

Aus dem Physiologischen Institut  
der Tierärztlichen Hochschule Hannover

**Untersuchungen zur funktionellen und strukturellen  
Charakterisierung renaler Phosphattransportsysteme  
bei kleinen Wiederkäuern**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades im  
Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und  
Umweltmanagement der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
**Christina Franziska Walter**  
Hannover 1999

**Dissertation im Fachbereich Agrarwissenschaften,  
Ökotoxikologie und Umweltmanagement der Justus-Liebig-  
Universität Gießen  
17. Dezember 1999**

Vorsitzender: Prof. Dr. P. M. Schmitz

1. Gutachter: Prof. Dr. G. Breves

2. Gutachterin: Prof. Dr. H. Daniel

Prüferin: Prof. Dr. M. Neuhäuser-Berthold

Prüfer: Prof. Dr. J. Pallauf

***Meinen Eltern***

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Literaturübersicht</b>	<b>2</b>
2.1	Besonderheiten des Phosphathaushaltes von Wiederkäuern	2
2.1.1	Sekretion mit dem Speichel	2
2.1.2	P <sub>i</sub> -Bewegungen im Magen-Darm-Trakt	4
2.1.3	Renale P <sub>i</sub> -Ausscheidung	6
2.2	P <sub>i</sub> -Resorption entlang des Nephrons	8
2.2.1	Zelluläre Mechanismen der proximalen tubulären P <sub>i</sub> -Absorption	9
2.2.1.1	Apikale Transportmechanismen	9
2.2.1.2	Transzelluläre Mechanismen	12
2.2.1.3	Basolaterale Transportmechanismen	12
2.2.2	Besondere strukturelle Aspekte des Na <sup>+</sup> /P <sub>i</sub> -Cotransporters Typ II	13
2.3	Hormonelle Regulation	15
2.4	Einfluß der alimentären P-Versorgung auf die Expression des Na <sup>+</sup> /P <sub>i</sub> -Cotransporters Typ II	17
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>21</b>
3.1	Versuchstiere, Fütterung und Gewebeentnahme	21
3.2	Präparation der Bürstensaummembranvesikel	23
3.3	Transportuntersuchungen	26
3.3.1	Schnellfiltrationstechnik	26
3.3.2	Bei den Messungen zur Phosphataufnahme verwendete Inkubationsansätze	26
3.4	Protein- und Enzymbestimmungen	28
3.4.1	Proteinbestimmung	28
3.4.2	Aktivität der alkalischen Phosphatase	29
3.4.3	Aktivität der Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase	29
3.5	Plasmaanalytik	30

3.5.1	Calcium	30
3.5.2	Anorganisches Phosphat	30
3.6	Berechnungen	30
3.6.1	Aufnahmerate	30
3.6.2	Vesikelvolumen	31
3.7	Isolierung von RNA	32
3.8	Probenaufbereitung für die PCR	32
3.8.1	DNase-Verdau	32
3.8.2	Erst-Strang-Synthese	33
3.9	PCR	34
3.9.1	Primer	34
3.9.2	Reaktionsansatz und Durchführung der PCR	34
3.9.3	Detektion und Analyse der PCR-Produkte	35
3.9.4	Extraktion der PCR-Produkte aus dem Agarosegel	36
3.10	Sequenzieren der PCR-Produkte	36
3.10.1	Transformation von Zellen	36
3.10.1.1	Ligation der PCR-Produkte in einen Vektor	36
3.10.1.2	Transformation von JM109-Zellen	38
3.10.2	Plasmidpräparation	39
3.10.3	Restriktionsverdau	39
3.10.4	Sequenzierung	39
3.11	Lösungszusammensetzung	39
3.12	Statistische Auswertung	41
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>42</b>
4.1	Charakterisierung des Tiermodells	42
4.2	Anreicherung der Bürstensaummembranvesikel	44
4.3	Vesikelintegrität	46
4.4	Charakterisierung der $P_i$ -Aufnahme	47
4.4.1	Initiale $P_i$ -Aufnahme	48
4.4.2	$P_i$ -Aufnahme als Funktion der $P_i$ -Konzentration	49
4.4.3	$P_i$ -Aufnahme als Funktion der $Na^+$ -Konzentration	52

4.5	Molekulare Charakterisierung des $P_i$ -Transportsystems	55
4.5.1	Amplifikation von $Na^+/P_i$ -Cotransporter Typ II spezifischen Fragmenten	55
4.5.2	Sequenzierung der $Na^+/P_i$ -Cotransporter Typ II spezifischen Fragmente	56
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	60
5.1	Beurteilung der angewandten Methode	60
5.1.1	Anreicherung der Bürstensaummembranfraktion	61
5.1.2	Vesikelintegrität und -volumen	62
5.2	Auswirkungen einer unterschiedlichen P- oder Ca-Versorgung auf die P- und Ca-Konzentration im Plasma	64
5.3	Kinetische Eigenschaften des $P_i$ -Transporters	66
5.3.1	Einfluß von $P_i$ auf den $P_i$ -Transport	66
5.3.2	Einfluß von $Na^+$	72
5.4	Strukturelle Charakterisierung des $Na^+/P_i$ -Cotransporter Typ II	75
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	78
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	81

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AP	alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
BSMV	Bürstensaummembranvesikel
ca.	circa
cDNA	complementary DNA (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
Ci	Curie
cpm	counts per minute (Zerfallsrate pro Minute)
d	Tag
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonucleotid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Fa.	Firma
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
kDa	Kilo-Dalton
kg	Kilogramm
$K_m$	Michaelis-Menten-Konstante
l	Liter
min	Minute
mm	Millimeter
mRNA	messenger Ribonucleic Acid (Messenger Ribonukleinsäure)
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer
nm	Nanometer
P	Phosphor

## Abkürzungsverzeichnis

---

PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasenkettenreaktion)
P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat
PTH	Parathormon
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Reverse Transcriptase
Taq	Thermophilus Aquaticus
Tris	Tris[hydroxymethyl]aminomethan
U	Units
V <sub>max</sub>	maximale Reaktionsgeschwindigkeit in Michaelis-Menten-Beziehung

## 1. Einleitung

Phosphor (P) ist ein essentieller Bestandteil vieler organischer und anorganischer Verbindungen im Organismus. Ungefähr 85 % des Gesamtphosphats sind als Hydroxylapatit im Knochen lokalisiert, 15 % verteilen sich auf Weichgewebe (14 %) und intra- und extrazelluläre Flüssigkeiten (1 %). Neben seiner Bedeutung als wesentlicher Baustein bei der Mineralisierung der Knochen kommt ihm auch eine wichtige Rolle als Puffersubstanz im Säure-Basenhaushalt zu. Außerdem spielen organische Phosphate eine wichtige Rolle in der Regulation des Energiehaushaltes der Zelle und sind ein elementarer Bestandteil der Zellmembranen.

Der P-Haushalt von Wiederkäuern unterscheidet sich deutlich von dem monogastrischer Tiere. Über eine hohe  $P_i$ -Sekretion mit dem Speichel wird bei niedriger renaler  $P_i$ -Ausscheidung durch die  $P_i$ -Absorption im Darm ein effektiver endogener  $P_i$ -Kreislauf aufrechterhalten, der für eine ausreichende Effizienz des mikrobiellen Stoffwechsels im Pansen essentiell ist.

Die physiologischen Grundlagen dieser hohen renalen  $P_i$ -Resorptionskapazität bei Wiederkäuern im Vergleich mit monogastrischen Tieren sind noch nicht geklärt. Es ist denkbar, daß sie auf artspezifische Unterschiede in den kinetischen Eigenschaften des  $P_i$ -Transportsystems der Niere zurückzuführen sind.

Ziel dieser Arbeit war es, die kinetischen Parameter des renalen  $P_i$ -Transportsystems bei Ziegen und Schafen zu untersuchen und einen möglichen Einfluß der P- und Ca-Homöostase auf die Transporteigenschaften zu erfassen. Um methodisch vergleichbare Daten für eine monogastrische Spezies zu erhalten wurden Kontrollversuche an Schweinen durchgeführt.

Mit Hilfe von PCR und DNA-Sequenzierung sollte untersucht werden, ob es sich bei dem renalen  $Na^+$ -abhängigen Phosphattransportsystem von Ziege, Schaf und Schwein auch um einen  $Na^+/P_i$ -Cotransporter Typ II, der in der Rattenniere nachgewiesen wurde, handelt.

## 2. Literaturübersicht

### 2.1 Besonderheiten des Phosphathaushaltes von Wiederkäuern

Der Phosphathaushalt von Wiederkäuern zeichnet sich im Vergleich zum monogastrischen Tier durch mindestens zwei Besonderheiten aus, zum einen durch die hohe endogene  $P_i$ -Sekretion mit dem Speichel und zum anderen durch die niedrige renale  $P_i$ -Ausscheidung.

#### 2.1.1 $P_i$ -Sekretion mit dem Speichel

Die tägliche endogene  $P_i$ -Sekretion mit dem Speichel läßt sich aus der täglichen Speichelflußrate und der  $P_i$ -Konzentration im Mischspeichel bestimmen. Nach Untersuchungen von KAY (1960), BREVES et al. (1987) und JAUQUES et al. (1989) liegt die tägliche Speichelproduktion von Schafen bei 10-19 l. Die  $P_i$ -Konzentration im Speichel variierte dabei zwischen 8 und 32 mmol l<sup>-1</sup> und wurde entscheidend durch die Höhe der Plasma- $P_i$ -Konzentration beeinflusst (PRESTON und PFANDER 1964, FARRIES und KRASNODEBSKA 1972, POPPI und TERNOUTH 1979, FIELD et al. 1982, MANAS-ALMENDROS et al. 1982, SCOTT et al. 1984a und 1984b, BREVES et al. 1987). Das bedeutet, daß im Mittel 300 mmol  $P_i$  pro Tag mit dem Speichel sezerniert werden. Dabei besteht zwischen der Plasma- $P_i$ -Konzentration, die bei Schafen mit bedarfsgerechter Phosphatversorgung 1,6-2,3 mmol l<sup>-1</sup> beträgt, und der  $P_i$ -Konzentration im Speichel eine positive lineare Beziehung bis zu einer  $P_i$ -Konzentration von 3-5 mmol l<sup>-1</sup> im Plasma (CLARK et al. 1973, TOWNS et al. 1978, SCOTT und BEASTALL 1978, CHALLA und BRAITHWAITE 1988c, WIDIYONO et al. 1998). Das Verhältnis zwischen Speichel- $P_i$  und Plasma- $P_i$  liegt dabei bei 12:1 bis 16:1 (SCOTT und BEASTALL 1978, MANAS-ALMENDROS et al. 1982).  $P_i$  kann also in den Speicheldrüsen konzentriert werden. Dieser Mechanismus ist sättigbar, denn bei höheren Plasmakonzentrationen steigt die Speichel- $P_i$ -Konzentration nur noch wenig an und stellt sich trotz weiterer Konzentrationserhöhungen im Plasma auf einen Maximalwert ein.

Die Hauptlokalisierung der  $P_i$ -Sekretion der Speicheldrüsen liegt in den Drüsenendstücken (COMPTON et al. 1980). Über den „Bergauf“-Transportmechanismus liegen bislang nur wenige Untersuchungen vor. Untersuchungen an basolateralen Membranvesikeln von Zellen der Parotisdrüsenendstücke von Schafen erbrachten Hinweise auf die Beteiligung eines  $Na^+$ -abhängigen, elektrogenen  $P_i$ -Transportsystems (SHIRAZI-BEECHEY et al. 1991, VAYRO et al. 1991).

Es ist ungeklärt auf welchem Weg  $P_i$ -Ionen die Zellen durch die apikale Membran in die Drüsengänge verlassen. Ebenso wenig ist bekannt, ob und wie die ansonsten an der P-Homöostase direkt oder indirekt beteiligten Hormone Calcitriol, PTH und Calcitonin die  $P_i$ -Sekretion beeinflussen. So bewirkte PTH sowohl einen Anstieg der  $P_i$ -Konzentration im Speichel (TOMAS und SOMERS 1974, CLARK et al. 1975, WADSWORTH und COHEN 1977, WRIGHT et al. 1984) als auch den gegenteiligen Effekt (MANAS-ALMENDROS et al. 1982). Calcitonin verursachte eine erhöhte  $P_i$ -Konzentration im Speichel (MATSUI et al. 1984), während Calcitriol den  $P_i$ -Gehalt erniedrigte (MANAS-ALMENDROS et al. 1982).

Die hohe endogene  $P_i$ -Sekretion mit dem Speichel führt dazu, daß die auf diesem Wege in die Vormägen gelangende P-Menge auch bei bedarfsdeckender alimentärer P-Versorgung immerhin zwischen 50% und 80% des täglich in den Pansen gelangenden Gesamt-P beträgt (BRAITHWAITE 1984, SCOTT et al. 1985, CHALLA et al. 1989, SCOTT und BUCHAN 1987). Besonders bei niedriger P-Versorgung übertrifft der Speichel-P die alimentäre P-Aufnahme um ein Vielfaches (TOMAS et al. 1967), da die Fähigkeit der Speicheldrüsen  $P_i$  im Speichelsekret anzureichern, erhalten bleibt (TERNOUTH et al. 1985). Diese Besonderheit der Wiederkäuer dient vermutlich der Sicherstellung der Versorgung der Mikroorganismen mit P und damit der Sicherung mikrobieller Stoffwechsel- und Syntheseleistungen im Pansen. Es konnte im Experiment gezeigt werden, daß niedrige ruminale  $P_i$ -Konzentrationen zu Einschränkungen der Verdaulichkeit von organischer Substanz sowie zur Reduktion der mikrobiellen Proteinsynthese führten (FARRIES und KRASNODEBSKA 1972, FIELD et al. 1975, SEVILLA und TERNOUTH 1980 und 1982, MILTON und TERNOUTH 1984 und 1985, TERNOUTH et al. 1985, BREVES und HÖLLER 1987a und 1987b, PETRI et al. 1988).

### 2.1.2 $P_i$ -Bewegungen im Magen-Darm-Trakt

Bei bedarfsdeckender alimentärer P-Versorgung und physiologischen  $P_i$ -Konzentrationen im Plasma und Speichel liegen die  $P_i$ -Gehalte in der Pansenflüssigkeit von Schafen zwischen 13 und 20 mmol l<sup>-1</sup> (TOMAS et al. 1967, BONILLA 1976, BREVES et al. 1987).

Mit Hilfe der Technik des entleerten, gewaschenen, isolierten und mit einer künstlichen Pansenflüssigkeit gefüllten Pansens wurden Untersuchungen zur ruminalen  $P_i$ -Absorption bei Schafen durchgeführt. Dabei konnte eine positiv lineare Beziehung zwischen der  $P_i$ -Konzentration in der Pansenflüssigkeit und der  $P_i$ -Nettoabsorption bestimmt werden (BREVES et al. 1988, BEARDSWORTH et al. 1989). Dies läßt vermuten, daß der Nettoabsorption von  $P_i$  im Pansen passive Transportmechanismen zugrunde liegen. Auch die Befunde aus In-vitro-Untersuchungen am isolierten Pansenepithel von Schafen, die mit Hilfe der Ussingkammertechnik durchgeführt wurden, deuten auf eine einfache passive Diffusion hin (BREVES et al. 1988, DUA et al. 1994).

$P_i$ -Bewegungen über die Wand des Blättermagens werden in der Literatur widersprüchlich diskutiert. Während ENGELHARDT und HAUFFE (1975) in In-vivo-Untersuchungen an Schafen eine nur geringe Nettoabsorption feststellten, lag bei Kälbern nach Untersuchungen von BANKS und SMITH (1984a,b) und ENDERISE und SMITH (1979, 1986) die Nettoabsorption zwischen 10 % und 40 % des P, welches das Omasum passierte.

Dem Labmagen wird keine große Bedeutung bei der  $P_i$ -Nettoabsorption beigemessen, aber In-vitro-Untersuchungen von MAHLER (1991) lassen eine  $P_i$ -Nettoabsorption aus dem Labmagen, wenn auch in geringen Mengen, möglich erscheinen. Dabei wird wie beim Pansen ein passiver  $P_i$ -Transport auf parazellulärem Wege, diskutiert (MAHLER 1991).

Der quantitative Anteil der Vormägen an der gesamten gastrointestinalen  $P_i$ -Nettoabsorption kann als vergleichsweise gering angesehen werden. Damit wird die in das proximale Duodenum fließende P-Menge, wie vorher dargelegt, durch den Futter- und Speichel-P bestimmt und nur geringfügig im oberen Dünndarm durch den über Galle und Pankreasflüssigkeit sezernierten P erhöht. SCOTT und McLEAN (1981) fanden eine tägliche P-Sekretion über die Gallen- und Pankreasflüssigkeit von nur 0,5-0,7 g, wovon 0,1 g als  $P_i$  und 0,4-0,6 g als Phospholipide sezerniert wurden. Bei Überlegungen bezüglich quantitativer Aspekte der intestinalen P-Bewegungen kann dieser Anteil deshalb vernachlässigt werden.

Viele Untersuchungen haben eindeutig gezeigt, daß der Dünndarm die Hauptlokalisierung für die  $P_i$ -Absorption darstellt (BRUCE et al. 1966, GRACE et al. 1974, DILLON und SCOTT 1979, BEN-GHEDALIA et al. 1982, WILSON und FIELD 1983, BREVES et al. 1985, SKLAN und HURWITZ 1985, WYLIE et al. 1985). Quantitativ wird beim adulten Tier bis zum Ende des Dünndarms in etwa die Menge an  $P_i$  absorbiert, die vormals über die endogene Speichelsekretion in den Magen-Darm-Trakt gelangt ist (PFEFFER et al. 1970, GRACE et al. 1974, BEN-GHEDALIA et al. 1975). In das terminale Ileum gelangen ca. 2 g P/d, wobei die Verteilung der verschiedenen P-Fractionen nicht mehr der im proximalen Duodenum entspricht (BREVES et al. 1985). Dort sind zwischen 60 % und 80 % des Gesamt-P in der Darmflüssigkeit gelöst, wovon 90 % auf  $P_i$  entfallen. Im terminalen Ileum beträgt dagegen der Anteil des löslichen P nur noch zwischen 19 % und 52 %, die nur zu etwa 30 % als  $P_i$  vorliegen (VAN'T KLOOSTER 1967, BEN-GHEDALIA et al. 1975, GRACE et al. 1977, BREVES et al. 1985). Diese In-vivo-Befunde unterstreichen die Absorptionskapazität des Dünndarms für  $P_i$ -Ionen. Ussingkammerversuche mit Jejunum von Ziegen und Schafen (SCHRÖDER et al. 1995) und Transportuntersuchungen mit jejunalen Bürstensaummembranvesikeln (BSMV) der Ziege (SCHRÖDER und BREVES 1996) lieferten schließlich Hinweise auf aktive  $P_i$ -Transportmechanismen.

Über die Bedeutung des Dickdarms für die  $P_i$ -Absorption liegen widersprüchliche Ergebnisse vor. Während in einigen Untersuchungen keine  $P_i$ -Nettobewegungen über die Dickdarmwand nachgewiesen werden konnten, haben andere Versuche entweder eine Nettosekretion oder -absorption von  $P_i$  gezeigt. Die richtungsbestimmenden Faktoren des Transports sind dabei noch nicht bekannt. Aber es besteht keine eindeutige Abhängigkeit von der Höhe der täglichen P-Zufuhr (BRUCE et al. 1966, PFEFFER et al. 1970, GRACE 1972, GRACE et al. 1974, BEN-GHEDALIA et al. 1975 und 1982, POPPI und TERNOUTH 1979, GREENE et al. 1983, BREVES et al. 1985, SKLAN und HURWITZ 1985, THEWIS und FRANCOIS 1985, WYLIE et al. 1985, HÖLLER et al. 1988). In-vitro-Untersuchungen am proximalen Colon von Schafen lieferten ähnlich wie am Dünndarm Hinweise auf die Beteiligung aktiver Mechanismen an der  $P_i$ -Absorption (SCHRÖDER et al. 1995).

