt werden. Calcitriol hatte nur bei Absetzferkeln einen akuten Effekt auf den intestinalen Ca^{2+} -Transport. Dieser Befund unterstützt die Annahme eines calcitriolunabhängigen Ca^{2+} -Transportes bei Saugferkeln.

7 Summary

Ulrike Nurnus

Studies on function and mechanisms of Ca²⁺ transport in small intestines of suckling piglets

The aim of the present in vitro studies was to further characterize the mechanisms of intestinal Ca²⁺ absorption in suckling piglets. Simultaneously, P_i transport was examined to get some information about specificity of the effects on Ca²⁺ transport. Further investigations with weaned piglets were performed to show age related differences. The actin filament inhibitors cytochalasin D and latrunculin B and the microtubule antagonist colchicine as well as an agonist of I-type Ca²⁺ channels BAY K8644 were used to elucidate the role of cytoskeletal elements and Ca²⁺ channels for these transport mechanisms. Moreover, acute application of calcitriol should test for the presence of fast response mechanisms of Ca²⁺ transport in the small intestines of neonatal and weaned piglets.

Flux rate measurements were performed in Ussing chambers in the absence of electrochemical gradients using isolated intact epithelia of the duodenum and proximal jejunum.

With respect to the discussion about the transcaltachia mechanism which includes vesicular Ca²⁺ transport, the role of lysosomes and vesicles for intestinal Ca²⁺ transport was studied in suckling and weaned piglets. For this purpose also weaned piglets with unphysiologically low calcitriol plasma levels could be used to prepare subcellular fractionations from the proximal small intestine incubated with ⁴⁵Ca.

Following main results were obtained:

1. Application of cytochalasin D to the small intestinal tissues resulted in a significant inhibition of Ca²⁺ net flux rates by about 53 % in suckling piglets. Similar results could be obtained for P_i net flux rates, but this effect was not significant. From the results it can be concluded that duodenal Ca²⁺ transport in suckling piglets depends on the

presence of functioning actin filaments. A possible role of actin filaments for P_i transport is indicated but the results do not provide sufficient information for it.

2. Latrunculin B inhibited duodenal J_{net} of Ca^{2+} and P_i significantly by about 45 % in suckling piglets. In weaned piglets the flux rates were not significantly affected. These results indicate that intestinal transport of Ca^{2+} and P_i in suckling piglets requires intact actin filaments but, in contrast, does not in weaned piglets.

3. Colchicine caused an inhibition of J_{net} of Ca^{2+} by about 23 % in suckling piglets, whereas J_{net} of P_i were nearly unaffected. In weaned piglets, colchicine did not alter both J_{net} of Ca^{2+} and P_i . These results indicate that duodenal Ca^{2+} transport in suckling piglets requires intact microtubules. Different cytosolic transport mechanisms for P_i seem already to be present during this period of life.

4. Calcitriol stimulated J_{net} of P_i in suckling piglets after 10-40 min by about 22 % but J_{net} of Ca^{2+} were not significantly influenced. In weaned piglets J_{net} of Ca^{2+} and P_i were stimulated by about 20 %. These results indicate the presence of non-genomic effects of calcitriol on P_i transport but not on Ca^{2+} transport in suckling piglets. In weaned piglets rapid effects of calcitriol on transport of Ca^{2+} and P_i could be provoked by calcitriol.

5. Colchicine had no effect on calcitriol-induced stimulation of J_{net} of P_i in suckling piglets. In weaned piglets colchicine decreased calcitriol-stimulated J_{net} of Ca^{2+} and P_i by about 20 %. These findings indicate that rapid effects of calcitriol on transport of P_i in suckling piglets do not require intact microtubules. But in weaned piglets intact microtubules seem to be, at least partly, essential for rapid effects of calcitriol on Ca^{2+} and P_i transport.

6 Application of 0,1 or 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ BAY K8644 to the mucosal compartment had no effect on Ca^{2+} transport in suckling and weaned piglets. Based on these observations

the contribution of voltage-gated L-type Ca^{2+} channels to transepithelial Ca^{2+} transport in porcine duodenum can not be supported.

7. Subcellular fractionation demonstrated highest enrichments of ^{45}Ca -specific activities in the microsomal/cytosolic fraction which was about 3-fold in suckling piglets and 2-fold in control and calcitriol-deficient weaned piglets. In all groups highest enrichments of enzyme activities of alkaline phosphatase, acid phosphatase and Na^+/K^+ -ATPase were found in the lysosomal fraction. Further separating of this fraction on a sucrose density gradient revealed a similar subdistribution of ^{45}Ca -specific activities in all groups.

Ca^{2+} was not found to be associated with lysosomes and therefore vesicular Ca^{2+} transport in suckling piglets could not be demonstrated. However, the findings reflect that Ca^{2+} could be associated with microsomes or other cytosolic Ca^{2+} -binding components in this period of life. There was no indication for vesicular Ca^{2+} transport in weaned control and calcitriol-deficient piglets.

The results clearly demonstrate a significant role of the cytoskeleton for neonatal Ca^{2+} transport which is changing during development. In addition, the importance of the cytoskeleton to fast non-genomic effects of calcitriol was demonstrated. Vesicular mechanisms for Ca^{2+} transport, as shown for other species, could not be confirmed by the present results.

Intestinal Ca^{2+} absorption was affected rapidly by calcitriol only in weaned piglets. These findings support the hypothesis that Ca^{2+} transport in suckling piglets is a calcitriol-independent process.