### **2.1.3 Renale $P_i$ -Ausscheidung**

Im Vergleich zu monogastrischen Tieren scheiden Wiederkäuer nur sehr geringe Mengen an  $P_i$  mit dem Harn aus. Zur Verdeutlichung sind die täglich  $P_i$ -Ausscheidungen bei verschiedenen Spezies in Tab. 1 vergleichend dargestellt.

Tab. 1 Tägliche P<sub>i</sub>-Ausscheidungen im Harn von verschiedenen Spezies (Beispiele).

Spezies	Tägliche P <sub>i</sub> -Ausscheidung im Harn		Autoren
	(g/d)	% der tägl. P-Aufnahme	
<b>Ziege</b>	0,04 - 0,22	1,3 - 6,3	Schöneseiffen (1993)
<b>Schaf</b>	0,01 - 0,02	1,3 - 2,4	Preston und Pfander (1964)
<b>Schwein</b>	2,0 - 2,8	23 - 33	Böntgen-Simonet (1993)
<b>Katze</b>	0,05 - 0,23	16 - 71	Kienzle und Wilms-Eilers (1993)
<b>Hund</b>	0,23 - 0,3	20 - 27	Zentek et al. (1994)

Eine vergleichsweise hohe renale P<sub>i</sub>-Exkretion wie bei monogastrischen Spezies wurde bei Wiederkäuern nur bei saugenden bzw. milchernährten Lämmern und Kälbern beobachtet (WALKER 1972, HODGE 1973, BOENCKE et al. 1976, 1981). Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß die Tiere in diesem Alter funktionell noch als monogastrische Tiere angesehen werden können.

In anderen Untersuchungen fielen jedoch auch immer wieder einzelne adulte Wiederkäuer auf, deren renale P<sub>i</sub>-Ausscheidung eher derjenigen der monogastrischen Tiere entsprach. In Bilanzuntersuchungen fand MEYER (1972) z.B. bei 3 von 8 Schafen eine erhöhte P<sub>i</sub>-Ausscheidung mit dem Harn (1,9-2,3 g/d), die restlichen Tiere schieden dagegen nur etwa 0,02 g/d aus. Auch FIELD (1981) beschrieb, bei einer alimentären P-Aufnahme von 4,6 g/d, Schafe mit hoher (1,8-2,7 g/d) und andere mit extrem geringer P<sub>i</sub>-Exkretion (0,03-0,05 g/d). SCOTT et al. (1984a) fanden bei 2 von 6 Schafen eine erhöhte P<sub>i</sub>-Ausscheidung, nachdem die P-Aufnahme von basal 2,05 g/d (Grasfütterung) bzw. 1,51 g/d (Heufütterung) durch eine intraruminale P<sub>i</sub>-Infusion auf 5,05 g/d bzw. 4,51 g/d erhöht wurde. Auch FIELD et al. (1983) konnten dieses Phänomen bestätigen. Dabei wurde eine lineare Beziehung zwischen der alimentären P-Versorgung und der

renalen  $P_i$ -Exkretion nachgewiesen. Über die Ursachen dieser renalen „ $P_i$ -Ausscheider“ unter den Wiederkäuern ist bislang nichts Näheres bekannt.

Ähnlich wie bei monogastrischen Tieren wird die renale  $P_i$ -Ausscheidung beim Wiederkäuer durch die  $P_i$ -Konzentration des Plasmas beeinflusst. In Untersuchungen an Ziegen, Schafen und Kühen, in denen eine Steigerung der  $P_i$ -Konzentration im Plasma durch intravenöse bzw. intraabomasale  $P_i$ -Infusionen erzielt wurde, konnte eine Erhöhung der renalen  $P_i$ -Ausscheidung nachgewiesen werden. Dieser Effekt trat aber erst bei unphysiologisch hohen  $P_i$ -Plasmakonzentrationen  $>2-4 \text{ mmol l}^{-1}$  auf, was den Schwellenwert der  $P_i$ -Ausscheidung darstellt (FIELD et al. 1983, SCOTT et al. 1984b, SCOTT und BUCHAN 1985, CHALLA und BRAITHWAITE 1988a,b, WIDIYONO 1995).

## **2.2 $P_i$ -Absorption entlang des Nephrons**

Die Hauptlokalisation der  $P_i$ -Nettoresorption liegt im proximalen Tubulus, beginnend mit der Pars convoluta. Unter bestimmten Bedingungen kann jedoch auch im distalen Tubulus und im Sammelrohr  $P_i$  resorbiert werden (AMIÉL et al. 1970, BAUMANN et al. 1975, BONJOUR und CAVERZASIO 1984, BORLE 1974, DENNIS und BRAZY 1982, DENNIS et al. 1979, KNOX et al. 1977, KNOX et al. 1982, LANG et al. 1981, McKEOWN et al. 1979, MIZGALA und QUAMME 1985) (siehe Abb. 1). Allerdings sind die Nettofluxraten in den einzelnen Tubulusabschnitten und ihr relatives Verhältnis zueinander nicht konstant, da die einzelnen Segmente in unterschiedlicher Weise auf modulierende Faktoren, wie z.B. PTH (siehe 2.5) oder  $P_i$ -Depletion, reagieren (DENNIS et al. 1977, DENNIS und BRAZY 1982, MÜHLBAUER et al. 1977). Erhebliche Unterschiede in der  $P_i$ -Resorption konnten auch zwischen den superfiziellen und juxtamedullären Nephronen beobachtet werden, so wird in juxtamedullären Nephronen bis zu 80 % mehr  $P_i$  resorbiert als in superfiziellen Nephronen (GOLDFARB 1980, HAAS et al. 1978).

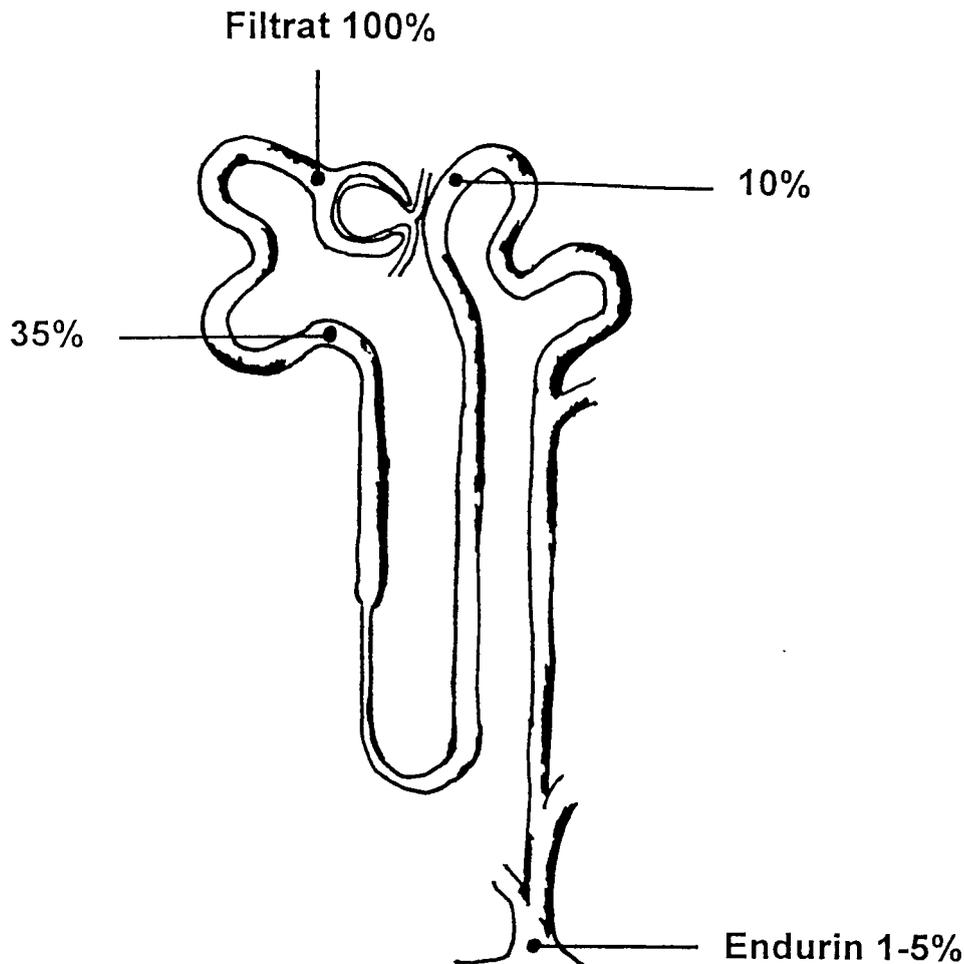


Abb.1 P<sub>i</sub>-Resorption entlang des Nephrons (P<sub>i</sub>-Konzentration im Tubulus als % der filtrierten Menge)

## 2.2.1 Zelluläre Mechanismen der proximalen tubulären P<sub>i</sub>-Absorption

### 2.2.1.1 Apikale Transportmechanismen

Die P<sub>i</sub>-Aufnahme durch die apikale Bürstensaummembran der Epithelzellen im proximalen Tubulus ist abhängig von der Höhe der Na<sup>+</sup>-Konzentration in der tubulären Flüssigkeit und kann durch Ouabain und andere Inhibitoren der basolateral lokalisierten Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase gehemmt werden (BAUMANN et al. 1975, BRAZY et al. 1980a, DENNIS und BRAZY 1978, DENNIS und BRAZY 1982, DENNIS et al. 1976, ULLRICH et al. 1977, ULLRICH und MURER 1982). D.h. die transepitheliale P<sub>i</sub>-Absorption ist ein

sekundär aktiver  $\text{Na}^+/\text{P}_i$ -Cotransport, der durch die  $\text{Na}^+-\text{K}^+$ -ATPase energetisiert wird (Abb. 2).

Bereits 1976 beschrieben HOFFMANN et al. eine  $\text{Na}^+$ -abhängige  $\text{P}_i$ -Aufnahme in apikale Bürstensaummembranvesikel (BSMV) des proximalen Tubulus von Ratten. Sie beobachteten in Anwesenheit eines vesikeleinwärts gerichteten  $\text{Na}^+$ -Gradienten eine rasche  $\text{P}_i$ -Aufnahme, und zwar über den Konzentrationsausgleich zwischen intra- und extravesikulärem Medium hinaus (sog. Overshoot, d.h.  $[\text{P}_i]_{\text{intra-vesikulär}} \text{ zeitweise} > [\text{P}_i]_{\text{extravesikulär}}$ ). In Anwesenheit eines  $\text{K}^+$ -Gradienten konnte dagegen nur eine langsame, linear verlaufende  $\text{P}_i$ -Aufnahme in die Vesikel beobachtet werden. Umgekehrt war auch die  $\text{Na}^+$ -Aufnahme in die BSMV in Anwesenheit von  $\text{P}_i$ -Ionen höher als in Abwesenheit (HOFFMANN et al. 1976).

Diese Beobachtungen konnten in der Folge auch von anderen Arbeitsgruppen durch zahlreiche Vesikelstudien an unterschiedlichen Spezies und unter verschiedenen Bedingungen bestätigt werden (BARRET et al. 1980, BRANDIS et al. 1987, BINDELS 1986, BRUNETTE 1984, CAVERZASIO et al. 1982 und 1987, CHENG und SACKTOR 1981, HAMMERMANN 1986, HELPS und MC GIVAN 1991, HRUSKA und HAMMERMANN 1981, MOLITORIS et al. 1985, STOLL et al. 1979, SHIRAZI-BEECHEY et al. 1996, TURNER und DOUSA 1985, YUSUFI et al. 1989).

Untersuchungen an BSMV zur Frage, ob  $\text{P}_i$  in Form von  $\text{HPO}_4^{2-}$  und/oder  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (bei physiologischen pH-Werten von pH 7,4 liegen 80 % des  $\text{P}_i$  in divalenter Form vor) bevorzugt transportiert wird, kamen zu dem Ergebnis, daß nur ein Transportsystem für beide Anionenformen existiert, und daß die divalente möglicherweise gegenüber der monovalenten Form bevorzugt wird (BURCKHARDT et al. 1981, CHENG und SACKTOR 1983, HOFFMANN et al. 1976, QUAMME und WONG 1984, ULLRICH et al. 1978).

Weitere Studien zum Einfluß des pH-Wertes mit dem Ziel einer detaillierten funktionellen Charakterisierung des  $\text{P}_i$ -Transporters ergaben Hinweise, daß ein direkter Einfluß von  $\text{H}^+$ -Ionen auf die  $\text{Na}^+$ -Bindung des Transporters besteht, so daß seine Fähigkeit,  $\text{P}_i$  zu transportieren, in Anwesenheit saurer pH-Werte reduziert wird (BURCKHARDT et al. 1981, HOFFMANN et al. 1976, MURER et al. 1980). Eine Erhöhung der luminalen  $\text{Na}^+$ -Konzentration verminderte den inhibitorischen Effekt einer erhöhten  $\text{H}^+$ -Ionen-Konzentration auf den  $\text{P}_i$ -Transport. Dies wurde als mögliche Konkurrenz von  $\text{H}^+$ - und  $\text{Na}^+$ -Ionen um die  $\text{Na}^+$ -Bindungsstelle des Transportsystems

interpretiert (BURCKHARDT et al. 1981). Diese Beobachtung konnte aber von anderen Arbeitsgruppen nicht bestätigt werden (CHENG und SACKTOR 1981).

Eine strukturelle Identifikation der am renalen  $P_i$ -Transport beteiligten Systeme gelang durch die Klonierung zweier  $Na^+$ -gekoppelter  $P_i$ -Transporter Typ I und Typ II aus der Kaninchen- bzw. Rattenniere (WERNER et al. 1991, MAGAGNIN et al. 1993). Beide Transporter sind durch mehrere Transmembrandurchgänge (7 bei Typ I, 8 bei Typ II) gekennzeichnet und befinden sich in der apikalen Membran der proximalen Tubuluszelle (MURER und BIBER 1997). Eine funktionelle Charakterisierung der klonierten Transporter erfolgte nach Expression in *Xenopus laevis* Oozyten, in OK (opposum kidney)- und in MDCK (madine darby canine kidney)-Zellen über Tracer-Fluxmessungen und elektrophysiologische Untersuchungen.

Der  $Na^+/P_i$ -Cotransporter Typ I ist ein bifunktionales Protein mit einer aufgrund der schwachen  $Na^+$ -Abhängigkeit nur geringen  $P_i$ -Transportkapazität, die nicht über die alimentäre P-Versorgung beeinflusst ist. Außerdem weist das Protein eine ausgeprägte Anionen-Kanalfunktion auf (BUSCH et al. 1996 a,b).

Der  $Na^+/P_i$ -Cotransporter Typ II dagegen ist für den Hauptteil der  $P_i$ -Resorption verantwortlich: Bei einer Stöchiometrie von  $Na^+:P_i$  von 3:1 bindet zunächst das  $Na^+$ , dann die  $P_i$ -Ionen, sowohl mono- als auch divalent, an den Transporter und führen über Konformationsänderung des Transportproteins zur Aufnahme des  $P_i$  in die Zelle (MURER und BIBER 1997).

Die bestehende pH-Abhängigkeit beruht auf einer Konkurrenz der  $H^+$ -Ionen um die  $Na^+$ -Bindungsstellen, so daß eine Ansäuerung zur Hemmung des  $P_i$ -Transportes führt (MURER und BIBER 1997). Die Aktivität des  $Na^+/P_i$ -Cotransporters Typ II wird sowohl durch lipophile (Thyroxin, Vit.  $D_3$ , Glukokortikoide, Östradiol) Hormone als auch durch Peptidhormone (Insulin, JGF-1, GH, Calcitonin, ANP, EGF, TGF, PTH, PTHrP) beeinflusst (BERNDT und KNOX 1992, DOUSA 1996, KEMPSON 1996).

Wachstum und Entwicklung wie auch alimentäre Schwankungen in der P-Versorgung führen zu adaptiven Veränderungen in der renalen tubulären  $P_i$ -Resorption. Hierüber wird weiter unten berichtet.

### 2.2.1.2 Transzelluläre Mechanismen

Es wird angenommen, daß  $P_i$ -Anionen, die über die apikale Membran in die Zelle gelangen, sich mit dem cytosolischen  $P_i$ -Pool mischen und dabei auch mit den Stoffwechselprozessen wie z.B. der oxidativen Metabolisierung und Glykolyse interagieren können (MURER und BIBER 1992). Aufgrund der  $P_i$ -Konzentration von ca.  $1 \text{ mmol l}^{-1}$  (FREEMANN et al. 1983) ist die Annahme einer  $P_i$ -Diffusion durch die Zelle für den auftretenden  $P_i$ -Transport für sich allein ausreichend. So liegen auch keine Hinweise auf einen gesonderten Transportweg für  $P_i$  im Cytosol vor. Für intestinale Epithelzellen postulieren PETERLIK und WASSERMAN (1978) jedoch einen  $P_i$ -Transport durch die Zelle in sogenannten „Extrakompartimenten“. Auch NEMERE (1996a,b) beschreibt eine Beteiligung von Lysosomen am gerichteten  $P_i$ -Transport im Hühnerdarm, der durch Calcitriol stimuliert werden konnte.

### 2.2.1.3 Basolaterale Transportmechanismen

Die basolaterale Ausschleusung von  $P_i$  kann theoretisch entlang seines elektrochemischen Gradienten stattfinden. Über die möglichen Transportmechanismen ist bislang nur wenig bekannt. Basierend auf Untersuchungen an basolateralen Membranvesikeln aus Tubulusepithelien wurde ein  $\text{Na}^+$ -unabhängiger, DIDS-sensitiver Anionenaustauscher mit großer Kapazität postuliert (GRINSTEIN et al. 1980, HAGENBUCH und MURER 1986, SCHWAB und HAMMERMANN 1986, SCHWAB et al. 1984). Aber auch Hinweise auf ein  $\text{Na}^+$ -abhängiges  $P_i$ -Transportsystem mit niedriger Kapazität wurden erhalten (SCHWAB und HAMMERMANN 1986, SCHWAB et al. 1984) (siehe Abb. 2). Beides steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus Experimenten an OK-Zelllinien, die ebenfalls auf einen  $\text{Na}^+$ -unabhängigen DIDS-sensitiven und auf einen  $\text{Na}^+$ -abhängigen Transportweg schließen lassen (RHESKIN et al. 1990a,b), der in diesem Fall aber eine große Transportkapazität bei niedriger Affinität aufwies. Nach den bisherigen Befunden ist anzunehmen, daß sich die basolateralen Transportsysteme für  $P_i$  von denen der apikalen Membran unterscheiden.

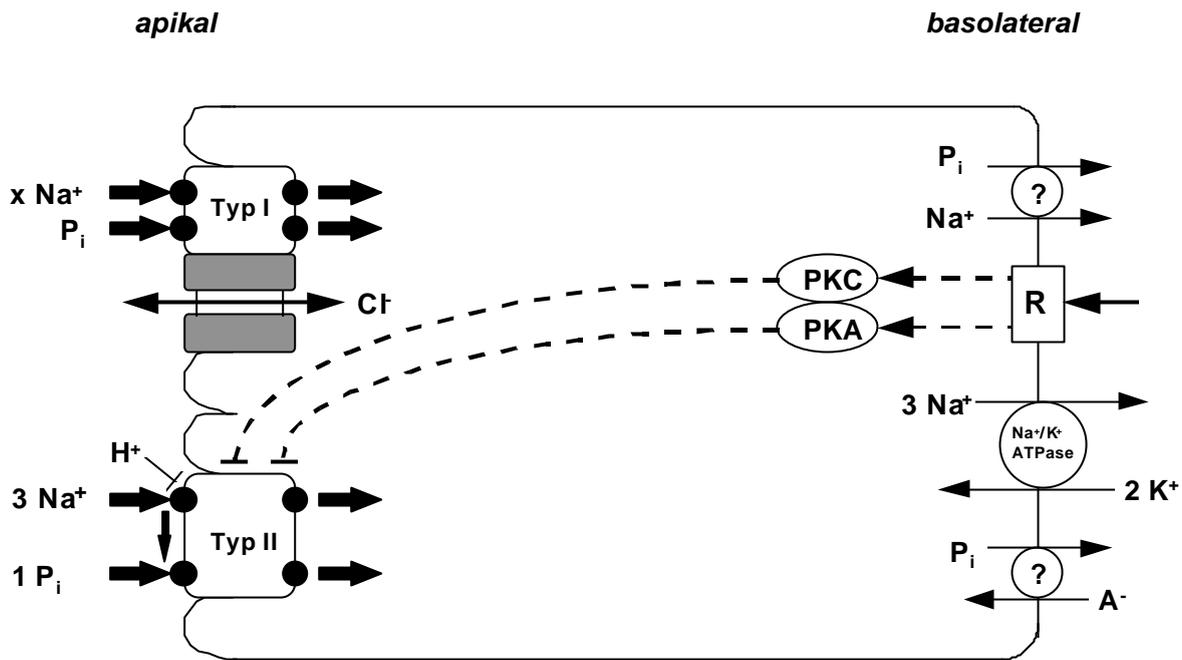


Abb.2 Schematische Darstellung nachgewiesener und postulierter Mechanismen des  $P_i$ -Transportes im proximalen Tubulus. (PKC = Phospholipase-C/Pro-teinkinase-C-System, PAK = Phospholipase-Adenylatcyclase/Protein-kinase-A-System)

## 2.2.2 Besondere strukturelle Aspekte des $Na^+/P_i$ -Cotransporters Typ II

Der  $Na^+/P_i$ -Cotransporter Typ II ist ein aus 637 Aminosäuren bestehendes Protein ( $\approx 69$  kDa) (MAGAGNIN et al. 1993). Ein Modell für die Sekundärstruktur (Abb. 3) wurde von den Ergebnissen eines Hydrophobizitätsplottes abgeleitet, der Hinweise auf 8 Membrandurchgänge lieferte. Außerdem weist der  $Na^+/P_i$ -Cotransporter einen hydrophilen N- sowie C-Terminus auf, die beide aus ungefähr 100 Aminosäuren bestehen (MURER und BIBER 1997). Untersuchungen mit Antikörpern, die gegen den N-Terminus gerichtet sind, deuten auf eine Lokalisation im Cytoplasma hin (LEVI et al. 1996). Die Lokalisation des C-Terminus wird ebenfalls im Cytoplasma vermutet.



## 2.3 Hormonelle Regulation

Verschiedene Untersuchungen an fetalen und neugeborenen Schafen zeigten, daß eine Infusion von PTH die renale  $P_i$ -Ausscheidung steigern konnte (ALEXANDER und NIXON 1969, SMITH et al. 1969, KOOH 1980, DAVICCO et al. 1992). Auch bei 2 Monate alten, mit Heu und Krafffutter gefütterten Lämmern, führte eine 96-stündige PTH-Infusion (200 ng/h/Tier) zu einer signifikanten Erhöhung der  $P_i$ -Ausscheidung (BARLET und CARE 1972).

Im Gegensatz dazu konnten ALEXANDER und NIXON (1969) bei erwachsenen Schafen nach einer PTH-Infusion keine Veränderung der renalen  $P_i$ -Ausscheidung beobachten. Auch CLARK et al. (1975) konnten den bei monogastrischen Spezies gut bekannten PTH-Effekt (siehe Abb. 2 und 4) bei wachen, nichttragenden oder -laktierenden Schafen nicht beobachten. Aus diesen Untersuchungen geht jedoch nichts über eine mögliche PTH-Wirkung in den einzelnen Tubulusabschnitten hervor.

Untersuchungen an monogastrischen Tieren zeigten eine große Heterogenität der Tubulusabschnitte in Bezug auf eine PTH-Wirkung. Mikropunktions- und Mikroperfusionsstudien zeigten, daß sowohl der hintere Teil des proximalen Konvoluts sowie die Pars recta die wichtigsten Orte der PTH-Modulation der  $P_i$ -Resorption sind (DENNIS et al. 1977, AMIEL et al. 1970, BECK und GOLDBERG 1974, KNOX und LECHENE 1975). PTH bindet an einen basolateral gelegenen Rezeptor (MURER und BIBER, 1992). Diese Bindung aktiviert sowohl das Adenylatcyclase/Proteinkinase-A-System als auch das Phospholipase-C/Proteinkinase-C-System (siehe auch Abb. 2). Eine direkte Aktivierung einer der beiden Kinasen verursacht dann die Inhibierung des  $Na^+/P_i$ -Cotransports, der die  $P_i$ -Aufnahme aus dem Tubuluslumen bewirkt (DUNLAY und HRUSKA, 1990). Dieser Mechanismus wird weiter unten näher erläutert. Bis jetzt ist noch unklar, ob unterschiedliche Subpopulationen von PTH-Rezeptoren mit den beiden intrazellulären Signalübertragungswegen gekoppelt sind. Untersuchungen von HAMMERMAN und HRUSKA (1982) und RHESHKIN et al. (1990a,b,c) zeigten, daß Phosphorylierungsvorgänge bei der Wirkung von PTH eine Rolle spielten. Bislang ist jedoch nicht geklärt, ob es zu einer direkten Phosphorylierung des  $Na^+/P_i$ -Cotransporters kommt. Aber möglicherweise ist die Phosphorylierung ein Signal für

die als Folge der PTH-Wirkung stattfindende endozytotische Internalisierung. Das führt zu einer verminderten Präsenz des Transporters in der apikalen Membran der Tubulusepithelzellen (LEVI et al. 1996).

Untersuchungen an alimentär P-depletierten Schafen zeigten, daß eine Hypophosphatämie nicht zu einem Anstieg des Plasma-Calcitriol-Spiegels führte (ABDEL-HAFEEZ et al. 1982, BREVES et al. 1985, MAUNDER et al. 1986). Dies läßt darauf schließen, daß Calcitriol beim Wiederkäuer zumindest unter diesen Fütterungsbedingungen nicht die Rolle in der Regulation des Phosphathaushaltes spielt, wie unter vergleichbaren Voraussetzungen bei monogastrischen Tieren (siehe Abb. 4). Fällt beim monogastrischen Tier die  $P_i$ -Plasmakonzentration auf zu niedrige Werte ab, so wird die renale Biosynthese von Calcitriol stimuliert, was zu einer Erhöhung der Plasma-Calcitriol-Spiegel führt (HUGES et al. 1975, FOX und ROSS 1985, BREVES und SCHRÖDER 1991, SCHRÖDER und BREVES 1993). Calcitriol vermindert die  $P_i$ -Exkretion über die Niere (PUSCHETT et al. 1972, COSTANZO et al. 1974) und schwächt den phosphatdiuretischen Effekt von PTH und Calcitonin ab (BERNDT und KNOX 1992). In Untersuchungen an OK-Zellen konnte gezeigt werden, daß dieser antagonistische Effekt von Calcitriol gegenüber PTH auf einer Inhibierung des durch PTH aktivierten Adenylatcyclase/cAMP-Systems beruht (WALD et al. 1998).

Calcitonin-Mangel vermindert die renale  $P_i$ -Exkretion (MATSUI et al. 1983). Auch BARLET (1972) konnte einen Effekt von Calcitonin auf die renale  $P_i$ -Ausscheidung von Schafen beobachten. Er infundierte Schafe über 96 h mit Calcitonin und beobachtete eine signifikante Zunahme der renalen  $P_i$ -Exkretion.

Verschiedene Untersuchungen eines gleichzeitigen Mangels an Calcitonin und PTH auf die renale  $P_i$ -Exkretion führten zu unterschiedlichen Ergebnissen. SYMONDS (1970) beobachtete eine reduzierte renale  $P_i$ -Ausscheidung, MATSUI et al. (1983) konnten diese Beobachtungen jedoch nicht bestätigen.

Auch bei monogastrischen Tieren führte die Gabe von pharmakologischen Dosen Calcitonins zu einer gesteigerten  $P_i$ -Exkretion über die Niere. Dieser Effekt war zum Teil PTH-unabhängig (BERNDT und KNOX 1992).

In Untersuchungen an monogastrischen Tieren konnten für zahlreiche weitere Hormone Einflüsse auf die renale  $P_i$ -Exkretion gezeigt werden. Glucocorticoide, PTHrP, TGF, EGF und atriales natriuretisches Hormon steigerten die  $P_i$ -Exkretion, während Wachstumshormone, IGF1, die Schilddrüsenhormone  $T_3/T_4$  und Insulin die  $P_i$ -Exkretion verminderten (BERNDT und KNOX 1992, KEMPSON 1996).

Die physiologische Bedeutung dieser Effekte ist bislang allerdings nicht klar.

## **2.4 Einfluß der alimentären P-Versorgung auf die Expression des $Na^+/P_i$ -Cotransporters Typ II**

Es kann heute als gesichert angesehen werden, daß das Ausmaß der  $Na^+/P_i$ -Cotransporter Typ II Expression in den Nierentubuli bei monogastrischen Spezies in direktem Zusammenhang mit der Höhe der alimentären P-Versorgung steht (BIBER et al. 1993, VERRI et al. 1995). Unklar ist bislang, wie dieser Anpassungsvorgang auf epithelialer Ebene reguliert wird.

Untersuchungen an P-depletierten, monogastrischen Tieren ergaben eine gesteigerte  $P_i$ -Resorption im proximalen Tubulus (BRAZY et al. 1980b, MULRONEY und HARAMATI 1990). Der gesteigerte  $Na^+/P_i$ -Cotransport resultierte aus einer erhöhten maximalen Transportkapazität und beruht nicht auf einer veränderten Affinität des Transportsystems für  $Na^+$ - oder  $P_i$ -Ionen. Bei hohen  $P_i$ -gehalten im Futter kam es dagegen zum umgekehrten Effekt (KEMPSON und DOUSA 1979, BARRETT et al. 1980, HRUSKA und HAMMERMAN 1981, LEVINE et al. 1983, BRUNETTE et al. 1984, CHENG et al. 1983, CAVERZASIO et al. 1987, LEVI et al. 1990, SHIRAZI-BEECHEY et al. 1996).

Ein Teil dieses Phänomens ist unabhängig von extrarenalen Faktoren wie z.B. PTH, Vitamin  $D_3$ , Plasmacalcium oder Wachstumshormon (MURER und BIBER 1992) (siehe Abb. 4).

Auch in Zellkulturen, die auf einem Nährmedium mit niedrigem P-Gehalt wuchsen, war diese Adaptation zu beobachten (BIBER et al. 1988, CAVERZASIO et al. 1985, HELPS und McGIVAN 1991).

LÖTSCHER et al. (1996) konnten mit Hilfe von Transportuntersuchungen, Western- und Northern-Blot-Analysen zeigen, daß eine Adaptation an einen chronischen P-Mangel durch Anstieg der  $\text{Na}^+/\text{P}_i$ -Cotransportaktivität und Zunahme der spezifischen mRNA und des korrespondierenden Proteins charakterisiert wird. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß sowohl auf der Ebene der Transkription als auch der Translation lokalisierte Mechanismen für diese Adaptation eine Rolle spielen. So führt die Inhibierung von Transkriptionsvorgängen durch Actinomycin D oder die Inhibierung der Neusynthese von Proteinen durch Cycloheximid dazu, daß ein Anstieg der  $\text{Na}^+/\text{P}_i$ -Cotransporteraktivität als Folge eines P-Mangels verhindert wurde (CAVERZASIO et al. 1985, BIBER und MURER 1985, SHAH et al. 1979).

Bei Ratten mit einem akuten (2stündigen) P-Mangel konnten LÖTSCHER et al. (1996) mit Hilfe von Western- und Northern-Blot-Analysen und immunohistochemischen Untersuchungen zeigen, daß dieser akute P-Mangel zu gesteigerter  $\text{Na}^+/\text{P}_i$ -Cotransportaktivität führte, die mit einer erhöhten  $\text{Na}^+/\text{P}_i$ -Cotransporter Typ II-Proteinmenge korreliert war. Jedoch konnte keine Veränderung der erhöhten  $\text{Na}^+/\text{P}_i$ -Cotransporter Typ II-mRNA-Menge beobachtet werden. Das bedeutet, daß die schnelle Stimulation des  $\text{Na}^+/\text{P}_i$ -Cotransportes durch posttranslationale Mechanismen vermittelt wird. Nach Zerstörung der Mikrotubuli des Zytoskeletts mit Colchicin konnte keine akute Adaptation mehr stattfinden (LÖTSCHER et al. 1996, MARKOVICH et al. 1995). Daraus läßt sich schließen, daß der Prozeß der Adaptation an akuten P-Mangel auf einer schnellen, mikrotubuliabhängigen Translokation des  $\text{Na}^+/\text{P}_i$ -Cotransporter Typ II-Proteins von intrazellulären Kompartimenten in die apikale Membran basiert.

Eine akute Überversorgung von Ratten mit  $\text{P}_i$  führte zu einer Abnahme der  $\text{Na}^+/\text{P}_i$ -Cotransportaktivität und  $\text{Na}^+/\text{P}_i$ -Cotransporter Typ II-Proteinmenge ohne Veränderung der  $\text{Na}^+/\text{P}_i$ -Cotransporter Typ II-mRNA-Menge (LÖTSCHER et al. 1996). Dies legt die Vermutung nahe, daß die schnelle Abnahme der Transportaktivität durch posttranslationale Mechanismen, wie z.B. endozytotische Internalisation der Transporter aus der apikalen Membran in intrazelluläre Kompartimente, vermittelt wird. PTH scheint in dieser Reaktion auf eine akute P-Überversorgung keine Rolle zu spielen (LÖTSCHER et al. 1996). Experimente zur Rolle der Mikrotubuli zeigten, daß ihnen in diesem endozytotischen Prozeß im Gegensatz zum apikalen Einbau der Transporter keine bedeutende Rolle zukommt (LÖTSCHER et al. 1996).

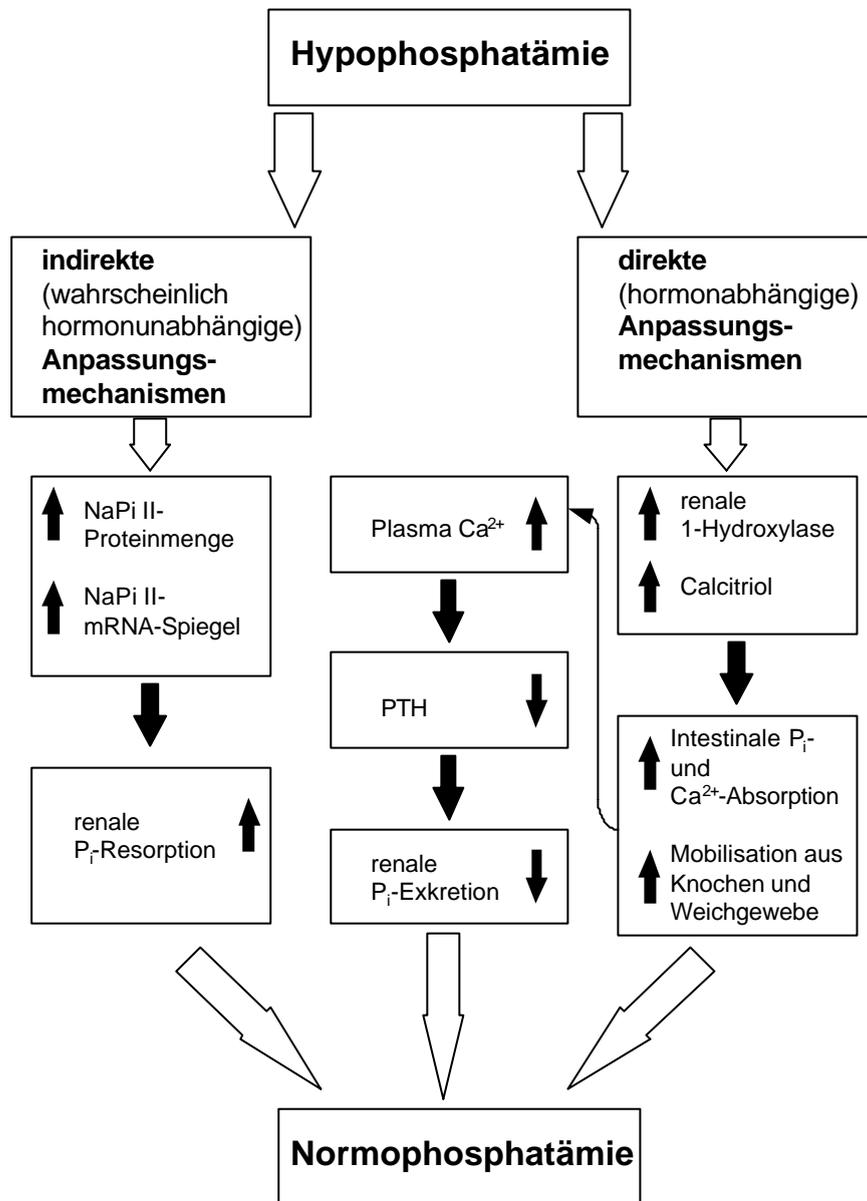


Abb.4 Zusammenfassung der Anpassungsmechanismen monogastrischer Tiere zur Aufrechterhaltung der P-Homöostase bei Hypophosphatämie.

Während die  $P_i$ -Transportsysteme und ihre Regulation beim monogastrischen Tier bereits gut charakterisiert sind, liegen für Wiederkäuerspezies bislang nur wenige Untersuchungen vor. Daher gilt das Interesse der vorliegenden Arbeit den kinetischen Eigenschaften des renalen  $P_i$ -Transportsystems von Wiederkäuern, dem Einfluß einer P- oder Ca-Depletion auf dieses  $P_i$ -Transportsystem und den möglichen Unterschieden in der molekularen Struktur.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Versuchstiere, Fütterung und Gewebeentnahme**

Zur Charakterisierung der  $P_i$ -Aufnahme in die renale Bürstensaummembran und zur Untersuchung der Auswirkungen einer experimentellen Ca- oder P-Depletion auf den Transportmechanismus, standen Nierencortices von 24 Ziegenböcken der Rasse „Weiße Deutsche Edelziege“ zur Verfügung, die aus der Zucht des Instituts für Tierernährung der Universität Bonn stammten.

Die Tiere wurden nach dem Absetzen in 3 Fütterungsgruppen eingeteilt: eine Kontrollgruppe mit bedarfsgerechter Ca- und P-Versorgung (+Ca/+P) und je eine Gruppe mit reduzierter Ca- oder P-Versorgung (+Ca/-P und -Ca/+P). Die Fütterung mit Kraftfutter und Strohhacksel erfolgte kontrolliert über 9-12 Wochen.

Bei der Schlachtung wogen die Ziegenböcke durchschnittlich 23 kg und waren 4-5 Monate alt.

Sie wurden durch Bolzenschuß betäubt und anschließend durch Öffnen der Arteriae carotides communes entblutet. Danach wurde die Bauchhöhle eröffnet, die Nieren entnommen, die Cortices sofort abgesetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Nierenpräparate wurden bis zur Aufarbeitung bei -70°C aufbewahrt. Im Mittel betrug die Dauer zwischen Entbluten und Einfrieren des Gewebes 4 min.

Außerdem standen 6 Schaflämmer zur Verfügung, die in 2 Fütterungsgruppen eingeteilt wurden, eine Kontrollgruppe mit bedarfsgerechter P-Versorgung (+P) und eine Gruppe mit reduzierter P-Versorgung (-P). Die Tiere wurden über 6 Wochen kontrolliert mit Kraftfutter und Strohhacksel gefüttert. Die Schlachtung und Probenentnahme erfolgte wie bei den Ziegen.