8 Literaturverzeichnis

ANDERSCH, M. A. und A. J. SZCZYPINSKI (1947):

Use of p-nitrophenol phosphate substrate in determination of serum acid phosphatase.

Am. J. Clin. Pathol. 17, 571

ARMBRECHT, H. J. (1990):

Effect of age on calcium and phosphate absorption.

Miner. Electrol. Metab. 16, 159-166

BARAN, D. T., A. M. SORENSEN, T. W. HONEYMAN, R. RAY und M. F. HOLICK (1989):

Rapid actions of $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ and calcium and phospholipids in isolated rat liver nuclei.

FEBS Lett. 259, 205-208

BARAN, D. T., A. M. SORENSEN, V. SHALHOUB, T. OWEN, A. OBERDORF, G. STEIN und J. LIAN (1991):

$1,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ rapidly increases cytosolic calcium in clonal rat osteosarcoma cells lacking the vitamin D receptor.

J. Bone Miner. Res. 6, 1269-1275

BARRIT, G. J. (1981):

Evidence for two compartments of exchangeable calcium in isolated rat liver mitochondria obtained using a ⁴⁵Ca exchange technique in the presence of magnesium, phosphate, and ATPase at 37 degrees C.

J. Membr. Biol. 62, 53-63

BIKLE, D. D. und S. MUNSON (1985):

$1,25$ -Dihydroxyvitamin D increases calmodulin binding to specific proteins in the chick duodenal brush border membrane.

J. Clin. Invest. 76, 2312-2316

BIKLE, D. D., E. A. GEE und S. MUNSON (1986):

Effect of ethanol on intestinal calcium-transport in chicks.

Gastroenterology 91, 870-876

BIKLE, D. D., S. MUNSON und M. L. MANCIANTI (1991):

Limited tissue distribution of the intestinal brush border myosin I protein.

Gastroenterology 100, 395-402

BINDELS, R. J. M., A. HARTOG, J. TIMMERMANN und C. H. VAN OS (1991):
Active Ca²⁺ transport in primary cultures of rabbit kidney CCD: stimulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and PTH.
Am. J. Physiol. 261, F799-F807

BLIND, E., F. RAUE, T. MEINEL, M. PECHERSTORFER, U. RÄTH, H. SCHMIDT-GAYK, B. KOHL und R. ZIEGLER (1993):
Diagnostische Bedeutung von Parathormone-related-Protein bei Tumorpatienten mit Hypercalcämie.
Dtsch. Med. Wschr. 118, 330-335

BRADFORD, M. (1976):
A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding.
Anal. Biochem. 72, 248-254

BRASITUS, T. A., P. K. DUDEJA, B. EBY und K. LAU (1986):
Correction by 1,25-dihydroxycholecalciferol of the abnormal fluidity and lipid composition of enterocyte brush border membranes in vitamin-D-deprived rats.
J. Biol. Chem. 261, 16404-16409

BRONNER, F. (1988):
Vitamin D-dependent active calcium transport: The role of CaBP.
Calcif. Tissue Int. 43, 133-137

BRONNER, F. (1992):
Current concepts of calcium absorption: An overview.
J. Nutr. 122, 641-643

BRONNER, F. (1997):
In: O`Dell, B. L. and R. A. Sunde (Hrsg.):
Handbook of nutritionally essential mineral elements.
Marcel Dekker, Inc., New York, 13-66

BRONNER, F., D. PANSU und W. D. STEIN (1986):
An analysis of intestinal calcium transport across the rat intestine.
Am. J. Physiol. 250, G561-G569

BUDDINGTON, R. K. (1992):
Intestinal nutrient transport during ontogeny of vertebrates.
Am. J. Physiol. 263, R503-R509

BURNS, R. G. (1992):
Analysis of the colchicine-binding site of β -tubulin.
FEBS Lett. 297, 205-208

- CAFFREY, J. M. und M. C. FARACH-CARSON (1989):
Vitamin D₃ metabolites modulate dihydropyridin-sensitive calcium currents in clonal rat osteosarcoma cells.
J. Biol. Chem. 264, 20265-20274
- CARAFOLI, E. (1987):
Intracellular calcium homeostasis.
Annu. Rev. Biochem. 56, 395-433
- CARE, A. D., S. K. ABBAS, D. W. PICKARD, M. BARRI, M. DRINKHILL, J. B. C. FINDLAY, I. R. WHITE und I. W. CAPLE (1990):
Stimulation of ovine placental transport of calcium and magnesium by mid-molecule fragments of human parathyroid hormone-related protein.
Exp. Physiol. 75, 605-608
- COETZER, H., N. CLAASSEN, D. H. VAN POPENDORF und M. C. KRUGER (1994):
Calcium transport by isolated brush border and basolateral membrane vesicles: role of essential fatty acid supplementation.
Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids 50, 257-266
- COUÉ, M., S. L. BRENNER, I. SPECTOR und E. D. KORN (1987):
Inhibition of actin polymerization by latrunculin A.
FEBS Lett. 213, 316-318
- DAHL, M. R. (1999):
Die postnatale Entwicklung der duodenalen Calcium- und Phosphatabsorption beim Ferkel.
Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen
- DE BOLAND, A. R. und A. W. NORMAN (1990a):
Evidence for involvement of proteinkinase C and cyclic inosine 3', 5' monophosphate-dependent protein kinase in the 1,25-dihydroxyvitamin D₃-mediated rapid stimulation of intestinal calcium transport (transcaltachia).
Endocrinology 127, 39-45
- DE BOLAND, A. R. und NORMAN, A. W. (1990b):
Influx of extracellular calcium mediates 1,25-dihydroxyvitamin D₃-dependent transcaltachia (the rapid stimulation of duodenal Ca²⁺ transport).
Endocrinology 127, 2475-2480
- DE BOLAND, A. R. und R. L. BOLAND (1993):
1,25-Dihydroxyvitamin D₃ induces arachidonate mobilization in embryonic chick myoblasts.
Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res. 1179, 98-104

FAVUS, M. J. (1985):

Factors that influence absorption and secretion of calcium in the small intestine and colon.

Am. J. Physiol. 248, G147-G157

FAVUS, M. J. und E. ANGEID-BACKMAN (1984):

Effects of lactose on calcium absorption and secretion by rat ileum.

Am. J. Physiol. 246, G281-G285

FAVUS, M. J. und E. ANGEID-BACKMAN (1985):

Effects of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and calcium channel blockers on cecal calcium transport in the rat.

Am. J. Physiol. 248, G676-G681

FAVUS, M. J. und V. TEMBE (1992):

The use of pharmacologic agents to study mechanisms of intestinal calcium transport.

J. Nutr. 122, 683-686

FIELD, M., M. W. MUSCH und J. S. STOFF (1981):

Role of prostaglandins in the regulation of intestinal electrolyte transport.

Prostaglandins 21 (Suppl.), 73

FONTAINE, O., T. MATSUMOTO, D. B. P. GOODMAN und H. RASMUSSEN (1981):

Liponomic control of Ca^{2+} transport: relationship to mechanism of action of $1,25$ -dihydroxyvitamin D_3 .

Proc. Natl. Acad. Sci. 78, 1751-1754

FOX, J. E., E. M. MAUNDER, V. A. RANDALL und A. D. CARE (1985):

Vitamin D-dependent rickets type I in pigs.

Clin. Sci. 69, 541-548

FULLMER, C. S. (1992):

Intestinal calcium absorption: calcium entry.

J. Nutr. 122: 644-650

FULLMER, C. S., S. EDELSTEIN und R. H. WASSERMAN (1985):

Lead-binding properties of intestinal calcium-binding proteins.

J. Biol. Chem. 260, 6816-6819

GHIJSEN, W. E. J. M., M. D. DE JONG und C. H. VAN OS (1983):

Kinetic properties of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange in basolateral plasma membranes of rat small intestine.

Biochim. Biophys. Acta 730, 85-94

- GHIJSEN, W. E. J. M., M. D. DE JONG und C. H. VAN OS (1986):
Regulation of duodenal Ca²⁺-pump by calmodulin and vitamin D-dependent Ca²⁺-binding protein.
Am. J. Physiol. 251, G223-G229
- GHISHAN, F. K. (1992):
Phosphate transport by plasma membranes of enterocytes during development: role of 1,25-dihydroxycholecalciferol.
Am. J. Clin. Nutr. 55, 873-877
- GHISHAN, F. K. und N. ARAB (1988):
Active calcium transport by intestinal endoplasmatic reticulum maturation.
Am. J. Physiol. 254, G74-G80
- GHISHAN, F. K., N. ARAB und W. NYLANDER (1989):
Characterization of calcium uptake by brush border membrane vesicles of human small intestine.
Gastroenterology 96, 122-129
- GOEDHART, J. R. und J. G. BINDELS (1994):
Composition of human milk.
Nutr. Res. Rev. 7, 1-24
- GOODMAN, D. B., M. R. HAUSSLER und H. RASMUSSEN (1972):
Vitamin D₃ induced alteration of microvillar membrane lipid composition.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 46, 80-86
- HALLORAN, B. P. und H. F. DE LUCA (1980):
Calcium transport in small intestine during early development: role of vitamin D.
Am. J. Physiol. 239, G473-G479
- HARMEYER, J. und R. KAUNE (1988):
Wie steuert Vitamin D-Hormon die intrazelluläre Calcium-Homöostase?
Biologie in unserer Zeit 18, 110-115
- HARMEYER, J. und R. KAUNE (1990):
Two unique animal models for the study of human metabolic bone diseases.
In: Pliska, V., G. Stranzinger (Hrsg.): Farm animals in biomedical research. Advances in Animal Breeding and Genetics, Paul Parey, Hamburg, Berlin, Bd. 5, 111-130
- HARMEYER, J., C. VON GRABE und I. WINKLER (1982):
Pseudovitamin D-deficiency rickets in pigs. An animal model for the study of familial vitamin D-dependency.
Exp. Biol. Med. 7, 117-125

HENRY, H. L. und A. W. NORMAN (1984):
Vitamin D: Metabolism and biological action.
Annu. Rev. Nutr. 4, 493-520

HENRY, H. L. und A. W. NORMAN (1991):
Metabolism of vitamin D.
In: Coe F. L., M. J. Favus (Hrsg.): Disorders of Bone and Mineral Metabolism
Raven, New York, 149-162

HOENDEROP, J. G. J., A. W. C. M. VAN DER KEMP, A. HARTOG, S. F. J. VAN DE
GRAAF, C. H. VAN OS, P. H. G. M. WILLEMS und R. J. M. BINDELS (1999a):
Molecular identification of the apical Ca²⁺ Channel in 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-
responsive epithelia.
J. Biol. Chem. 274, 8375-8378

HOENDEROP, J. G. J., A. W. C. M. VAN DER KEMP, A. HARTOG, C. H. VAN OS,
P. H. G. M. WILLEMS und R. J. M. BINDELS (1999b):
The epithelial calcium channel, ECaC, is activated by hyperpolarisation and
regulated by cytosolic calcium.
Biochem. Biophys. Res. Com. 261, 488-492