Des Weiteren wurden die Nieren von 3 mit handelsüblichem Ferkelfutter gefütterten, 6-8 Wochen alten Ferkeln auf die gleiche Weise entnommen und aufgearbeitet.

Tab.2 Zusammensetzung der Versuchsrationen (g/kgT)

*(Weender Futtermittel-Analyse: Institut für Tierernährung, Tierärztliche Hochschule Hannover)*

<b>Komponente</b>	<b>+Ca/+P</b>	<b>+Ca/-P</b>	<b>-Ca/+P</b>
<b>Trockensubstanz</b>	885,9	896,2	928,7
<b>Rohasche</b>	49,4	41,1	40,8
<b>Rohprotein</b>	163,7	158,6	165,6
<b>Rohfett</b>	17,3	15,9	17,5
<b>Rohfaser</b>	51,3	42,4	50,7
<b>N-freie Extraktstoffe</b>	604,2	638,2	654,1
<b>Calcium</b>	11,3	10,9	5,3
<b>Phosphor</b>	3,3	1,4	3,5

### 3.2 Präparation der Bürstensaummembranvesikel

Die Präparation der Bürstensaummembranvesikel wurde nach der von HILDEN et al. (1989) beschriebenen und von PENNY (1991) modifizierten  $Mg^{2+}$ -EDTA-Präzipitationsmethode durchgeführt.

In Gegenwart der bivalenten Magnesiumionen werden die Membranfragmente in Abhängigkeit von ihren Oberflächenladungen in unterschiedlichem Maße aggregiert. Durch die sich anschließende Differentialzentrifugation kann die Bürstensaummembranfraktion von schwereren Zellorganellen separiert und gegenüber anderen Membranen wie z.B. vom Golgi-Apparat oder der basolateralen Zellseite angereichert werden.

Die gesamte Präparation erfolgte bei einer Temperatur von 4°C.

Zusammensetzung der bei der Vesikelpräparation verwendeten Puffer:

Homogenisierungspuffer 1:	300	$mmol\ l^{-1}$	Mannit
	1	$mmol\ l^{-1}$	EDTA
	0,1	$mmol\ l^{-1}$	PMSF
	20	$mmol\ l^{-1}$	MES/Tris, pH 6.0
Homogenisierungspuffer 2:	300	$mmol\ l^{-1}$	Mannit
	1	$mmol\ l^{-1}$	EDTA
	0,1	$mmol\ l^{-1}$	PMSF
	20	$mmol\ l^{-1}$	HEPES/Tris, pH 7.5
Vesikelpuffer:	100	$mmol\ l^{-1}$	Mannit
	100	$mmol\ l^{-1}$	KCl
	20	$mmol\ l^{-1}$	HEPES/Tris, pH 7.4

Zu Beginn der Präparation wurden ca. 20 g des bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefrorenen Nierencortex eingewogen und in 100 ml Homogenisierungspuffer 1 aufgetaut. Anschließend wurde der Nierencortex zusammen mit dem Puffer (auf Eis)  $3 \times 10$  s mit dem Ultraturrax (Heidolph DIAX 900, Stufe 5) zerkleinert (nach jedem Schritt 30 s Pause). Danach wurde der Schaum mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Aus dem entstandenen Homogenat wurden  $4 \times 250$   $\mu\text{l}$  entnommen und zur Enzym- und Proteinbestimmung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Entsprechend dem Homogenatsvolumen wurde soviel einer 2,5 molaren  $\text{MgCl}_2$ -Stammlösung zugegeben, daß die Endkonzentration  $10 \text{ mmol l}^{-1}$  betrug und das Ganze 20 min langsam auf Eis gerührt. Anschließend wurde das Homogenat in GSA-Rotor-Gefäßen 10 min bei  $1993 \text{ g}$  ( $r_{\text{max}}$ ; entspr. 3500 rpm) zentrifugiert (Sorvall RC-5B) und das entstandene Pellet verworfen. Mit dem Überstand wurde die Zentrifugation 6-7x wiederholt, bis sich kein sichtbares Pellet mehr bildete. Der Überstand wurde nun 30 min bei  $34540 \text{ g}$  ( $r_{\text{max}}$ ; entspr. 1700 rpm) im SS 34 Rotor (Sorvall RC-5B) zentrifugiert, das Pellet in 35 ml Homogenisierungspuffer 2 resuspendiert und mit einem Elvehjem-Potter (Braun, Melsungen) homogenisiert (10 Schübe, 1500 rpm). Es schloß sich eine 30-minütige Zentrifugation bei  $34540 \text{ g}$  ( $r_{\text{max}}$ ; entspr. 17000 rpm) im SS34 Rotor an. Das entstandene Pellet wurde in 1,5 ml Vesikelpuffer aufgenommen und durch eine 1 ml Spritze mit  $0,45 \times 12 \text{ mm}$  Kanüle 10-15x aufgezogen bis eine Suspension entstand. Hieraus wurden  $4 \times 100$   $\mu\text{l}$  Proben für die Enzym- und Proteinbestimmungen entnommen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die restliche Vesikelsuspension wurde portionsweise in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zu den Aufnahmestudien darin aufbewahrt.

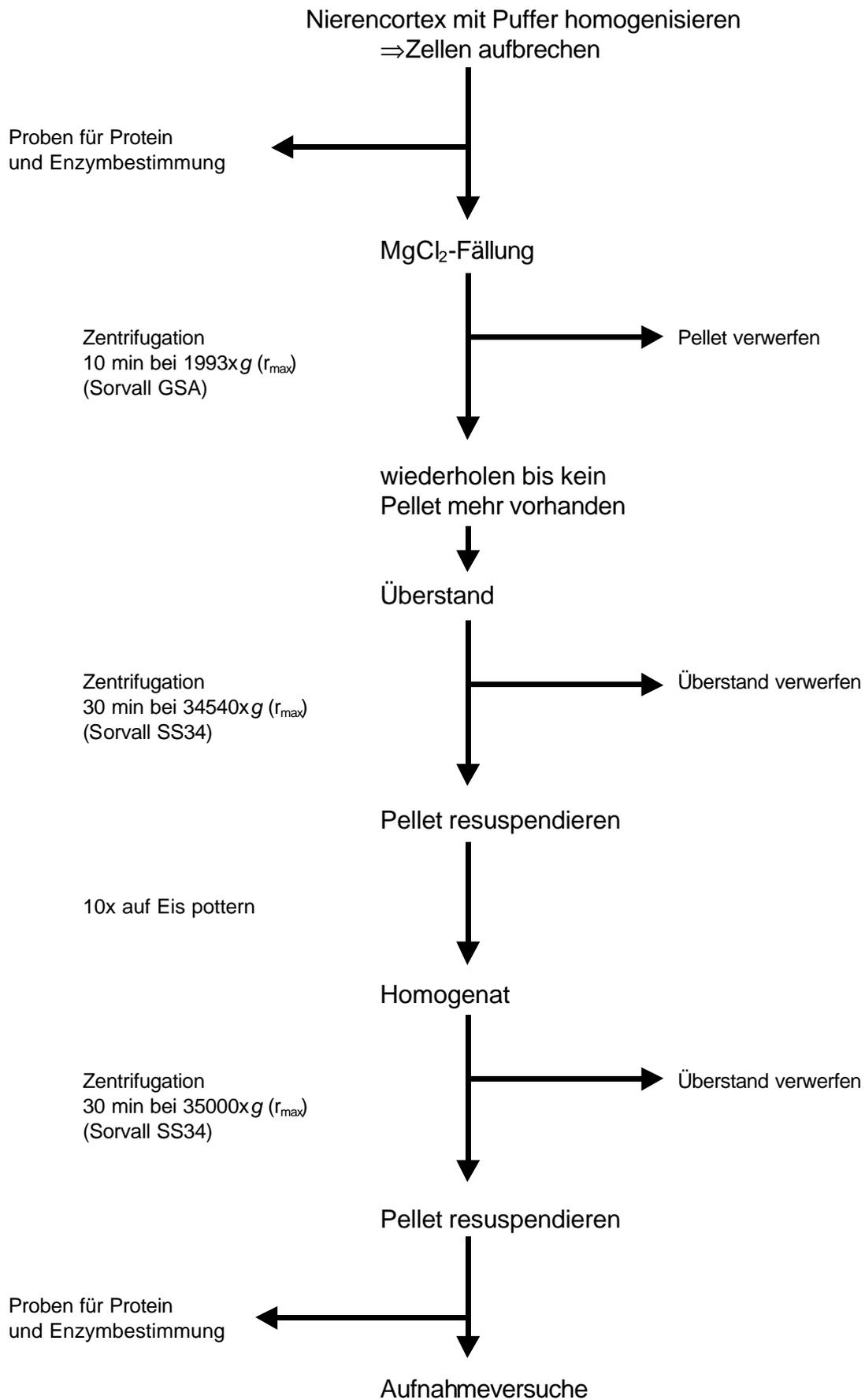


Abb. 5 Fließschema zur Präparation von renalen BSMV

### **3.3 Transportuntersuchungen**

#### **3.3.1 Schnellfiltrationstechnik**

Die Transportuntersuchungen wurden allgemein nach folgendem Schema durchgeführt: Um die Substrataufnahme zu starten, wurden 20 µl der Vesikelsuspension zu 80 µl des Inkubationspuffers gegeben und die dem Versuchsansatz entsprechende Zeit inkubiert. Die Zusammensetzung der Inkubationspuffer ist unter 3.3.2 beschrieben.

Die Substrataufnahme wurde durch Zugabe von 4 ml einer 4°C kalten Stopplösung (150 mM KCl, 10 mM HEPES-Tris, 1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4) abgebrochen. Die Vesikel wurden mit Hilfe der Schnellfiltration von der Lösung getrennt und die auf dem Filter (Cellulose-Nitrat, Porengröße 0,65 µm, Sartorius, Göttingen) verbliebenen Vesikel mit 2 mal je 5 ml eiskalter Stopplösung nachgewaschen.

Der Filter wurde zusammen mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold, Packard) in Minivials gegeben und die Aktivität 10 min in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (2000 CA Tri-Carb Liquid Scintillation Analyzer, United Technologies Packard) mit einem Zählfehler von max. 2 % bestimmt.

Zur Bestimmung der Leerwerte wurden zu 80 µl Inkubationspuffer 4 ml Stopplösung gegeben, wie oben beschrieben, abfiltriert und die auf dem Filter verbliebene Radioaktivität gemessen.

Um die Gesamtaktivität im einzelnen Ansatz zu bestimmen, wurden jeweils 80 µl des Inkubationspuffers direkt in die Szintillatorflüssigkeit pipettiert und anschließend gezählt.

#### **3.3.2 Bei den Messungen zur Phosphataufnahme verwendete Inkubationsansätze**

Die Versuche zur Messung der Phosphataufnahme wurden als 3- oder 4-facher Ansatz durchgeführt. Die  $^{32}\text{P}$ -Radioaktivität betrug jeweils 1µCi/100µl Ansatz. Es wurde  $^{32}\text{P}$  als ortho-Phosphat der Firma Du Pont de Nemours, Dreieich verwendet. Vor jedem Versuch wurde die entsprechend mit unmarkiertem Phosphat gemischte

$^{32}\text{P}[\text{P}_i]$ -Lösung durch Millex-GS-Filter (0.22  $\mu\text{m}$  Porengröße) der Firma Millipore, Mosheim, sterilfiltriert, um die unspezifische Bindung an die Filter zu verringern.

Die unspezifische Bindung lag stets unter 0,2 % der Gesamtaktivität im entsprechenden Ansatz.

#### **a.) Zeitabhängige Phosphataufnahme**

Die Versuche zur zeitabhängigen Phosphataufnahme wurden bei den langen Inkubationszeiten (5 s - 180 min) bei 37°C, die schnellen Aufnahmen mit 5 - 25 s Inkubationszeit wurden bei 25°C durchgeführt. Die Inkubationspuffer setzten sich aus 100  $\text{mmol l}^{-1}$  NaCl bzw. 100  $\text{mmol l}^{-1}$  KCl, 100  $\text{mmol l}^{-1}$  Mannit, 10  $\text{mmol l}^{-1}$  HEPES-Tris, pH7,4 und 0,1  $\text{mmol l}^{-1}$   $^{32}\text{P}[\text{P}_i]$  zusammen.

#### **b.) Kinetik der Phosphataufnahme**

Die Versuche zur Kinetik der Phosphataufnahme wurden bei einer Temperatur von 21°C und einer Inkubationszeit von 10 s durchgeführt. Die Inkubationspuffer bestanden aus 100  $\text{mmol l}^{-1}$  NaCl bzw. 100  $\text{mmol l}^{-1}$  KCl, 100  $\text{mmol l}^{-1}$  Mannit, 10  $\text{mmol l}^{-1}$  HEPES-Tris, pH7,4 und steigenden  $^{32}\text{P}[\text{P}_i]$  Konzentrationen (0-3  $\text{mmol l}^{-1}$ ).

#### **c.) Einfluß von $\text{Na}^+$ auf die $\text{P}_i$ -Aufnahme**

Der Einfluß von  $\text{Na}^+$  auf die  $\text{P}_i$ -Aufnahme wurde bei einer Temperatur von 21°C und einer Inkubationszeit von 10 s überprüft. Die Inkubationspuffer bestanden aus 100  $\text{mmol l}^{-1}$  Mannit, 10  $\text{mmol l}^{-1}$  HEPES-Tris, pH7,4 und einer steigenden  $\text{Na}^+$  Konzentration (0-100  $\text{mmol l}^{-1}$ ), die jeweils mit entsprechender KCl-Zugabe auf die Gesamtkonzentration von 100  $\text{mmol l}^{-1}$  für beide Salze eingestellt wurde, sowie 0,1  $\text{mmol l}^{-1}$   $^{32}\text{P}[\text{P}_i]$ .

#### **d.) Glucoseaufnahme**

Die Na<sup>+</sup>-abhängige Glucoseaufnahme wurde bei einer Temperatur von 21°C und einer Inkubationszeit von 30 s gemessen. Die Inkubationspuffer setzten sich aus 100 mmol l<sup>-1</sup> NaCl bzw. 100 mmol l<sup>-1</sup> KCl, 100 mmol l<sup>-1</sup> Mannit, 10 mmol l<sup>-1</sup> HEPES-Tris, pH 7,4 und 0,5 mmol l<sup>-1</sup> Glucose/<sup>3</sup>H-Glucose zusammen. Die <sup>3</sup>H-Radioaktivität betrug jeweils 1 µCi/100 ml Puffer. Es wurde D-[1-<sup>3</sup>H (N)]-Glucose der Firma Du Pont de Nemours, Dreieich verwendet. Die unspezifische Bindung lag stets unter 0,2 % der Gesamtaktivität im Puffer.

### **3.4 Protein- und Enzymbestimmungen**

#### **3.4.1 Proteinbestimmung**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration im Ausgangshomogenat und in der Vesikelsuspension erfolgte mit Hilfe eines Standardassays der Firma Bio Rad, München.

Das Meßprinzip beruht auf einer Änderung des Absorptionsmaximums einer sauren Lösung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G250 von 465 nm auf 595 nm nach Bindung an das Protein. Das als Kation vorliegende rote Farbmolekül wird durch die Bindung an das Protein als Anion stabilisiert und nimmt eine blaue Farbe an. Die Menge des gebildeten blauen Farbstoffs wird bei 595 nm photometrisch bestimmt.

Die Eichkurve wurde mit bovinem  $\gamma$ -Globulin als Standard erstellt.

Um alle Proteinbindungsstellen für das Farbreagenz zugänglich zu machen, wurden je 100 µl oberflächenaktive 1 %ige Saponinlösung zu 100 µl Probe bzw. Standard gegeben und bei Raumtemperatur 20 min vorinkubiert. Anschließend wurden 5 ml des entsprechend verdünnten Farbreagenz zugesetzt und vor der photometrischen Messung nochmals 20 min inkubiert.

### **3.4.2 Aktivität der alkalischen Phosphatase (AP)**

Die Aktivität der alkalischen Phosphatase wurde photometrisch bestimmt. Hierzu wurden bei Raumtemperatur 50 µl Probe mit 3 ml Reagenz (1 mmol<sup>-1</sup> Diethanolamin, 0,5 mmol<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, pH 9,8 mit 10 mmol<sup>-1</sup> Natrium-p-Nitrophenolphosphat) 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-Nitrophenol und Phosphat durch die alkalische Phosphatase. Die Menge an entstehendem p-Nitrophenol ist proportional zur Phosphatase-Aktivität.

### **3.4.3 Aktivität der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase**

Die Aktivität der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase wurde mit einer von MIRCHEFF und WRIGHT 1971 beschriebenen Methode als Differenz der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase-Aktivität mit und ohne Ouabainzusatz (5 mg Ouabain/ml Inkubationsmedium) photometrisch bestimmt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf einer spezifischen Hemmung der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase durch Ouabain.

Dafür wurden 20 µl Probe mit 0,5 ml Inkubationspuffer (5 mmol<sup>-1</sup> MgCl, 100 mmol<sup>-1</sup> NaCl, 10 mmol<sup>-1</sup> KCl, 2 mmol<sup>-1</sup> ATP, 3 mmol<sup>-1</sup> EDTA, 100 mmol<sup>-1</sup> Tris/HCl, pH 7,4) gegeben und bei 37°C für 30 min inkubiert. Die Reaktion wurde mit 0,5 ml 5%iger Trichloressigsäure gestoppt und die Meßansätze für 30 min mit je 1 ml Farbreagenz (40 mg FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O/ml 1%igem Ammoniumheptamolybdat in 1,15 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) bei Raumtemperatur inkubiert.

Das frei werdende anorganische Phosphat bildet mit Molybdat in saurer Lösung komplexe Phosphomolybdänsäure die zu Molybdänblau reduziert wird. Die Extinktion dieses blauen Farbkomplexes kann bei einer Wellenlänge von 690 nm photometrisch bestimmt werden.

### **3.5 Plasmaanalytik**

Allen Versuchstieren wurde am Tag vor der Schlachtung Blut entnommen. Die Blutentnahme erfolgte aus der Vena jugularis externa mit Lithium-Heparin Monovetten (Sarstedt, Nümbrecht). Das Blut wurde sofort bei 1500xg für 20 min zentrifugiert und das gewonnene Plasma bis zur Analyse bei -20°C tiefgefroren.

#### **3.5.1 Calcium**

Die Ca-Konzentrationen im Plasma wurden mittels der o-Kresolphtalein-Komplex-Methode bestimmt (RAY SARKER und CHAUHAN 1967).

Calcium reagiert in alkalischer Lösung mit o-Kresolphtalein unter Bildung eines violetten Farbkomplexes der photometrisch bei 570 nm erfaßt wird, wobei die Farbintensität proportional zur Calciumkonzentration in der Plasmaprobe ist.

#### **3.5.2 Anorganisches Phosphat**

Die Bestimmung der  $P_i$ -Konzentration im Plasma erfolgte mittels der Molybdat/Vanadat-Reaktion (PETER 1982) photometrisch.

Ammonium-Molybdat und Ammonium-Vanadat bilden einen gelben Farbkomplex, der bei einer Wellenlänge von 405 nm photometrisch gemessen werden kann. Die Farbintensität verhält sich proportional zur  $P_i$ -Konzentration.