HOMAIDAN, F. R., M. DONOWITZ, G. A. WEILAND und G. W. G. SHARP (1989):
Two calcium channels in basolateral membranes of rabbit ileal epithelial cells.
Am. J. Physiol. 257, G86-G93

JOHNSON, J. A. und R. KUMAR (1994):
Renal and intestinal calcium transport: roles of vitamin D and vitamin D-dependent
calcium binding proteins.
Sem. Nephrol. 14, 119-128

KARBACH, U. (1992):
Paracellular calcium transport across the small intestine.
J. Nutr. 122, 672-677

KAUNE, R. (1992):
Die Regulation des intestinalen Calciumtransportes durch Calcitriol.
Habilitationsschrift, Tierärztliche Hochschule Hannover

KAUNE, R., B. SCHRÖDER und J. HARMeyer (1990a):
Binding properties of plasma vitamin D- binding protein and intestinal 1,25-
dihydroxyvitamin D₃ receptor in piglets with pseudo-vitamin D- deficiency rickets,
type I: treatment effects with pharmacological doses of vitamin D₃.
Arch. Biochem. Biophys. 282, 326-332

KAUNE, R., L. A. VAN DEN BROEK, E. J. VAN CORVEN, W. J. DE GRIP und C. H. VAN OS (1990b):

The intracellular compartment in transcellular Ca^{2+} -transport: effects of vitamin D deficiency.

In: Peterlik, M., Bronner, F. (Hrsg.): Molecular and Cellular Regulation of Calcium and Phosphate Metabolism. Alan R. Liss. Inc., New York, 143-162

KAUNE, R., I. KASSIANOFF, B. SCHRÖDER und 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.

Biochim. Biophys. Acta. 1109, 187-194

KAUNE, R., S. MUNSON und D. D. BIKLE (1994):

Regulation of calmodulin binding to the ATP extractable 110 kDa protein (myosin I) from chicken duodenal brush border by 1,25-(OH) $_2$ D $_3$.

Biochim. Biophys. Acta 1190, 329-336

KELLY, D. (1994):

Colostrum, growth factors and intestinal development in pigs.

In: Proceedings of the VIth International Symposium on Digestive Physiology in Pigs; EAAP Publication 80, 151-166

KIRCHGESSNER, M. (1992):

Tierernährung.

8. Auflage, DLG-Verlag, Frankfurt (Main), 133-150

KLEIN, C. (1999):

Einfluß von PTHrP (Parathyroid Hormone-related Peptide) in der Milch auf den intestinalen Calciumtransport bei Saugferkeln.

Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover

KOLB, E. (1989):

Lehrbuch der Physiologie der Haustiere.

Gustav Fischer, Stuttgart, New York

KOVARIK, J. (1983):

Zur Physiologie von Parathormon und Kalzitonin.

Pädiatrie und Pädologie 18, 161-169

KOWARSKI, S. und D. SCHACHTER (1980):

Intestinal membrane calcium-binding protein: vitamin D-dependent membrane component of the intestinal calcium transport mechanism.

J. Biol. Chem. 255, 10834-10840

- LACHENMAIER-CURRELL, U. und J. HARMMEYER (1988):
Intestinal absorption of calcium in newborn piglets. Role of vitamin D.
Biol. Neonate. 53, 327-335
- LARSSON, D., T. LUNDGREN und K. SUNDELL (1998):
Ca²⁺ uptake through voltage-gated L-type Ca²⁺ channels by polarized enterocytes
from Atlantic cod *Gadus morhua*.
J. Membr. Biol. 164, 229-37
- LEONHARDT, H. (1990):
Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen.
8. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 40
- MAC ISAAC, R. J., J. A. HEATH, C. P. RODDA, J. M. MOSELEY, A. D. CARE, T. J.
MARTIN und I. W. CAPLE (1991):
Role of the fetal parathyroid glands and parathyroid hormone-related protein in the
regulation of placental transport of calcium, magnesium and inorganic phosphate.
Reprod. Fertil. Dev. 3, 447-457
- MADSEN, K. L., M. M. TAVERNINI, C. YACHIMEC, D. L. MENDRICK, J. ALFONSO,
M. BUERGIN, H. S. OLSEN, M. J. ANTONACCIO, A. B. THOMSON und R. N.
FEDORAK (1998):
Stanniocalcin: a novel protein regulating calcium und phosphate transport across
mammalian intestine.
Am. J. Physiol. 274, G96-102
- MANDLA, S., A. BONEH und H.S. TENENHOUSE (1990):
Evidence for protein kinase C involvement in the regulation of renal 25-
hydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase.
Endocrinology 127, 2639-2647
- MATSUDA, K., C. OGURO, Y. SASAYAMA und S. KIKUYAMA (1991):
Involvement of prolactin in the regulation of plasma calcium levels in the newt,
Cynops pyrrhogaster.
Gen. Comp. Endocrinol. 81, 442-446
- MATSUMOTO, T., O. FONTAINE und H. RASMUSSEN (1981):
Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on phospholipid metabolism in chick duodenal
mucosal cell.
J. Biol. Chem. 256, 3554-3360
- MAX, E. E., D. B. P. GOODMAN und H. RASMUSSEN (1978):
Purification and characterization of chick intestine brush border membrane.
Biochem. Biophys. Acta 511, 224-239

MEYER, H und J. KAMPHUES (1990):

Grundlagen der Ernährung von Neugeborenen.

In: Walser, K. und H. Bostedt (Hrsg.): Neugeborenen- und Säuglingskunde der Tiere
Enke Verlag, Stuttgart, 55-71

MILLER, A., III und F. BRONNER (1981):

Calcium uptake in isolated brush-border vesicles from rat small intestine.

Biochem. J. 196, 391-401

MIRCHEFF, A. K. und E. M. WRIGHT (1976):

Analytical isolation of plasma membranes of intestinal epithelial cells: identification of Na⁺-K⁺-ATPase rich membranes and the distribution of enzyme activities.

Membr. Biol. 28, 309-333

MOOSEKER, M. S. (1985):

Organization, chemistry and assembly of the cytoskeletal apparatus of the intestinal brush border.

Annu. Rev. Cell. Biol. 1, 261-293

MOOSEKER, M. S., E. M. BONDER, D. J. CONZELMAN, D. J. FISHKIND, C. L. HOWE und T. C. S. KELLER III (1984):

The cytoskeletal apparatus of the intestinal brush border.

In: M. Donowitz, G. W. G. Sharp (Hrsg.): Mechanisms of Intestinal Electrolyte Transport and Regulation by Calcium; Alan Liss, New York, 287-307

MORIUCHI, S., T. YAMMAMOUCI und N. HASOYA (1975):

Demonstration of two different vitamin D-dependent calcium-binding proteins in rat intestinal mucosa.

J. Nutr. Sci. Vitaminol. 21, 251-259

NASSAR, C. F., E. W. KHAIRALLAH, M. G. NASSER und Z. M. HABBAL (1988):

Cytoskeletal control of calcium absorption across the rat small intestine.

Comp. Biochem. Physiol. 89A, 197-201

NELLANS, H. N. (1988):

Contributions of cellular and paracellular pathways to transepithelial intestinal calcium transport.

Prog. Clin. Biol. Res. 252, 269-276

NELLANS, H. N. (1990):

Intestinal calcium absorption. Interplay of paracellular and cellular pathway.

Miner. Electrol. Metab. 16, 101-108

NEMERE, I. und C. M. SZEGO (1981a):

Early actions of parathyroid hormone and 1,25-dihydroxycholecalciferol on isolated epithelial cells from rat intestine: I. Limited lysosomal enzyme release and calcium uptake.

Endocrinology 108, 1450-1462

NEMERE, I. und C. M. SZEGO (1981b):

Early actions of parathyroid hormone and 1,25-dihydroxycholecalciferol on isolated epithelial cells from rat intestine: II. Analyses of additivity, contribution of calcium, and modulatory influence of indomethacin.

Endocrinology 109, 2180-2187

NEMERE, I. und A. W. NORMAN (1987):

The rapid, hormonally stimulated transport of calcium (transcaltachia).

J. Bone Miner. Res. 2, 167-169

NEMERE, I. und A. W. NORMAN (1988):

1,25-dihydroxyvitamin D₃-mediated vesicular transport of calcium in intestine: Time course-studies.

Endocrinology 112, 2962-2969

NEMERE, I. und A. W. NORMAN (1989):

1,25-Dihydroxyvitamin D₃-mediated vesicular transport of calcium in intestine: Dose-response studies.

Mol. Cell. Endocrinol. 67, 47-53

NEMERE, I. und A. W. NORMAN (1990):

Transcaltachia, vesicular calcium transport, and microtubule-associated calbindin-D_{28K}: emerging views of 1,25-dihydroxyvitamin D₃-mediated intestinal calcium absorption.

Miner. Electrolyte Metab. 16, 109-114

NEMERE, I. und A. W. NORMAN (1991):

Transport of calcium.

In: S. G. Schultz (Hrsg.): Handbook of Physiology, section 6, The Gastrointestinal System, Bd. IV, Intestinal Absorption and Secretion, Am. Physiological Society, Bethesda, MD, USA, 337-360

NEMERE, I., Y. YOSHIMOTO und A. W. NORMAN (1984):

Calcium transport in perfused duodena from normal chicks: enhancement within fourteen minutes of exposure to 1,25-dihydroxyvitamin D₃.

Endocrinology 115, 1476-1483

- NEMERE, I., V. L. LEATHERS und A. W. NORMAN (1986):
1,25-Dihydroxyvitamin D₃-mediated intestinal calcium transport. Biochemical identification of lysosomes containing calcium and calcium-binding protein (calbindin-D_{28k}).
J. Biol. Chem. 261, 16106-16114
- NEMERE, I., G. THEOFAN und A. W. NORMAN (1987):
1,25 dihydroxyvitamin D₃ regulates tubulin expression in chick intestine.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 148, 1270-1276
- NEMERE, I., C. FELD und A. W. NORMAN (1991):
1,25-dihydroxyvitamin D₃ mediated alterations in microtubule proteins isolated from chick intestinal epithelium: analyses by isoelectric focusing.
J. Cell Biochem. 47, 369-379
- NEMERE, I., L. A. OPPERMAN, F. P. ROSS und A. W. NORMAN (1992)
Noncytoplasmic and filamentous appearance of calbindin-D_{28k} and tubulin in double, indirect immunofluorescent staining of embryonic chick tissue.
Mol. Cell. Endocrinol. 86, 83-91
- NEMERE, I., M. C. DORMANEN, M. W. HAMMOND, W. H. OKAMURA und A. W. NORMAN (1994):
Identification of a specific binding protein for 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ in basal-lateral membranes of chick intestinal epithelium and relationship to transcaltachia.
J. Biol. Chem. 269, 23750-23756
- NEMERE, I., Z. SCHWARTZ, H. PEDROZO, V. L. SYLVIA, D. D. DEAN und B. D. BOYAN (1998):
Identification of a membrane receptor for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ which mediates rapid activation of protein kinase C.
J. Bone Miner. Res. 13, 1353-1359
- NORMAN, A. W. (1979):
Vitamin D metabolism and calcium absorption.
Am. J. Med. 67, 989-998
- NORMAN, A. W. (1997):
In: Feldman, D., H. Francis, J. Glorieux und W. Pike (Hrsg.): Vitamin D.
Academic press, USA
- NORMAN, A. W. und F. P. ROSS (1979):
Vitamin D seco-steroids: unique molecules with both hormone and possible membranophilic properties.
Life Sci. 2, 759-770