### **3.6 Berechnungen**

#### **3.6.1 Aufnahmeraten**

Die Aufnahmeraten [nmol/mg Protein] für Phosphat und Glucose in die BSMV wurden nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{(\text{cpmP} - \text{cpmL}) \cdot [\text{s}] (\text{nmol/l})}{\text{cpmT} \cdot [\text{Protein}] (\text{mg/l})} = \frac{[\text{s}] (\text{nmol})}{\text{Protein} (\text{mg})}$$

cpmP = cpm in der Probe

cpmL = cpm im Leerwert

cpmT = Gesamtaktivität (cpm) im Ansatz

[s] = Konzentration des Phosphats

### 3.6.2 Vesikelvolumen

Das Vesikelvolumen wurde aus der Phosphataufnahme in die BSMV nach 180 min (Ausgleichswert, d.h. die intra- und extravesikuläre Phosphatkonzentrationen sind gleich) folgendermaßen berechnet:

I. Vesikelvolumen im entnommenen Aliquot

$$\frac{(\text{cpmP} - \text{cpmL})}{\text{cpmT}} \cdot \text{Aliquotvolumen} (\mu\text{l}) = \text{Vesikelvolumen} (\mu\text{l})$$

II. Proteinkonzentration im Ansatz

$$\frac{\text{Proteinkonzentration in der Vesikelfraktion} (\text{mg/ml}) \cdot \text{Vesikelmenge} (\text{ml})}{\text{Gesamtvolumen des Ansatzes} (\text{ml})} = \frac{\text{Protein} (\text{mg})}{\text{Ansatz} (\text{ml})}$$

III. Protein im entnommenen Aliquot

$$\text{Proteinkonzentration im Ansatz} (\text{mg/ml}) \cdot \text{Ansatz} (\text{ml}) = \text{Protein} (\text{mg})$$

#### IV. Vesikelvolumen je mg Protein

$$\frac{\text{Vesikelvolumen im Ansatz } (\mu\text{l})}{\text{Gesamtprotein im Ansatz (mg)}} = \frac{\text{Vesikelvolumen } (\mu\text{l})}{\text{Protein (mg)}}$$

### **3.7 Isolierung von RNA**

Die Gewebeentnahme für die RNA-Isolierung erfolgte unmittelbar nach der Schlachtung. Das Gewebe wurde sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Aufarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur Isolierung von RNA wurde gefrorenes Nierengewebe in einem vorgekühlten Mörser unter Zugabe von flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver gemahlen.

Die RNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe des Micro-RNA-Isolations-Kit von Stratagene, Heidelberg nach Anleitung des Herstellers.

Die Zugabe von Guanidiniumisothiocyanat (GTC) führt zu einer Protein-Denaturierung, anschließend erfolgt eine Phenol/Chloroformextraktion. Proteine und DNA sammeln sich durch die gewählten Extraktionsbedingungen in der Schicht zwischen den Phasen und der unteren organischen Phase, während die RNA in der oberen wässrigen Phase zurückbleibt. Aus dieser Phase kann sie dann mit Hilfe von Isopropanol ausgefällt werden. Nach Waschen des Pellets mit 75 %igem eiskalten Ethanol wurde dieses getrocknet und in RNase freiem Wasser aufgenommen.

Die RNA-Probe wurde photometrisch quantifiziert (260/280 nm) und die Qualität der RNA mittels Gelelektrophorese (Formamid/Agarose) überprüft.

### **3.8. Probenaufbereitung für die PCR**

#### **3.8.1. DNase-Verdau**

Um die isolierte RNA von möglichen Resten genomischer DNA zu befreien, wurde mit 100  $\mu\text{g}$  RNA ein DNase-Verdau durchgeführt. Hierzu wurde die Probe mit 0,5  $\mu\text{l}$

DNAse I (7,5 U/ $\mu$ l) der Firma Pharmacia Biotech Europe, Freiburg 10 min bei 37°C inkubiert. Daran schloß sich eine zweite Chloroform/Phenolfällung an.

### **3.8.2 Erststrang-Synthese**

Die Erststrang-Synthese, bei der ein zur mRNA komplementärer cDNA-Strang synthetisiert wird, wurde nach dem „MMLV reverse transcriptase first strand cDNA synthesis protocol“ von Amersham Life Science, Buckinghamshire, UK durchgeführt.

*Durchführung:*

DNA-freie RNA- Probe



*in 30  $\mu$ l sterilem Wasser gelöst*

10  $\mu$ l First strand buffer (x5), im Ansatz: x1



*3 min in 90°C heißem Wasser inkubiert,  
3 min in Eis abgekühlt*

2,5  $\mu$ l dNTP mix (je 10 mmol $l^{-1}$ ), im Ansatz: je 0,5 mmol

5,0  $\mu$ l Oligo-dT-primer (50 pmol $\mu$ l $^{-1}$ ), im Ansatz: 5 pmol

2,5  $\mu$ l Reverse Transkriptase (200 U/ $\mu$ l), im Ansatz: 10 Units



*für 1 h bei 37°C inkubiert*

RNA/DNA-Hybrid

Das erzeugte RNA/DNA-Hybrid wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

### **3.9 PCR (Polymerasen-Ketten-Reaktion)**

Die PCR ist eine Methode, bei der spezifische DNA-Sequenzen in vitro mit einer hohen Ausbeute amplifiziert werden können. Das Originalprotokoll wurde 1985 von SAIKI et al. beschrieben.

Für die Reaktion werden das DNA-Template, eine DNA-Polymerase, Desoxynucleotide, zwei spezifische Oligonucleotidprimer und geeignete Puffersysteme benötigt.

#### **3.9.1 Primer**

Zur Auswahl der Primer wurde ein Hydrophobizitätsplot mit der Aminosäure-Sequenz des renalen  $\text{Na}^+/\text{P}_i$ -Cotransporters Typ II der Ratte durchgeführt. Für die beiden Primer wurden entsprechende Nukleinsäuresequenzen aus den mutmaßlichen Membrandurchgängen M3 und M6 gewählt, da die Wahrscheinlichkeit für Sequenzhomologien in transmembranalen Bereichen am höchsten ist. Die Spezifität der Primer wurde mit Hilfe des über die GenBank (National Center for Biotechnology Information [NCBI], Bethesda, MD, USA) nutzbaren Computerprogramms BLAST überprüft, die Primer wurden bei der Firma Roth, Karlsruhe hergestellt.

5' > CGGAGTGRTGGCTGAGGTGA < 3' aus dem 6. Membrandurchgang

5' > 'ATGGTCTCCTCTGGCTTGTTG < 3' aus dem 3. Membrandurchgang

Abb.6 Sequenz der verwendeten Oligonucleotidprimer

#### **3.9.2 Reaktionsansatz und Durchführung der PCR**

Die PCR wurde mit einer hitzestabilen Taq-DNA-Polymerase der Firma Gibco(BRL) Life Technologies, Eggenstein durchgeführt.

Pipettierschema:(Molaritäten beziehen sich auf den Ansatz)

3 µl Template (Produkt der Erststrangsynthese)	
5 µl PCR-Puffer	1x
1,5 µl MgCl <sub>2</sub> (50 mmol l <sup>-1</sup> )	1,5mmol
1 µl eines dNTP-Mixes (je 10 mmol l <sup>-1</sup> )	je 0,2 mmol
1 µl Primer(20 pmol µl <sup>-1</sup> )	0,4 pmol
1 µl Primer (20 pmol µl <sup>-1</sup> )	0,4 pmol
0,5 µl hitzestabile Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)	2,5 Units
37 µl steriles Wasser	

Die Amplifizierung erfolgte nach folgendem Schema in einem Thermocycler (Mastercycler gradient Firma Eppendorf, Köln):

	94°C	4 min	
Denaturierung der Doppelstränge	94°C	1 min	} 30 Zyklen
Annealing des Primers	60°C	1 min	
Polymerisation	72°C	2 min	
Reaktionsende	72°C	10 min	

Die PCR-Ansätze wurden bei -20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

### 3.9.3 Detektion und Analyse der PCR-Produkte

Die entstandenen PCR-Produkte wurden mit Hilfe eines 1%igen Agarosegels und TAE-Puffer (1-fache Konzentration) elektrophoretisch aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht.

### **3.9.4 Extraktion der PCR-Produkte aus dem Agarosegel**

Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe des JETsorb-Kits (Genomed, Bad Oeynhausen) zur DNA-Extraktion aus dem Agarosegel wiedergewonnen.

Das Prinzip des Kits beruht auf der Anlagerung der DNA an die Glasteilchen der JETsorb-Suspension bei hohen Salzkonzentrationen. Durch niedrige Salzkonzentrationen kann die DNA wieder eluiert werden.

Der Überstand mit den eluierten PCR-Produkten wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert. Die Mengenabschätzung und die Kontrolle der Reinheit der eluierten DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe eines analytischen Agarosegels.

### **3.10 Sequenzierung der PCR-Produkte**

#### **3.10.1 Transformation von Zellen**

##### **3.10.1.1 Ligation der PCR-Produkte in einen Vektor**

Die PCR-Produkte wurden in den pGEM-T Vektor (Promega Corporation, Madison, USA) einkloniert. Der pGEM-Vektor besitzt an beiden Enden T-Überhänge, an die A-Überhänge der PCR-Produkte (Taq-Polymerase-spezifisch) ligiert werden können.

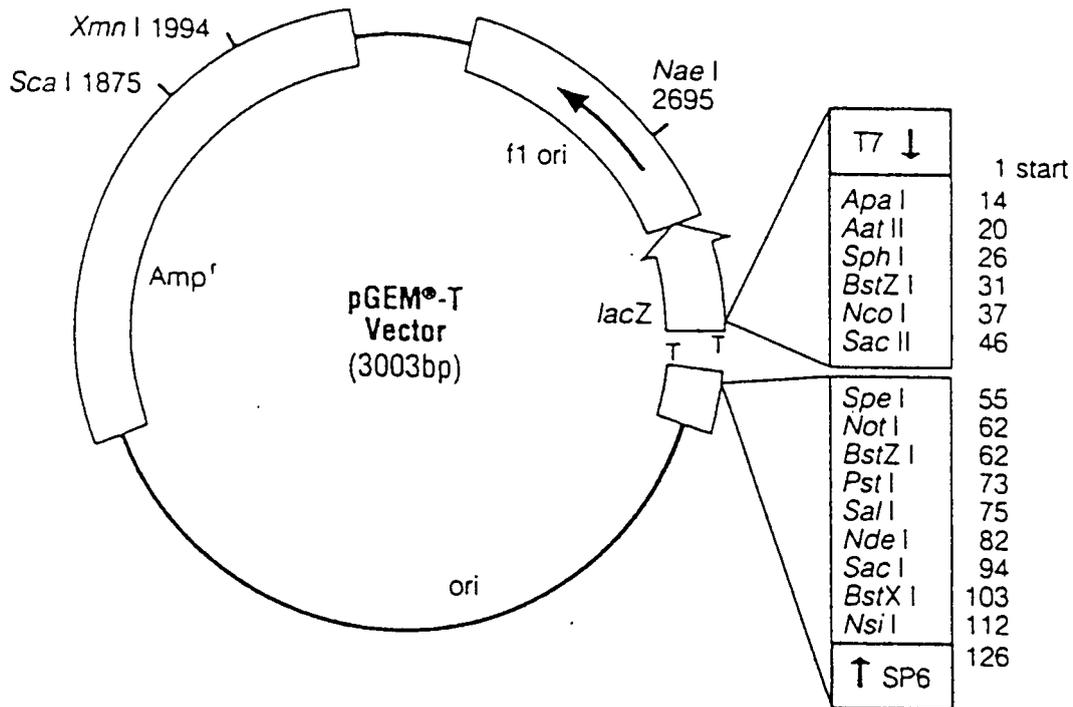


Abb.7 pGEM-T Vektor

Die einzusetzende Insertmenge wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Vektor ng} \times \text{Größe des Inserts kb} \times \text{Gewünschtes Verhältnis Insert:Vektor}}{\text{Größe des Vektors kb}} = \text{ng Insert}$$

Zur Durchführung der Ligation wurden 38,4 ng (Verhältnis Insert:Vektor 3:1) bzw. 76,8 ng (6:1) PCR-Produkt mit 50 ng Vektor, 1 µl T<sub>4</sub>DNA-Ligase-Puffer (x10), 1,5µl T<sub>4</sub>DNA-Ligase (3 Weiss Units /µl) und 4,5 µl Wasser über Nacht bei 4°C inkubiert. Der Ligationsansatz wurde zur Transformation von JM 109-Zellen verwendet. Da die zur Insertion benutzte multiple cloning site des Vektors die codierende Sequenz für die β-Galaktosidase bei Insertion unterbricht, können die Transformanten mit insertiertem Plasmid über eine Blau-Weiß-Selektion identifiziert werden.

### 3.10.1.2 Transformation von JM109-Zellen

*Durchführung:*

50 µl kompetente JM109-Zellen (Promega Corporation, Madison, USA)

10 µl Ligationsansatz



*10 min auf Eis inkubieren, 45-50 sec in einem auf 42°C  
temperierten Wasserbad inkubieren, 2 min auf Eis abkühlen*

900 µl eiskaltes LB-Medium



*vermischen, im Schüttelinkubator inkubieren  
(1 h, 225 rpm, 37°C), zentrifugieren (4 min, 3000 rpm),  
Überstand absaugen*

50 µl Wasser



*Pellet resuspendieren*

Zellsuspension

Die Zellsuspension wurde auf mit 50 µl Ampicillin (50 mg/ml), 100 µl Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranoside [IPTG] (1,2 g/50 ml) und 25 µl 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside [XGal] (100 mg/2 ml DMF) beschichteten Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Die weißen Kolonien wurden am nächsten Tag in je 5 ml LB-Medium und 10 µl Ampicillin (50 mg/ml) überimpft und 16 h bei 37°C und 200 rpm im Schüttelinkubator inkubiert.

### **3.10.2 Plasmidpräparation**

Die Plasmidpräparation erfolgte mit Hilfe des Silica Spin Kits (Biometra, Göttingen). Nach Lyse des Bakterienpellets und anschließender Neutralisation folgt die Anheftung der DNA an einen mit Silica-Suspension beschichteten Filter, von dem sie nach mehreren Waschschritten wieder eluiert wird.

### **3.10.3 Restriktionsverdau**

Zur Überprüfung der Plasmide wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt. Das Plasmid wurde mit dem Enzym Eco 52 I (Fermentas) an den entsprechenden Schnittstellen geschnitten und die Größe des herausgeschnittenen Inserts mit Hilfe eines Agarosegels überprüft.

Für den Restriktionsverdau wurden 2 µl Plasmid, 6 µl Wasser, 1 µl Eco 52 I Enzym und 1 µl Eco 52 I Puffer für 1 h bei 37°C inkubiert.

### **3.10.4 Sequenzierung**

Die Sequenzierung des Inserts erfolgte durch die Firma MWG-Biotech, Ebersberg.

## **3.11 Lösungszusammensetzungen:**

GTC-Denaturierungslösung:	4 mol l <sup>-1</sup> Guanidiniumisothiocyanat
	0,02 mol l <sup>-1</sup> Natriumcitrat
	0,5 % Sarcosyl
10x MOPS-Puffer:	0,2 mol l <sup>-1</sup> MOPS
	0,05 mol l <sup>-1</sup> Na-Acetat
	0,01 mol l <sup>-1</sup> EDTA, pH 5,5-7,0 mit NaOH

Farbmarker: 160  $\mu\text{l}$  10x MOPS-Puffer  
100  $\mu\text{l}$  steriles Wasser  
80  $\mu\text{l}$  steriles Glycerol  
80  $\mu\text{l}$  gesättigtes Bromphenol-Blau in sterilem Wasser

First strand buffer (5x): 250  $\text{mmol l}^{-1}$  Tris-HCl (pH 8,3)  
375  $\text{mmol l}^{-1}$  KCl  
15  $\text{mmol l}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$   
50  $\text{mmol l}^{-1}$  Dithiothreitol (DTT)

PCR-Puffer (10x): 200  $\text{mmol l}^{-1}$  Tris-HCl (pH 8,0)  
500  $\text{mmol l}^{-1}$  KCl

Luria Bertrani (LB)-Agar: 10 g Bacto-Tryptone (Difco, Augsburg)  
10 g Bacto-Yeast-Extract (Difco, Augsburg)  
10 g NaCl

in 900 ml Wasser (bidest.) lösen, pH mit NaOH auf pH 7,5 einstellen, auf 1 l auffüllen 15 g Agar (Difco) zugeben und autoklavieren.

LB-Flüssigmedium: 10 g Bacto-Tryptone (Difco, Augsburg)  
10 g Bacto-Yeast-Extract (Difco, Augsburg)  
10 g NaCl

in 900 ml Wasser (bidest.) lösen, pH mit NaOH auf pH 7,5 einstellen, auf 1 l auffüllen.

Ligase 10x Puffer: 300  $\text{mmol l}^{-1}$  Tris-HCl, pH 7,8  
100  $\text{mmol l}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$   
100  $\text{mmol l}^{-1}$  DTT  
10  $\text{mmol l}^{-1}$  ATP

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Sigma-Aldrich, Deisenhofen, in ACS-Qualität bezogen.

### **3.12 Statistische Auswertung**

Die Versuchsergebnisse werden als arithmetischer Mittelwert mit Standardabweichung angegeben, falls nicht ausdrücklich anders erwähnt. Der Stichprobenumfang "n" bezeichnet die jeweilige Anzahl der Versuchstiere.

Nicht normalverteilte Werte wurden mit dem Kruskal-Wallis Algorithmus mit anschließendem paarweisen Mittelwertsvergleich (Dunn`sTest) und die parametrisch verteilten Werte mit einer 1-Weg ANOVA mit Tukey`s Nachfolgetest aus den Statistikpaket der Graph Pad<sup>TM</sup> Software (San Diego, USA) ausgewertet.

Die Berechnung der linearen Regression und die graphischen Darstellungen der Ergebnisse wurden mit Hilfe der Graph Pad<sup>TM</sup> Software (San Diego, USA) ausgeführt.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1 Charakterisierung des Tiermodells

Zur Charakterisierung des Tiermodells mit alimentärer P- oder Ca-Depletion wurden wichtige Kenngrößen der P- und Ca-Homöostase im Plasma untersucht. Dazu wurden die  $P_i$ - und Ca-Konzentrationen sowie die Aktivität der alkalischen Phosphatase (AP) im Plasma bestimmt.

Tab.3a  $P_i$ - und Ca-Konzentrationen sowie die Aktivität der alkalischen Phosphatase (AP) im Plasma von Ziegen bei unterschiedlicher P- und Ca-Versorgung. ( Mittelwerte  $\pm$  SD, n = Anzahl der Tiere)

Gruppe	$P_i$ [mmol l <sup>-1</sup> ]	Ca [mmol l <sup>-1</sup> ]	AP [U l <sup>-1</sup> ]
<b>Kontrolle</b> n = 12	2,87 $\pm$ 0,66	2,94 $\pm$ 0,21	743 $\pm$ 195
<b>P-Depletion</b> n = 8	0,59 $\pm$ 0,16	3,62 $\pm$ 0,64	1248 $\pm$ 704
<b>Ca-Depletion</b> n = 8	2,40 $\pm$ 0,57	2,85 $\pm$ 0,13	944 $\pm$ 24

Tab.3b P<sub>i</sub>- und Ca-Konzentrationen sowie die Aktivität der alkalischen Phosphatase (AP) im Plasma von Schafen bei unterschiedlicher P- und Ca-Versorgung. ( Mittelwerte ± SD, n = Anzahl der Tiere)

Gruppe	P <sub>i</sub> [mmol l <sup>-1</sup> ]	Ca [mmol l <sup>-1</sup> ]	AP [U l <sup>-1</sup> ]
<b>Kontrolle</b> n = 3	1,87 ± 0,49	2,80 ± 0,04	205 ± 69
<b>P-Depletion</b> n = 3	1,34 ± 0,17	2,67 ± 0,07	220 ± 89

Die Ca- oder P-Depletion bei Ziegen sowie P-Depletion bei Schafen wirkte sich auf die untersuchten Kenngrößen signifikant aus. Die P<sub>i</sub>-Plasmakonzentrationen der Ziegen waren bei alimentärem P-Mangel mit 0,6 mmol l<sup>-1</sup> signifikant niedriger als bei der Kontrollgruppe (2,9 mmol l<sup>-1</sup>, p < 0,001) und der Ca-depletierten Gruppe (2,4 mmol l<sup>-1</sup>, p < 0,001).

Bei den Schafen nahm die P<sub>i</sub>-Konzentration im Plasma von 1,9 auf 1,3 mmol l<sup>-1</sup> ab. Allerdings war dieser Effekt aufgrund der niedrigeren Anzahl der Versuchstiere nicht signifikant. Während die P-Depletion bei Ziegen mit einer ausgeprägten Hypercalciämie einherging (Ca: 3,6 mmol l<sup>-1</sup> gegenüber 2,9 mmol l<sup>-1</sup>; p < 0,001), trat dieses Phänomen bei den Schafen nicht auf. Trotz Ca-Depletion veränderten sich die Ca-Plasma-Spiegel der Ziegen nur unwesentlich, während die P<sub>i</sub>-Plasma-Spiegel von 2,9 mmol l<sup>-1</sup> auf 2,4 mmol l<sup>-1</sup> abnahmen. Allerdings war dieser Effekt nicht signifikant. Die Aktivität der AP war sowohl bei P-Depletion als auch bei Ca-Depletion der Ziegen erhöht. Bei den Schafen waren die AP-Werte insgesamt niedriger als bei den Ziegen und es war keine Beeinflussung durch P-Depletion zu erkennen.

## **4.2 Anreicherungen der Bürstensaummembranvesikel (BSMV)**

Die Überprüfung der Anreicherungen der BSMV sowie der Anteile an basolateralen Membranen erfolgte bei jeder Präparation durch Vergleich charakteristischer Membranleitenzyme zwischen Ausgangshomogenat und Vesikelfraktion. Als Marker der BSMV wurde die jeweilige Aktivität der alkalischen Phosphatase bestimmt. Durch Messung der Aktivität der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase wurde eine mögliche Verunreinigung der Vesikelfraktion mit basolateralen Membranen (BLM) überprüft.

Die Ergebnisse sind in Tab.4 zusammengefaßt. Die BSMV wurden bei Ziegen im Vergleich zum Ausgangshomogenat unabhängig von der P- bzw. Ca-Versorgung um das 6-8-fache angereichert. Bei Schweinen lag die Anreicherung in derselben Größenordnung, während sie bei den Schafen nur ca. 5-fach war. Der BLM-Anteil wurde nicht wesentlich angereichert.

Tab.4 Vergleich der Aktivitäten der Membranleitenzyme (BSM: Alkalische Phosphatase, BLM: Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase) sowie der Anreicherungsfaktoren der Nierencortexpräparation unterschiedlicher Spezies und verschiedener Behandlungen (Mittelwert ± SD, n = Anzahl der Tiere, Anreicherungsfaktor = Verhältnis Enzymaktivität in der Vesikelfraktion zu Enzymaktivität im Homogenat).

Versuchstiere/ Behandlungen	Aktivität der alkalischen Phosphatase			Aktivität der Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase		
	Homogenat U/g Protein	Vesikel U/g Protein	Anreicherungs- faktoren	Homogenat U/g Protein	Vesikel U/g Protein	Anreicherungs- faktoren
<b>Ziegen</b>						
<b>Kontrolle</b> n=12	665 ± 181	4528 ± 2528	6,8 ± 2,3	185 ± 37	195 ± 29	1,0 ± 0,2
<b>P-Depletion</b> n=8	1377 ± 1224	11437 ± 10390	8,3 ± 4,3	168 ± 61	160 ± 51	1,0 ± 0,4
<b>Ca-Depletion</b> n=8	510 ± 183	3148 ± 1039	6,3 ± 2,1	191 ± 60	171 ± 39	0,9 ± 0,2
<b>Schafe</b>						
<b>Kontrolle</b> n=3	694 ± 112	3237 ± 286	4,7 ± 0,5	154 ± 22	174 ± 24	1,1 ± 0,1
<b>P-Depletion</b> n=3	658 ± 150	3357 ± 3156	5,1 ± 1,2	145 ± 32	169 ± 31	1,2 ± 0,1
<b>Schweine</b> n=3	281 ± 65	2353 ± 567	8,4 ± 0,5	182 ± 48	189 ± 25	1,1 ± 0,1

### 4.3 Vesikelintegrität

Als Nachweis der funktionellen Integrität der Vesikel diene die  $\text{Na}^+$ -abhängige  $\text{P}_i$ -Aufnahme in die Vesikel als Funktion der Zeit. Nur bei intakten, geschlossenen Vesikeln ist der sogenannte Overshoot zu beobachten, d.h. eine  $\text{P}_i$ -Aufnahme in die Vesikel über den  $\text{P}_i$ -Konzentrationsausgleich zwischen intra- und extravesikulärem Medium hinaus. Die treibende Kraft hierfür ist der vesikeleinwärts gerichtete  $\text{Na}^+$ -Gradient.

Wird  $\text{Na}^+$  im extravesikulären Medium durch  $\text{K}^+$  ersetzt, so steigt die  $\text{P}_i$ -Aufnahme linear mit der Zeit an, bis nach 180 min der Ausgleichswert, bei dem die  $\text{P}_i$ -Konzentrationen in intra- und extravesikulärem Medium gleich sind, erreicht ist.

Aus diesem Ausgleichswert ließ sich ein mittleres Vesikelvolumen von  $1,07 \pm 0,4 \mu\text{l} \cdot \text{mg}^{-1}$  Protein (Mittelwert  $\pm$  SD, n=4) berechnen.

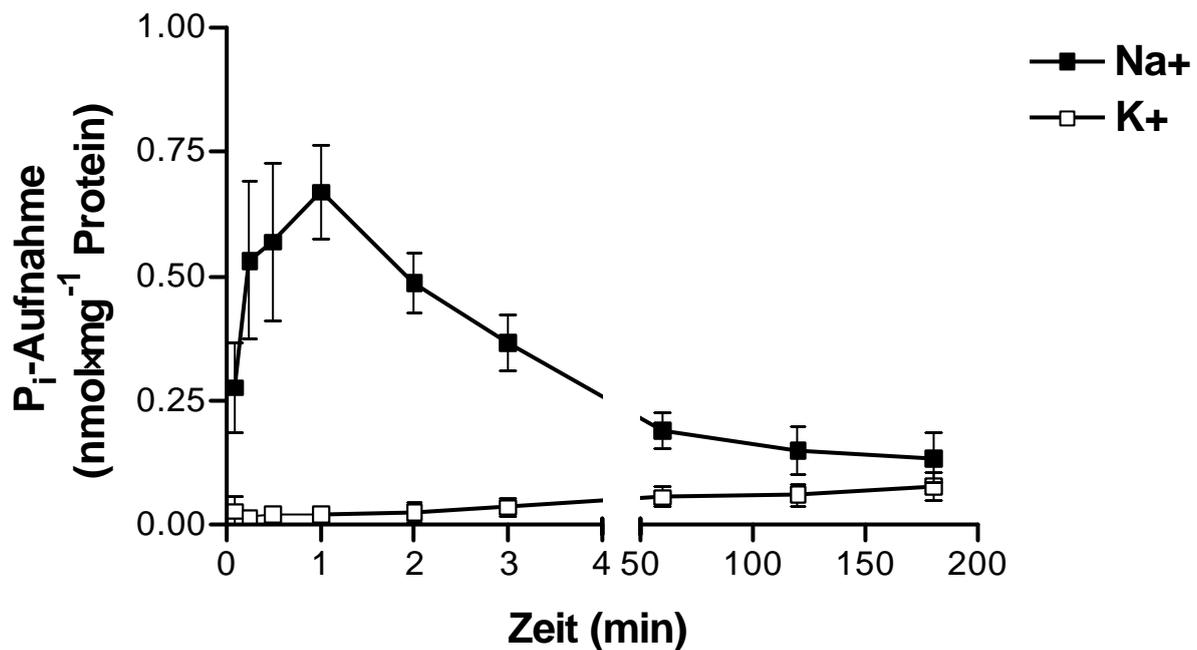


Abb.8 Zeitlicher Verlauf der P<sub>i</sub>-Aufnahme in renale BSMV von Kontrollziegen bei 37°C in An- und Abwesenheit eines vesikeleinwärts gerichteten Na<sup>+</sup>-Gradienten (Mittelwerte ± SEM, n= 4 Tiere)

Bei jeder Präparation, von der eine ausreichende Menge an BSMV-Suspension zur Verfügung stand, wurde die Glucoseaufnahme über 30 s gemessen. Dieses diente ebenfalls zur Überprüfung der Vesikelintegrität und um prinzipielle Unterschiede der Transporteigenschaften der Membranen zwischen den Fütterungsgruppen auszuschließen.

Die mittlere Glucoseaufnahme lag zwischen 1,6 - 2,4 nmol mg<sup>-1</sup> Protein 30s<sup>-1</sup>; weder bei Schafen noch bei Ziegen konnten in Abhängigkeit vom P- bzw. Ca-Status gesicherte Unterschiede zu Kontrolltieren nachgewiesen werden.

Tab.5 Na<sup>+</sup>-abhängige Glucoseaufnahme in renale BSMV von Ziegen, Schafen und Schweinen bei 21°C.  
(Mittelwerte ± SD; Glucose 0,5 mmol l<sup>-1</sup>)

Spezies/ Gruppe			Glucoseaufnahme (nmol mg <sup>-1</sup> Protein · 30s <sup>-1</sup> )
<b>Ziege</b>	Kontrolle	n = 4	1,6 ± 0,7
	P-Depl.	n = 4	2,1 ± 0,5
	Ca-Depl.	n = 4	1,8 ± 0,3
<b>Schaf</b>	Kontrolle	n = 3	2,4 ± 0,8
	P-Depl.	n = 3	2,0 ± 0,4
<b>Schwein</b>	Kontrolle	n = 3	2,4 ± 0,3

#### 4.4 Charakterisierung der P<sub>i</sub>-Aufnahme

##### 4.4.1 Initiale P<sub>i</sub>-Aufnahme

Die Na<sup>+</sup>-abhängige P<sub>i</sub>-Aufnahme in renale BSMV von Kontrollziegen verlief bei 21°C zwischen 5 s und 25 s linear. Aus diesem Grund wurde für die Versuche zur Charakterisierung der Kinetik der P<sub>i</sub>-Aufnahme eine Inkubationsdauer von 10 s gewählt. Bei renalen BSMV von Schafen und Schweinen war die P<sub>i</sub>-Aufnahme unter denselben Bedingungen prinzipiell gleich.

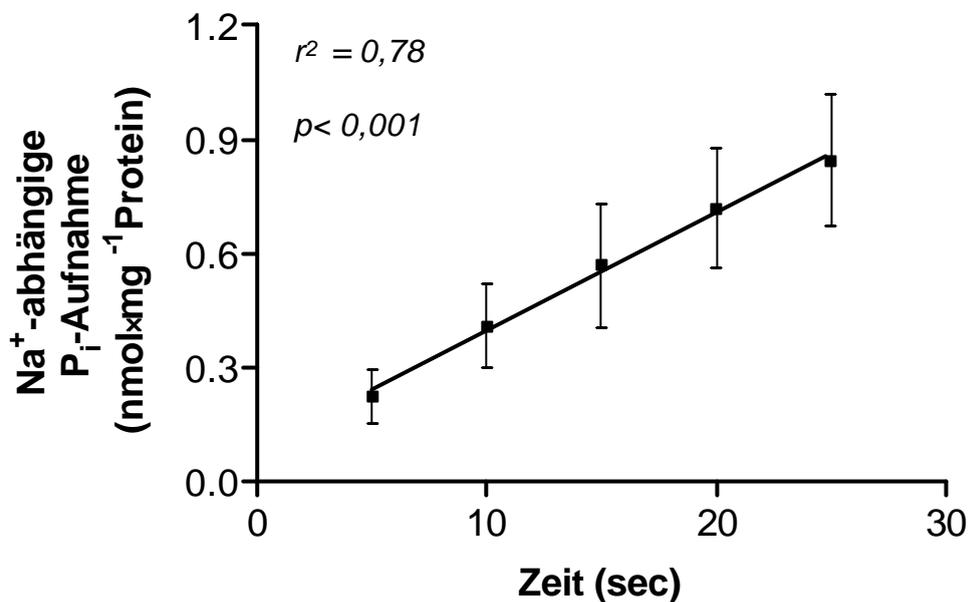


Abb.9 „Schnelle“ Na<sup>+</sup>-abhängige P<sub>i</sub>-Aufnahme in renale BSMV von Kontrollziegen bei 21°C. (Mittelwerte ± SD, n = 3 Tiere mit 3fach-Ansätzen pro Zeitpunkt)

#### 4.4.2 P<sub>i</sub>-Aufnahme als Funktion der P<sub>i</sub>-Konzentration

In Abb.10 ist die Kinetik der P<sub>i</sub>-Aufnahme in renale BSMV einer Kontrollziege dargestellt. Es handelt sich um eine repräsentative Verlaufskurve mehrerer gleichartiger Experimente.

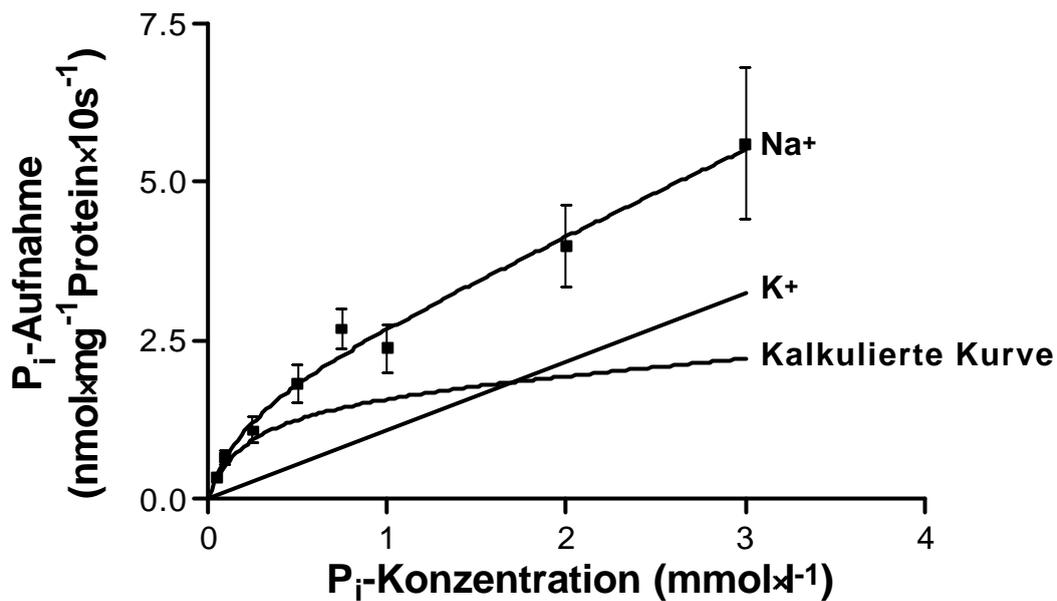


Abb.10 Kinetik der P<sub>i</sub>-Aufnahme in renale BSMV einer Kontrollziege als Funktion der P<sub>i</sub>-Konzentration bei 21°C (Mittelwerte ± SD von 3 fachansätzen).

Kalkulierte Kinetik: Subtraktion der nicht Na<sup>+</sup>-abhängigen Komponente (K<sup>+</sup>) von der gesamt P<sub>i</sub>-Aufnahme (Na<sup>+</sup>)

Durch Subtraktion der linear verlaufenden Na<sup>+</sup>-unabhängigen P<sub>i</sub>-Aufnahme (K<sup>+</sup>) von der gesamt P<sub>i</sub>-Aufnahme (Na<sup>+</sup>) ergibt sich die Na<sup>+</sup>-abhängige P<sub>i</sub>-Aufnahme, deren Kurvenverlauf eine typische Michaelis-Menten-Kinetik mit Sättigungsphänomen zeigt. Aus dieser Kinetik lassen sich die Parameter K<sub>m</sub> und V<sub>max</sub> bestimmen. Die halbmaximale Sättigung (K<sub>m</sub>) ist ein Maß für die P<sub>i</sub>-Affinität des Transportsystems und die maximale Aufnahmerate (V<sub>max</sub>) gibt einen Hinweis auf die Transportkapazität bzw. Anzahl der Transporter.

Diese Parameter aus jeweils mehreren Versuchen sind für die Fütterungsgruppen von Ziegen und Schafen im Vergleich mit entsprechenden Werten der Schweineniere in Tab.6 zusammengefaßt.

Tab.6 Maximale  $P_i$ -Aufnahmeraten und  $P_i$ -Affinitäten des  $Na^+$ -abhängigen  $P_i$ -Transportsystems der renalen BSMV verschiedener Spezies mit adäquater oder reduzierter P- oder Ca-Versorgung (Mittelwerte  $\pm$  SD, n = Anzahl der Tiere, 21°C).

Spezies			$V_{max}$ (nmolmg <sup>-1</sup> Protein·10s <sup>-1</sup> )	$K_m$ (mmol l <sup>-1</sup> )
<b>Ziege</b>	Kontrolle	n = 8	1,98 $\pm$ 1,21	0,34 $\pm$ 0,14
	P-Depl.	n = 8	2,99 $\pm$ 2,20	0,35 $\pm$ 0,07
	Ca-Depl.	n = 8	1,93 $\pm$ 0,99	0,28 $\pm$ 0,17
<b>Schaf</b>	Kontrolle	n = 3	1,39 $\pm$ 0,56	0,55 $\pm$ 0,21
	P-Depl.	n = 3	1,03 $\pm$ 0,6	0,33 $\pm$ 0,29
<b>Schwein</b>		n = 3	0,95 $\pm$ 0,07	0,11 $\pm$ 0,002

Bei Ziegen waren die  $V_{max}$ -Werte unabhängig von der Ca-Versorgung. Sie stiegen aber als Folge der P-Depletion um  $\sim$  50 % an. Allerdings war dieser Effekt aufgrund der hohen interindividuellen Streuung in dieser Gruppe nicht signifikant. In Abb.11 sind die  $V_{max}$ -Werte der einzelnen Tiere für die Kontroll- und die P-Mangelgruppe dargestellt. Die  $K_m$ -Werte wurden durch keine der Fütterungsvarianten signifikant beeinflusst.

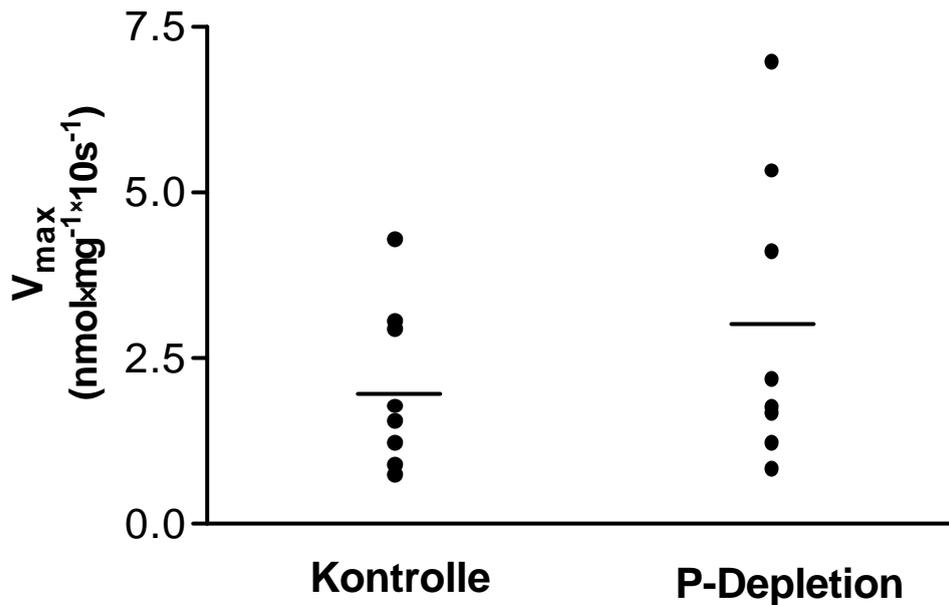


Abb.11  $V_{\max}$ -Werte der  $\text{Na}^+$ -abhängigen  $\text{P}_i$ -Aufnahme in renale BSMV von Ziegen mit adäquater oder reduzierter P-Versorgung (— = Mittelwert, 21°C)

Bei Schafen hatte die P-Depletion weder auf die  $V_{\max}$ - noch auf die  $K_m$ -Werte einen signifikanten Einfluß. Während die  $V_{\max}$ -Werte in vergleichbarer Größenordnung wie die an Schweinen ermittelten Werte lagen, waren sie um ~ 30-50 % niedriger als bei Ziegen. Bei beiden Wiederkäuerspezies war die Affinität des  $\text{P}_i$ -Transportsystems für  $\text{P}_i$ -Ionen um das 2,5- bis 5fache geringer als beim Schwein ( $p < 0,01$ ).