NORMAN, A. W., J. ROTH und L. ORCI (1982):

The vitamin D endocrine system: steroid metabolism, hormone receptors and biological response (calcium-binding-proteins).

Endocrinol. Rev. 3, 331-366

NORMAN, A. W., X. SONG, L. ZANELLO, C. BULA und W. H. OKAMURA (1998):

Rapid and genomic responses are mediated by different shapes of the agonist steroid hormone, $1\alpha,25(\text{OH})_2$ vitamin D₃.

In: Steroids 64, 120-128

O'DOHERTY, P. J. A. (1978):

$1,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ increases the activity of intestinal phosphatidylcholine deacylation-reacylation cycle.

Lipid 14, 75-77

PAHUJA, D. N. und H. F. DE LUCA (1981):

Stimulation of intestinal calcium transport and bone calcium mobilization by prolactin in vitamin D-deficient rats.

Science 214, 1038-1039

PANSU, D., C. BELLATON und F. BRONNER (1983a):

Developmental changes in the mechanisms of duodenal calcium transport in the rat.

Am. J. Physiol. 244, G20-G26

PANSU, D., C. BELLATON, C. ROCHE und F. BRONNER (1983b):

Duodenal and ileal calcium absorption in the rat and effects of vitamin D.

Am. J. Physiol. 244, G695-G700

PANSU, D., C. BELLATON, C. ROCHE und F. BRONNER (1989):

Theophylline inhibits transcellular Ca transport in intestine and Ca-binding by CaBP.

Am. J. Physiol. 257 (Gastrointest. Liver Physiol. 20): G935-G943

PENG, J.-B., X.-Z. CHEN, U. V. BERGER, P. M. VASSILEV, H. TSUKAGUCHI, E. M. BROWN und M. A. HEDIGER (1999):

Molecular cloning and characterization of a channel-like transporter mediating intestinal calcium absorption.

J. Biol. Chem. 274, 22739-22746

PHILBRICK, W. M., J. J. WYSOLMERSKI, S. GALBRAITH, E. HOLT, J. J. ORLOFF, K. H. YANG, R. C. VASAVADA, E. C. WEIR, A. E. BROADUS und A. F. STEWART (1996):

Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology.

Physiological Reviews 76, 127-173

PUTKEY, J. A., A. M. SPIELVOGEL, R. D. SAUERHEBER, C. S. DUNLAP und A. W. NORMAN (1982):

Vitamin D-mediated intestinal calcium transport.
Biochem. Biophys. Acta 688, 177-190

RADDE, I. C., D. DAVIS, J. SHEEPERS und H. G. MC KERCHER (1980):

Bidirectional transmucosal ^{45}Ca and ^{32}P fluxes across the small intestine of the young piglet: Relationship to intestinal Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase activity and postnatal age.
In: De Luca H. F. und C. S. Anast (Hrsg.): Pediatric diseases related to calcium.
Blackwell Scientific Publications, Oxford, 153-163

RASMUSSEN, H., T. MATSUMOTO, O. FONTAINE und D. B. P. GOODMAN (1982):

Role of changes in membrane lipid structure in the action of 1,25-dihydroxyvitamin D_3 .
Fed. Proc. 41, 72-77

RAUE, F. und E. BLIND (1993):

Parathormone-related-Protein. Ein neues calciumregulierendes Hormon und seine Bedeutung für die Tumorhypercalcämie.
Dtsch. Med. Wschr. 118, 916-921

RODDA, C. P., M. KUBOTA, J. A. HEATH, P. R. EBELING, J. M. MOSELEY, A. D. CARE, I. W. CAPLE und T. J. MARTIN (1988):

Evidence for a novel parathyroid hormone-related protein in fetal lamb parathyroid glands and sheep placenta: comparison with a similar protein implicated in humoral hypercalcaemia of malignancy.
J. Endocrinol. 117, 261-271

RODDA, C. P., I. W. CAPLE und T. J. MARTIN (1992):

Role of PTHrP in fetal and neonatal physiology.
In: Parathyroid hormone-related protein: Normal physiology and its role in cancer
Boca Raton, FL, CRC, 169-196

RUBINOFF, M. J. und H. N. NELLANS (1985):

Active calcium sequestration by intestinal microsomes. Stimulation by increased calcium load.
J. Biol. Chem. 260, 7824-7828

SCHACHTER, D. und S. KOWARSKI (1982):

Isolation of the protein IMCal, a vitamin D-dependent membrane component of the intestinal transport mechanism for calcium.
Fed. Proc. 41, 84-87