#### 4.4.3 $\text{P}_i$ -Aufnahme als Funktion der $\text{Na}^+$ -Konzentration

Abb.12 zeigt beispielhaft für 12 Kontrollziegen die  $\text{P}_i$ -Aufnahme in renale BSMV als Funktion der  $\text{Na}^+$ -Konzentration. Aus osmotischen Gründen wurden keine  $\text{Na}^+$ -

Konzentrationen  $>100 \text{ mmol l}^{-1}$  verwendet. Der Teil der Kurve mit  $[\text{Na}^+] > 100 \text{ mmol l}^{-1}$  wurde extrapoliert. Die beste Kurvennäherung ( $r= 0,99$ ) wurde mit dem Modell einer sigmoidalen Dosis/Wirkungsbeziehung erreicht. Aus dem Kurvenverlauf lässt sich die  $\text{Na}^+$ -Konzentration bestimmen bei der die  $\text{P}_i$ -Aufnahme bei gegebener  $\text{P}_i$ -Konzentration von  $0,1 \text{ mmol l}^{-1}$  halbmaximal war ( $K_{[0,5]\text{Na}}$ ).  $K_{[0,5]\text{Na}}$  wird üblicherweise als Maß für die  $\text{Na}^+$ -Affinität des  $\text{P}_i$ -Transportsystems verwendet.

Durch Umformung dieser Kurve nach HILL lässt sich der Hill-Koeffizient ( $n_{\text{app}}$ ) berechnen, der einen Schätzwert für die Anzahl der pro transportiertem  $\text{P}_i$ -Ion beteiligten  $\text{Na}^+$ -Ionen angibt.

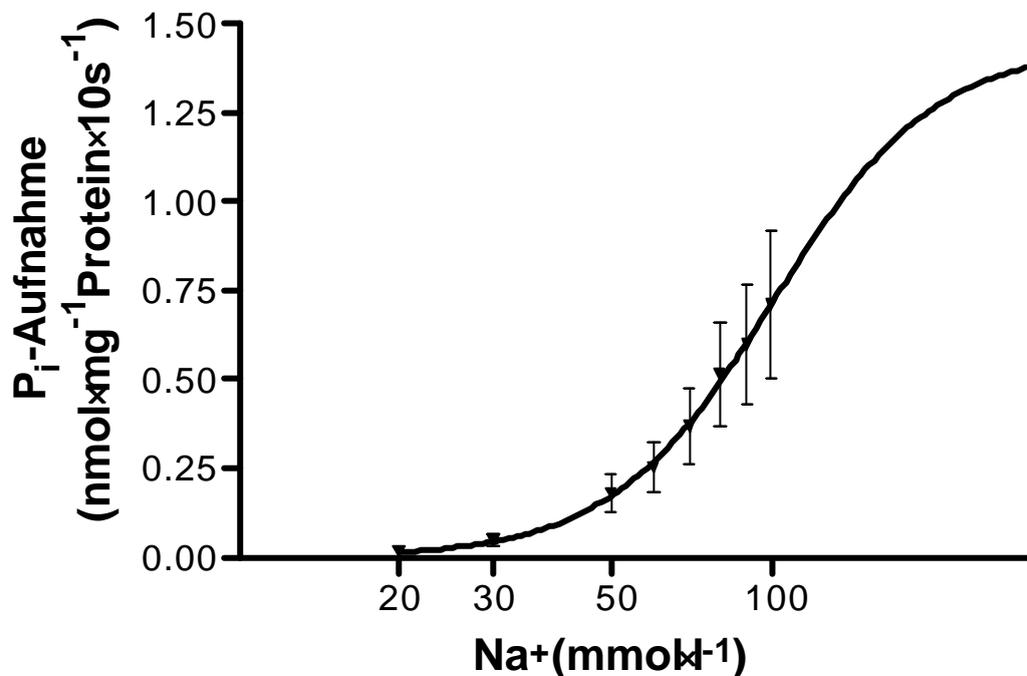


Abb.12 Kinetik der  $\text{P}_i$ -Aufnahme in renale BSMV von Kontrollziegen als Funktion der  $\text{Na}^+$ -Konzentration bei  $21^\circ\text{C}$  (Mittelwert  $\pm$  SEM,  $n=12$ ). Der zu den  $\text{Na}^+$ -Konzentrationen  $>100 \text{ mmol l}^{-1}$  gehörige Anteil des Graphen wurde extrapoliert.

## Ergebnisse

Tab.7 zeigt eine Zusammenfassung der kinetischen Kenngrößen, wie Na<sup>+</sup>-Transportkapazitäten ( $V_{\max,app}$ ) sowie Na<sup>+</sup>-Affinitäten ( $K_{[0,5]Na}$ ) mit den dazugehörigen Hill-Koeffizienten ( $n_{app}$ ) für renale BSMV von Ziegen, Schafen und Schweinen mit unterschiedlicher P- oder Ca-Versorgung.

Tab.7 Kinetische Kenngrößen der Na<sup>+</sup>-Komponente des renalen P<sub>i</sub>-Transportsystems von Ziegen, Schafen und Schweinen (21°C, Mittelwerte ± SD, n=Anzahl der Tiere).

Spezies			$V_{\max,app}$ (nmolmg <sup>-1</sup> Protein·10s <sup>-1</sup> )	$K_{[0,5]Na}$ (mmol l <sup>-1</sup> )	$n_{app}$
<b>Ziege</b>	Kontrolle	n = 12	1,37 ± 0,57	95,9 ± 16,3	3,01 ± 0,33
	P-Depl.	n = 8	2,89 ± 2,21	128,1 ± 43,1	2,75 ± 0,79
	Ca-Depl.	n = 8	1,30 ± 0,96	114,6 ± 35,4	2,54 ± 0,49
<b>Schaf</b>	Kontrolle	n = 3	0,43 ± 0,1	81,1 ± 10,0	2,35 ± 0,10
	P-Depl.	n = 3	0,57 ± 0,16	93,8 ± 14,5	2,27 ± 0,28
<b>Schwein</b>	Kontrolle	n = 3	0,58 ± 0,09	61,0 ± 1,06	3,32 ± 0,19

Bei den Ziegen stieg die Na<sup>+</sup>-Transportkapazität unter P-Mangel um ~50% an, allerdings war dieser Effekt aufgrund der hohen Streuung innerhalb dieser Gruppe nicht signifikant. Die Ca-Versorgung übte keinen Einfluß auf die  $V_{\max,app}$ -Werte aus. Die  $K_{[0,5]Na}$ -Werte wurden durch keine der 3 Fütterungsvarianten beeinflusst.

Bei Schafen hatte die P-Depletion keinen nennenswerten Einfluß auf die  $V_{\max,app}$ - und auf die  $K_{[0,5]Na}$ -Werte.

Im Speziesvergleich liegt die maximale  $P_i$ -Aufnahmerate der Ziegen ( $1,37 \pm 0,57$  nmol $mg^{-1}$  Protein $10s^{-1}$ ) signifikant höher ( $p < 0,05$ ) als bei Schafen ( $0,43 \pm 0,1$  nmol $mg^{-1}$  Protein $10s^{-1}$ ) und Schweinen ( $0,58 \pm 0,09$  nmol $mg^{-1}$  Protein $10s^{-1}$ ). Die Affinität des  $P_i$ -Transportsystems für  $Na^+$ -Ionen war bei beiden Wiederkäuerspezies geringer, unterschied sich jedoch nur zwischen Ziege und Schwein signifikant ( $p < 0,05$ ).

Für alle Spezies wurde ein Hill-Koeffizient  $>2$  berechnet. Dies deutet auf einen elektrogenen  $P_i$ -Transport unter den gewählten Versuchsbedingungen hin. Im Speziesvergleich liegt der für die Schafe berechnete Hill-Koeffizient ( $2,35 \pm 0,1$ ) signifikant niedriger ( $p < 0,01$ ) als der von Ziegen ( $3,01 \pm 0,33$ ) und Schweinen ( $3,32 \pm 0,19$ ). Ein signifikanter Einfluß der Fütterung konnte weder bei Ziegen noch bei Schafen beobachtet werden.

## 4.5 Molekulare Charakterisierung des $P_i$ -Transportsystems

### 4.5.1 Amplifikation von $Na^+/P_i$ -Cotransporter Typ II spezifischen Fragmenten

In der RT-PCR konnten mit  $Na^+/P_i$ -Cotransporter Typ II spezifischen Primern sowohl in der Schweine- als auch in der Ziegen- und Schafniere entsprechende Fragmente amplifiziert werden.

In einem analytischen Gel zeigte sich, daß die Größe der Fragmente annähernd der des Rattenfragmentes mit 768 Basenpaaren entsprach.

Unspezifische Reaktionen konnten über negative Kontrollen ausgeschlossen werden.

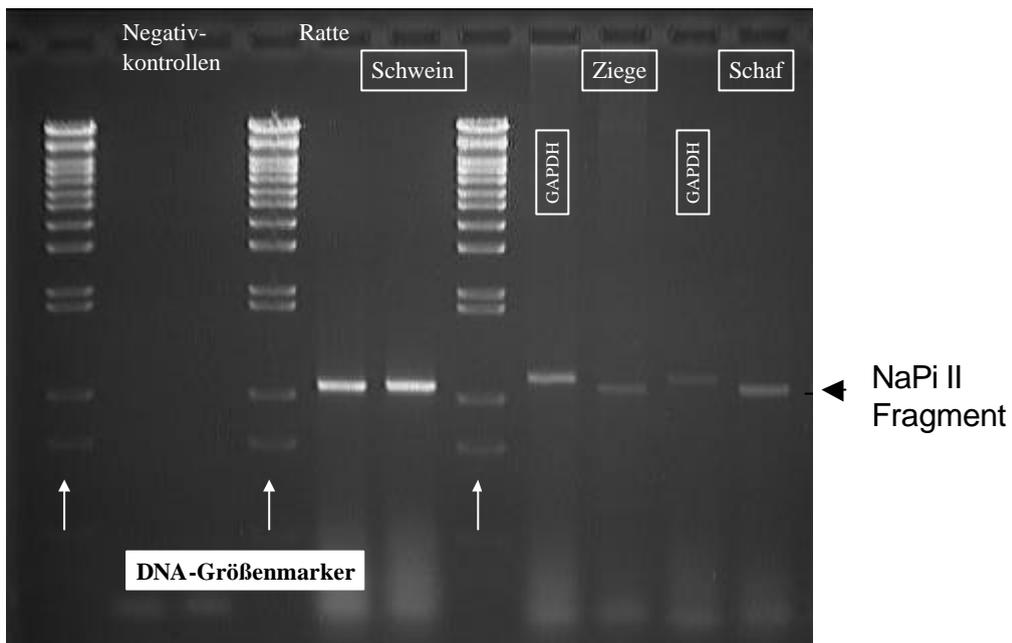


Abb.13 Amplifikation von  $\text{Na}^+/\text{P}_i$ -Cotransporter Typ II spezifischen Fragmenten in der Niere von Schwein, Ziege und Schaf.

Negativkontrolle: PCR-Ansatz ohne Template; Positivkontrolle: Ratte

Bei Ziege und Schaf wurde die Qualität des Templates über die Amplifikation eines GAPDH-Fragmentes von 820 Basenpaaren verifiziert.

#### 4.5.2 Sequenzierung der $\text{Na}^+/\text{P}_i$ -Cotransporter Typ II spezifischen Fragmente

Die  $\text{Na}^+/\text{P}_i$ -Cotransporter Typ II spezifischen Fragmente wurden in den pGEM-T Vektor inkloniert und JM109-Zellen damit transformiert. Die richtigen Klone wurden über eine Blau-Weiß-Selektion erkannt und isoliert.

Zur Überprüfung der Spezifität wurde eine Restriktionsanalyse der Plasmide mit Eco 52 I durchgeführt. Das in Abb.14 dargestellte analytische Gel zeigt die vorhandenen Inserts. Die Größe der Inserts bei Schwein und Schaf entsprach der Größe des spezifischen PCR-Fragmentes. Bei der Ziege wurde das Insert in zwei Fragmente geschnitten, da das Insert offensichtlich eine Eco 52 I Schnittstelle enthielt.

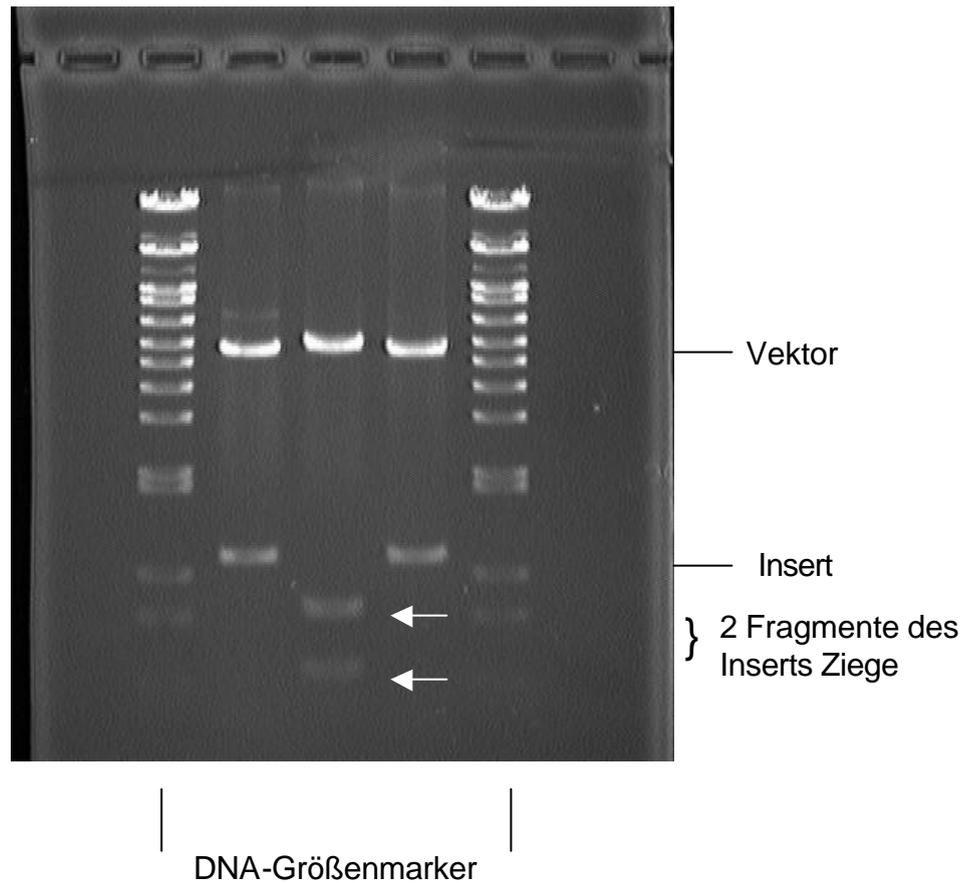


Abb.14 Überprüfung der Spezifität des klonierten PCR-Fragmentes mittels Restriktionsanalyse mit Eco 52 I.

Die Ermittlung der Sequenz des klonierten PCR-Fragmentes erfolgte durch die Firma MWG-BIOTECH, Ebersberg. Es wurde eine Einstrangsequenzierungsreaktion mit dem im Vektor enthaltenen T7-Promotor durchgeführt. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der Na<sup>+</sup>/P<sub>i</sub>-Cotransporter Typ II Fragmente (Abb.14) ergab folgende Homologien: Ziege/Ratte 90 %, Schaf/Ratte 89 %, Schwein/Ratte 89 %, Ziege/Schaf 98 %, Ziege/Schwein 94 % und Schaf/Schwein 92 %.

# Ergebnisse

		<u>M3</u>	10	20	30	40	50	
Ratte	1	MVSSGLLEVS	SAIPIIMGSN	IGTSVTINTIV	ALMQAGDRTD	FRRAFAGATV		50
Ziege	1	*****	*****	*****	*****	*****		50
Schaf	1	*****	*****V****	*****	*****	*****		50
Schwein	1	*****	*****	*****	*****	*****		50
			60	70	80	90	100	
Ratte	51	HDCFNWLSVL	VLLPLEAATG	YLHHVTGLVV	ASFNIRGGRD	APDLLKVITE		100
Ziege	51	*****	*****	****I****	*****	*****I***		100
Schaf	51	*****	*****	****I****	*****	*****I***		100
Schwein	51	*****V	*****	***Y****	*****	T*****I***		100
			110	120	130	140	150	
Ratte	101	PFTKLIIQLD	KSVITSIAVG	DESLRNHSLI	RIWCQPETKE	ASTSMSRVEA		150
Ziege	101	*****	*****L*S*	*****	*V**Y*DPT*	VP*P*P*A**		150
Schaf	101	*****	*****L*S*	*****	*V**Y**PHR	G*Y**P*A**		150
Schwein	101	*****	*****T*	*****	***H*DSMQ	*P*PVP*AQ*		150
			160	170	180	<u>M4</u>	190	200
Ratte	151	IGS--LANTT	MEKCNHIFVD	TGLPDLAVGL	ILLAGSLVVL	CTCLILLVKM		200
Ziege	151	NT*W-*R*A*	L*****	*****	*****AL*	*****		200
Schaf	151	NT*RM*R*A*	L*****	*****	*****C*AL*	*****		200
Schwein	151	NT*WM*G*A*	*****	*****	*****L*	*****		200
			210	220	230	<u>M5</u>	240	250
Ratte	201	LNSLLKGQVA	NVIQKVINTD	FPAPFTWVTG	YFAMVVGASM	TFVVQSSSVF		250
Ziege	201	*****	K*****	**T***A**	*****	*****		250
Schaf	201	*****	K*****	**T***A**	*****	*****		250
Schwein	201	*****	K*****	*S***A**	*****G*	*****		250
		<u>M6</u>	260					
Ratte	251	TSAITP....						300
Ziege	251	***L**....						300
Schaf	251	*****....						300
Schwein	251	*****....						300

Abb.14 Aminosäuresequenzen der renalen Na<sup>+</sup>/P<sub>i</sub>-Cotransporter Typ II Fragmente (\*=identisch mit der Rattensequenz)

(M = hydrophobe Bereiche, die als transmembranale Regionen postuliert werden, VERRI et al. 1995)

## 5. Diskussion

### 5.1 Beurteilung der angewandten Methode

Vor einigen Jahren noch war das Wissen über den renalen  $P_i$ -Transport in erster Linie auf In-vivo- und In-vitro-Untersuchungen am intakten Gewebe gestützt. Es wurden Clearance-Studien (BRAZY et al. 1980a), Stop-flow-Untersuchungen (LAMBERT 1964) sowie Untersuchungen mit Hilfe verschiedener Micropunktions- und Microperfusionstechniken durchgeführt (STRICKLER et al. 1964, KUNTZINGER et al. 1972, WEN 1978, LE GRIMELLEC 1974, DENNIS et al. 1976, BRAZY et al. 1980b). Die Isolierung von Membranvesikeln eröffnete weitere Möglichkeiten membranale Aufnahmemechanismen zu untersuchen.