SCHEDL, H. P., K. CHRISTENSEN, W. RONNENBERG und S. THOMAS (1990):
Intestinal calcium transport in systemic disease. studies with brush-border
membrane vesicles.
Miner. Electrolyte Metab. 16, 147-153

SCHLIWA, M. (1982):
Action of cytochalasin D on cytoskeletal networks.
J. Cell Biol. 91, 79-91

SCHRÖDER, B. (1996):
Vergleichende Physiologie der gastrointestinalen Calcium- und Phosphatabsorption
bei Schweinen und kleinen Wiederkäuern.
Habilitationsschrift, Justus-Liebig-Universität Gießen

SCHRÖDER, B., R. KAUNE und J. HARMEYER (1990):
Studies of the porcine calcitriol receptor in pseudo-vitamin D deficiency type I.
Clin. Sci. 79, 409-414

SCHRÖDER, B., R. KAUNE und J. HARMEYER (1991):
Effects of calcitriol on stimulation of ion transport in pig jejunal mucosa.
J. Physiol. 433, 451-465

SCHRÖDER, B., R. KAUNE, C. SCHLUMBOHM, G. BREVES und J. HARMEYER
(1993):
Evidence for vitamin D-independent active calcium absorption in newborn piglets.
Calcif. Tissue Int. 52, 305-309

SCHRÖDER, B., R. KAUNE und G. BREVES (1994):
Postnatale Entwicklung des Elektrolyt-Transportes im Dünndarm von Schweinen.
Z. Gastroenterol. 32 (Suppl. 2), 10-14

SCHRÖDER, B., C. SCHLUMBOHM, R. KAUNE und G. BREVES (1996):
Role of calbindin-D_{9K} in buffering cytosolic free Ca²⁺-ions in pig duodenal
enterocytes.
J. Physiol. 492, 715-722

SCHRÖDER, B., M. R. DAHL und G. BREVES (1998a):
Zur Rolle des Cytoskeletts bei der intestinalen Ca²⁺-Absorption in der frühen
postnatalen Lebensphase.
Z. Gastroenterol. 36 (Suppl. 1), 44-48

SCHRÖDER, B., M. R. DAHL und G. BREVES (1998b):
Duodenal Ca²⁺ absorption is not stimulated by calcitriol during early postnatal
development of pigs.
Am. J. Physiol. 275, G305-G313

SCHRÖDER, B., O. HATTENHAUER und G. BREVES (1998c):
Phosphate transport in pig proximal small intestine during postnatal development
lack of modulation by calcitriol.
Endocrinology 139, 1500-1507

SCHULTZ, S. G. und R. ZALUSKY (1964):
Ion transport in isolated rabbit ileum. I. Short-circuit current and Na-fluxes.
J. Gen. Physiol. 47, 567-584

SEVERSON, D. L. , R. M. DENTON, H. T. PASK und P. J. RANDLE (1974)
Calcium and magnesium ions as effectors of adipose-tissue pyruvate
dehydrogenase phosphate phosphatase.
Biochem. J. 140, 225-237

SEVERSON, D. L., R. M. DENTON, B. J. BRIDGES und R. J. RANDLE (1976):
Exchangeable and total calcium pools in mitochondria of rat epididymal fat-pads and
isolated fat-cells. Role in the regulation of pyruvate dehydrogenase activity.
Biochem. J. 154, 209-23

SKOUFIAS, D. A. und L. WILSON (1992):
Mechanism of inhibition of microtubule polymerisation by colchicine; inhibitory
potencies of unliganded colchicine and tubulin-colchicine complexes.
Biochemistry 31, 738-746

SMITH, M. W. und L. G. JARVIS (1977):
Villus growth and cell replacement in the small intestine of the neonatal pig.
Experientia 33, 1587-1588

SMITH, P. L., S. A. ORELLANA und M. FIELD (1981):
Active sulfate absorption in rabbit ileum: dependence on sodium and chloride effects
of agents that alter chloride transport.
J. Membr. Biol. 63, 199-206

SPANOS, E., D. J. BROWN, J. C. STEVENSON und I. MAC INTYRE (1981):
Stimulation of 1,25-dihydroxycholecalciferol production by prolactin and related
peptides in infant renal cell preparations in vitro.
Biochim. Biophys. Acta. 672, 7-15

SPECTOR, I., N. R. SHOCHET, Y. KASHMAN und A. GROWEISS (1983):
Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured
cells.
Science 219, 493-495

SPECTOR, I., N. R. SHOCHET, D. BLASBERGER und Y. KASHMAN (1989):
Latrunculins-novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and effect cell growth: I. Comparison with cytochalasin D.
Cell Motil. Cytoskeleton 13, 127-144

STATHOS, T. H., R. J. SHULMAN, R. J. SCHANLER und S. A. ABRAMS (1996):
Effect of carbohydrates on calcium absorption in premature infants.
Ped. Res. 39, 666-670

STERN, P. H., G. SHANKAR, R. C. FARGHER, D. H. COOP, C. E. MILLIKEN, K. J. SATO, D. GOLTZMAN und M. P. M. HERRMANN-ERLEE (1991):
Salmon stanniocalcin and bovine parathyroid hormone have dissimilar actions on mammalian bone.
J. Bone Miner. Res. 6, 1153-1159

TAYLOR, A. N. und R. H. WASSERMAN (1967):
Vitamin D₃-induced calcium-binding protein: partial purification, electrophoretic visualization and tissue distribution.
Arch. Biochem. Biophys. 119, 536-540

THIÉBAUD, D., S. JANISCH, H. KOELBL, E. HANZAL, A. F. JACQUET, S. LEODOLTER, P. BURCKHARDT und M. PECHTERS DORFER (1993):
Direct evidence of a parathyroid related protein gradient between the mother and the newborn humans.
Bone Mineral 23, 213-221

THIENENKAMP, D. (1996):
In vitro-Untersuchungen zum intestinalen Calcium-Transport bei neugeborenen Ferkeln.
Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen

UPPULURI, S., L. KNIPLING, D. L. SACKET und J. WOLFF (1993):
Localisation of the colchicine-binding site of tubulin.
Proc. Natl. Acad. Sci. 90, 11598-11602

USSING, H. H. und K. ZEHRAN (1951):
Active transport of sodium as a source of electric current in the short-circuited isolated frog skin.
Acta Physiol. Scand. 23, 110-127

VAN CORVEN, E. J. J. M., M. D. DE JONG und C. H. VAN OS (1987):
The adenosine triphosphate dependent calcium pump in rat small intestine: Effects of vitamin D deficiency and cell isolation methods.
Endocrinology 120, 868-873

VAN OS, C. H. (1987):

Transcellular calcium transport in intestinal and renal epithelial cells.

Biochim. Biophys. Acta 906, 195-222

WADHWA, D. R. (1998):

Control of calcium absorption from the reticulo-rumen and its relationship to calcium homeostasis in sheep.

Ph. D. thesis, University of Wales, Aberystwyth

WAGNER, G. F., C. C. GUIRAUDON, C. MILLIKEN und D. H. COPP (1995):

Immunological and biological evidence for a stanniocalcin-like hormone in human kidney.

Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 92, 1871-1875

WASSERMAN, R. H. (1992):

The intestinal calbindins: their function, gene expression and modulation in genetic disease.

In: Bronner, F. und M. Peterlik (Hrsg.): Extra- and intracellular calcium and phosphate regulation

CRC Press, Boca Raton, FL, 43-70

WASSERMAN, R. H. und A. N. TAYLOR (1966):

Vitamin D induces calcium binding-protein in chick intestinal mucosa.

Science 152, 791-793

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

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

J. Nutr. 122, 662-671

WASSERMAN, R. H., C. A. SMITH, M. E. BRINDAK, N. DETALAMONI, C. S. FULLMER, J. T. PENNISTON und J. T. KUMAR (1992b):

Vitamin-D and mineral deficiencies increase the plasma membrane calcium pump of chicken intestine.

Gastroenterology 102, 886-894

WEISER, M. M., M. MALCOM NEUMEIER, A. QUARONI und K. KIRSCH (1978):

Synthesis of plasmalemmal glycoproteins in intestinal epithelial cells. Separation of golgi membranes from villus and crypt cell surface membranes; Glycotransferase activity of surface membrane.

J. Cell Biol. 77, 722-734

WINKLER, I., F. SCHREINER und J. HARMEYER (1986):

Absence of renal 25-hydroxycholecalciferol-1-hydroxylase activity in pig strain with vitamin D-dependent rickets.

Calcif. Tissue Int. 38, 87-94

WIRTH, F. H., B. NUMEROF, P. PLEBAN und M. J. NEYLAN (1990):

Effect of lactose on mineral absorption in preterm infants.

J. Pediatr. 11, 283-287

XU, R. J., D. J. MELLOR, P. TUNGTHANATHANICH, M. J. BIRTLES, G. W. REYNOLDS und H. V. SIMPSON (1992):

Growth and morphological changes in the small and the large intestine in piglets during the first three days after birth.

J. Developm. Physiol. 18, 161-172

ZANELLO, L. P. und A. W. NORMAN (1997):

$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and related analogs stimulate chloride currents in osteoblastic ROS 17/2.8 cells.

In: Norman, A. W., R. Bouillon, M. Thomasset (Hrsg.): Biology and Clinical Applications of the Steroid Hormone

Riverside, CA: University of California, Riverside, 369-370

Danksagung

Herrn Prof. Dr. G. Breves danke ich für die freundliche Aufnahme in der Arbeitsgruppe.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. B. Schröder für die Überlassung des interessanten Themas, vor allem aber für die nette Betreuung, für seine große Geduld, wenn es darum ging, Fragen und Probleme zu diskutieren und für viele hilfreiche Ratschläge.

Frau Becker möchte ich danken für die Betreuung in allen Bereichen der Labortätigkeit, für zahlreiche gute Tipps und dafür, dass sie jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Marion Burmester danke ich für die Einweisung in sämtliche Geheimnisse der Ussing-Kammer und ihre unentbehrliche Hilfe bei den Versuchen, welche ich auch aufgrund vieler netter Gespräche immer in guter Erinnerung behalten werde.

Liebe „Mit-Doktoranden“ („fertige“ und „fast fertige“), Christiane, Johanna, Jens, Gunnar und Christina, ohne Euch hätte die Arbeit und das Drumherum nur halb so viel Spaß gemacht. Ich habe mich in unserer gemeinsamen Runde richtig wohl gefühlt.

Micha danke ich für die Hilfe bei den Probenentnahmen und dafür, dass er monatelang auf seinen Computer verzichtet hat. Außerdem danke ich ihm für seinen verständnisvollen Umgang mit in regelmäßigen Abständen wiederkehrenden „Doktorarbeit-Zusammenschreib-Krisen“.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, nicht nur für die finanzielle sondern auch für die emotionale Unterstützung. Vielen Dank auch für die unzähligen „Care-Pakete“ mit badischen Spezialitäten und Erzeugnissen aus dem hauseigenen Weinberg.