Der Stofftransport durch Epithelien kann prinzipiell auf para- und/oder transzellulärem Weg stattfinden. Der parazelluläre Transport erfolgt passiv entlang eines chemischen und/oder elektrischen Gradienten. Der transzelluläre Stofftransport erfolgt entweder ebenfalls passiv entlang eines elektrochemischen Gradienten oder aktiv unter ATP-Verbrauch auch gegen einen vorhandenen Gradienten. Der Einsatz von Membranvesikeln ermöglicht eine Unterteilung des transepithelialen Transportes in Einzelschritte, die so unter definierten und kontrollierten Bedingungen untersucht werden können. Durch das Entfernen cytoplasmatischer Komponenten ist die Untersuchung der membranalen Transporteigenschaften unabhängig von intrazellulären Funktionen, wie dem Zellstoffwechsel, von intrazellulären Verteilungsprozessen und vom Einfluß der Second-messenger-Systeme möglich (MURER und KINNE 1980). Die isolierten Vesikel der apikalen oder basolateralen Zellmembran besitzen in der Regel eine ausreichende mechanische Stabilität, eine große Oberfläche für Flüssigkeits- oder Stofftransport und bilden eine effektive Barriere zwischen intra- und extravesikulärem Medium (HOPFER 1989). Das ermöglicht konzentrationsabhängige Aufnahmeversuche, die nach den Prinzipien von Michaelis-Menten ausgewertet werden können und somit eine genaue kinetische Charakterisierung membranständiger Transportsysteme erlauben. Durch Einsatz pharmakologisch wirksamer Substanzen kann auf chemische und/oder elektrische

Gradienten Einfluß genommen werden, um die Funktion der untersuchten Transportsysteme näher zu charakterisieren.

Bei der Interpretation, der durch Vesikelstudien erhaltenen Ergebnisse, ist zu berücksichtigen, daß es durch den Präparationsvorgang und die z.T. artifiziellen Pufferlösungen unter Umständen zu Veränderungen der Membranpermeabilität oder zur Inaktivierung von Transportsystemen kommen kann (MURER und KINNE 1980). Außerdem ist durch das Fehlen von Zellregulatoren und zellulären Stoffwechselprozessen die Aussagefähigkeit der Transportuntersuchungen eingeschränkt, da sie nicht die Transporteigenschaften des intakten Epithels widerspiegeln (MURER und KINNE 1980). Es ist daher wichtig die erhaltenen Ergebnisse in Zusammenhang mit Untersuchungen am intakten Epithel zu setzen.

Da es das Ziel der vorliegenden Arbeit war, den  $P_i$ -Transport über die renale Bürstensaummembran zu charakterisieren, war die Vesikeltechnik die Methode der Wahl.

### **5.1.1 Anreicherung der Bürstensaummembranfraktion**

Die Bürstensaummembranen wurden aus einem Zellhomogenat mittels  $Mg^{2+}$ -Präzipitation und Differentialzentrifugation isoliert. Für jede Präparation wurde sichergestellt, daß sich im abschließenden Pellet ausreichende Mengen an apikalen Membranen angereichert hatten und keine wesentliche Kontamination mit basolateralen Membranen vorlag, um so eine Verfälschung der erfaßten Transportkinetiken auszuschließen. Zur Überprüfung der Vesikelanreicherungen wird üblicherweise die Anreicherung sogenannter Marker- oder Leitenzyme bestimmt (MURER und KINNE 1980). In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivität der alkalischen Phosphatase (AP) als Marker der apikalen Membran gemessen sowie die Aktivität der  $Na^+/K^+$ -ATPase als Marker der basolateralen Membran (WRIGHT et al. 1979).

Die AP reicherte sich bei den Nierencortexpräparationen von Ziege und Schwein um das 6-8fache gegenüber dem Ausgangshomogenat an, während die Anreicherung bei den Schafen etwas geringer (5-fach) war (Tab.4). Dieser Unterschied zwischen

den Spezies läßt sich mit der relativ großen Streuung zwischen den einzelnen Präparationen erklären und wäre somit zufällig.

Insgesamt lagen die AP-Anreicherungen aber in vergleichbarer Größenordnung zu Werten aus der Literatur. HILDEN et al. (1989) fanden bei Nierencortexpräparationen von Hunden eine 9fache, PENNY (1991) bei vergleichbaren Untersuchungen an Schafen eine wenigstens 6fache und LEVINE et al. (1983) bei Ratten eine 9fache Anreicherung der AP.

Bei der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase fand keine nennenswerte Anreicherung zwischen Ausgangshomogenat und Vesikelfraktion statt (Tab.4). Im Vergleich dazu fanden HILDEN et al. (1989) bei ihren Untersuchungen an Hunden sogar eine 2fache Anreicherung des basolateralen Membranleitenzyms.

Die Ergebnisse der enzymatischen Untersuchungen zeigen somit, daß eine selektive Anreicherung der apikalen Membranen erreicht wurde, ohne daß eine zu berücksichtigende Kontamination mit basolateralen Membranen stattfand.

### 5.1.2 Vesikelintegrität und -volumen

Zur Überprüfung der funktionellen Integrität der BSMV wurden die  $\text{Na}^+$ -abhängigen und die  $\text{Na}^+$ -unabhängigen  $\text{P}_i$ -Aufnahmen als Funktion der Zeit gemessen. Hier zeigte sich in Anwesenheit eines vesikeleinwärts gerichteten  $\text{Na}^+$ -Gradienten ein sogenannter Overshoot der  $\text{P}_i$ -Aufnahme. D.h.,  $\text{P}_i$  wurde über die außen vorliegende Substratkonzentration hinaus in das Vesikelkompartiment aufgenommen (Abb.8). Als treibende Kraft dieses Phänomens diente dazu der  $\text{Na}^+$ -Gradient (BERTELOOT und SEMENZA 1990). Diese Fähigkeit der Vesikel zur transienten Substratanreicherung wird als sicherer Hinweis auf das Vorliegen geschlossener Kompartimente, also intakter Vesikel, gewertet.

Die Höhe und der Verlauf des hier beobachteten Overshoot-Phänomens ist mit dem von STOLL et al. (1979) für die Rattenniere und dem von HELPS und MC GIVAN. (1991) für die renale Rinderzelllinie NBL-1 beschriebenen Overshoot zu vergleichen.

Nach einer 180minütigen Inkubation bei 37°C erreichten sowohl die Na<sup>+</sup>-abhängige als auch die Na<sup>+</sup>-unabhängige P<sub>i</sub>-Aufnahme in die renalen BSMV von Kontrollziegen vergleichbare Werte. Die Menge des bis zu diesem Zeitpunkt pro mg Protein aufgenommenen P<sub>i</sub> bezeichnet den sogenannten Ausgleichswert (Equilibrium). Zu diesem Zeitpunkt sind extravesikuläre und intravesikuläre Substratkonzentration gleich. Aus diesem Ausgleichswert läßt sich das mittlere Vesikelvolumen berechnen. Der Transport in die Vesikel wird durch ihre Größe beeinflusst.

Im vorliegenden Fall ergab der Ausgleichswert ein Vesikelvolumen von 1,1 µl·mg<sup>-1</sup> Protein. Dieser Wert liegt in vergleichbarer Größenordnung zu Werten aus der Literatur (RÜBELT 1995). Für BSMV der Rattenniere wurde dagegen ein mittleres Vesikelvolumen von 1,3-1,7 µl·mg Protein<sup>-1</sup> beschrieben (BURCKHARDT et al. 1981, CAVERZASIO et al. 1982). Ob dieser Unterschied auf speziesabhängigen Unterschieden beruht oder sich aufgrund der unterschiedlichen Präparationstechniken ergab, wurde nicht weiter untersucht, da dieses für die im Folgenden diskutierten Ergebnisse für nicht weiter relevant gehalten wird.

Zur weiteren Überprüfung der Vesikelintegrität wurde der Na<sup>+</sup>-abhängige Glucosetransport gemessen. Ein Na<sup>+</sup>-abhängiger Glucosetransport im proximalen Tubulus wurde bereits für viele Spezies beschrieben (BECK und SACKTOR 1975, SCHARRER 1975, STOLL et al. 1979, LIN et al. 1984, BLANK et al. 1985, PENNY 1991). Bei jeder Vesikelpräparation, von der eine ausreichende Menge an BSMV-Suspension zur Verfügung stand, wurde die Glucoseaufnahme innerhalb 30 s bestimmt. Die Na<sup>+</sup>-abhängige Glucoseaufnahme war ca. 10fach höher als die Na<sup>+</sup>-unabhängige Glucoseaufnahme. Dies spricht für die Existenz eines Overshoot-Phänomens und damit für intakte Vesikel. Dabei lagen die in der vorliegenden Studie gemessenen Glucoseaufnahmen nach 30 s sogar um das 3-10fache höher als von anderen Arbeitsgruppen bisher gefunden (BECK und SACKTOR 1975, STOLL et al. 1979, PENNY 1991). Dies läßt sich möglicherweise auf Unterschiede in der Präparation der BSMV, wie z.B. bei der Pufferzusammensetzung und den Zentrifugationsschritten, und unterschiedliche Bedingungen während der Aufnahmeversuche selbst zurückführen.

Zwischen den einzelnen Fütterungsgruppen waren keine Unterschiede in der Höhe der jeweiligen Glucoseaufnahmen zu beobachten, und so ist davon auszugehen, daß die einzelnen Fütterungsvarianten keinen prinzipiellen Einfluß auf die Vesikelintegrität hatten. Mögliche Unterschiede im zeitlichen oder kinetischen Verlauf der  $P_i$ -Aufnahmen können demnach auch im wesentlichen auf einen Einfluß der Fütterung auf das  $P_i$ -Transportsystem zurückgeführt werden.

Es läßt sich zusammenfassen, daß es sich bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Vesikel um geschlossene Kompartimente, also intakte Vesikel, mit der Fähigkeit zur Glucoseaufnahme handelt und daß die Fütterungsvarianten keinen grundsätzlichen Einfluß darauf hatten.

### **5.2 Auswirkungen einer unterschiedlichen P- oder Ca-Versorgung auf die P- und Ca-Konzentrationen im Plasma**

Die mehrwöchige P-Depletion der Ziegen und Schafen führte zu dem schon bekannten Abfall der  $P_i$ -Konzentration im Plasma (FIELD et al. 1975, BOXEBELD et al. 1983, BREVES et al. 1985, PENNY 1991, SCHRÖDER et al. 1990, KÄPPNER 1993, RÜBELT 1995) (Tab.3a). Gleichzeitig entwickelte sich bei den Ziegen eine ausgeprägte Hypercalcämie, die als häufige Begleiterscheinung der P-Depletion schon in anderen Studien gefunden wurde (FIELD et al. 1975, BREVES et al. 1985, MANAS-ALMENDROS et al. 1982, PENNY 1991, KÄPPNER 1993, RÜBELT 1995, SCHRÖDER et al. 1990).

Diese mit der P-Depletion assoziierte Hypercalcämie resultiert wahrscheinlich nicht aus einer ansteigenden intestinalen Calciumnettoabsorption (ABDEL-HAFEEZ et al. 1982), da P-Depletion bei Wiederkäuern im Gegensatz zu den Verhältnissen bei monogastrischen Spezies nicht mit einem Anstieg der Plasmacalcitriolspiegel einhergeht (TANAKA und DeLUCA 1973, BAXTER und DeLUCA 1976, FOX und CARE 1979, GRAY et al. 1983, HUGHES et al. 1975, RIBOVICH und DeLUCA 1978, RADER et al. 1979, BAR et al. 1983, BREVES und SCHRÖDER 1991, SCHRÖDER und BREVES 1993). Die beobachtete Hypercalcämie könnte auf eine verringerte

Mineralisierung und/oder eine erhöhte Mobilisation von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Knochen zurückzuführen sein (BAYLINK et al. 1971, BREVES und SCHRÖDER 1991). Auf einen veränderten Knochenstoffwechsel deutet auch der Anstieg der AP im Plasma der P-depletierten Ziegen hin.

Bei den Schafen kam es dagegen zu keiner Veränderung der Ca-Plasmaspiegel und der AP-Werte bei P-Depletion. Möglicherweise war bei diesen Tieren trotz verminderter Plasma- $\text{P}_i$ -Konzentrationen die P-Depletion nicht ausgeprägt genug, um zu einer vermehrten Mobilisation aus dem Knochen zu führen.

Bis heute ist noch nicht geklärt, durch welche hormonellen Mechanismen adaptive Vorgänge bei der Regulation der P-Homöostase der Wiederkäuer vermittelt werden.

Trotz der Ca-Depletion kam es bei den Ziegen zu keinem Abfall der Ca-Konzentration im Plasma. Dieser Befund deckt sich mit den Ergebnissen vorhergehender Untersuchungen (KÄPPNER 1993, RÜBELT 1995). In diesen Fällen wurde gezeigt, daß die Ca-Depletion zu einem Anstieg der PTH- und Calcitriol-Konzentrationen im Blut führte. Die Aktivierung dieser calciotropischen Hormone kann als Ursache für die Aufrechterhaltung physiologischer Ca-Plasmaspiegel auch bei längerfristiger Ca-Depletion angesehen werden.

Die Ca-Depletion führte zu einem Absinken der P-Konzentration im Plasma der Ziegen von 2,9 auf 2,4  $\text{mmol l}^{-1}$  was auf eine erhöhte  $\text{P}_i$ -Ausscheidung, hervorgerufen durch den angestiegenen PTH-Plasmaspiegel, hindeutet. Auch die Aktivität der alkalischen Phosphatase war tendenziell erhöht. Diese gilt als Marker eines veränderten Knochenstoffwechsels und deutet auf eine gesteigerte Ca-Mobilisation aus dem Knochen hin.

Es kann festgehalten werden, daß sowohl die Ziegen als auch die Schafe sich in einem P- bzw. Ca-Mangel befanden und damit für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit geeignet waren.

### 5.3 Kinetische Eigenschaften des $P_i$ -Transporters

#### 5.3.1 Einfluß von $P_i$ auf den $P_i$ -Transport

Zur Charakterisierung der kinetischen Eigenschaften des  $P_i$ -Transports durch die renale BSM wurde die  $P_i$ -Aufnahme bei konstanter  $Na^+$ -Konzentration als Funktion der  $P_i$ -Konzentration gemessen. Aus dieser Beziehung wurden dann nach der Michaelis-Menten-Gleichung die maximale Aufnahmerate  $V_{max}$  für  $P_i$ , die ein Maß für die Transportkapazität bzw. die Anzahl der Transporter ist, bestimmt. Dabei ergab sich gleichzeitig die Michaelis-Menten-Konstante  $K_m$ , die ein Maß für die  $P_i$ -Affinität des Transportsystems darstellt.

Als Folge der P-Depletion kam es bei den Ziegen zu einer Steigerung der  $V_{max}$ -Werte um ca. 50 % (Tab.6). Allerdings konnte diese Erhöhung auf Grund der großen Streuung nicht statistisch abgesichert werden. Betrachtet man die Einzelwerte (Abb.11), so wird erkennbar, daß nur 25 % der P-depletierten Tiere eine gesteigerte Transportkapazität aufwiesen. Möglicherweise war die Transportkapazität des  $Na^+$ -abhängigen  $P_i$ -Transporters bei den Tieren, die keine adaptative Regulation aufwiesen, schon bei adäquater  $P_i$ -Versorgung maximal. Einen Hinweis hierauf liefern die schon bei bedarfsgerechter P-Versorgung auffällig geringen renalen  $P_i$ -Ausscheidungsraten von Wiederkäuern im Vergleich zu Nichtwiederkäuern (siehe Tab.1). Es kann vermutet werden, daß die Tiere, die eine Adaptation aufwiesen, zu den in der Literatur immer wieder beschriebenen „P-Ausscheidern“ gehört haben könnten (MEYER 1972, FIELD 1981, SCOTT et al. 1984a). Diese Einzeltiere fielen durch ihre hohe und monogastrischen Tieren entsprechende  $P_i$ -Ausscheidung auf. Um diese Hypothese zu überprüfen, sollte in zukünftigen Untersuchungen vor und während der P-Depletion die renale  $P_i$ -Exkretion bei entsprechenden Tieren bestimmt werden.

Die in Abhängigkeit von der P-Versorgung auftretenden Regulationsvorgänge des renalen  $Na^+/P_i$ -Cotransportes wurden schon für Schwein (BARRET et al. 1980,

BRANDIS et al. 1987), Kaninchen (CHENG et al. 1983), Ratte (HOFFMANN et al. 1976, BURCKHARDT et al. 1981, STORELLI et al. 1980, LEVINE et al. 1983), Schaf (PENNY et al. 1991) und eine renale Rinderzelllinie (HELPS et al. 1991) beschrieben und ist zur besseren Übersicht in Tab.8 zusammengefaßt. Wie aus Tab.8 hervorgeht, ist ein direkter Vergleich der Meßergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen schwer möglich, da die angegebenen Werte unter sehr unterschiedlichen Bedingungen erhoben wurden. Zeit, Temperatur, Pufferzusammensetzung, intra- und extravasikulärer pH sowie die extravasikulären  $P_i$ -Konzentrationen variierten sehr stark und auch die Vesikel selbst wurden nach unterschiedlichen Methoden isoliert. Vergleicht man z.B. die für Ratten gemessenen  $V_{max}$ - und  $K_m$ -Werte von HOFFMANN et al. (1976) mit denen in der Arbeit von BURCKHARDT et al. (1981), so zeigt sich für die  $V_{max}$ -Werte eine Differenz von  $\approx 100\%$  und bei den  $K_m$ -Werten sogar eine Differenz von 1740%. Wenn auch kein direkter Vergleich absoluter Werte möglich ist, so können doch die Regulationsvorgänge unter P-Depletion bei verschiedenen Spezies verglichen werden. So führte eine P-Depletion bei allen aufgeführten Spezies zu einem Anstieg der  $V_{max}$ -Werte, nicht aber zu signifikanten Veränderungen der  $K_m$ -Werte.

Bei monogastrischen Spezies wurde vielfach gezeigt, daß PTH das wichtigste Hormon der Regulation der renalen  $P_i$ -Ausscheidung ist. Die durch die P-Depletion hervorgerufene Hypercalcämie führt zu einem Absinken des PTH-Spiegels und dieses wiederum zu einer erhöhten Transporterdichte in der apikalen Membran des Tubulusepithels. Dadurch wird schließlich die renale  $P_i$ -Resorption erhöht (DENNIS et al. 1977, AMIEL et al. 1970, DUNLAY und HRUSKA 1990, LEVI et al. 1996). Beim Wiederkäuer hingegen ist die PTH-Wirkung umstritten. Konnte von einigen Arbeitsgruppen eine  $P_i$ -exkretionssteigernde Wirkung des PTH beobachtet werden (SMITH et al. 1969, KOOH 1980, DAVICCO et al. 1992), so wurde dies von anderen Arbeitsgruppen nicht berichtet (CLARK et al. 1975).

Calcitriol, das bei monogastrischen Tieren die  $P_i$ -Exkretion vermindert, (PUSCHETT et al. 1972, COSTANZO et al. 1974), scheint in der Regulation des  $P_i$ -Haushaltes von Wiederkäuern keine Rolle zu spielen (ABDEL-HAFEEZ et al. 1982, BREVES et al. 1985, MAUNDER et al. 1986).

Calcitonin bewirkt sowohl bei monogastrischen Tieren (BERNDT und KNOX 1992) als auch bei Wiederkäuern (MATSUI et al. 1983, BARLET et al. 1972) eine gesteigerte  $P_i$ -Exkretion über die Niere. Bei monogastrischen Tieren konnte eine Steigerung der  $P_i$ -Exkretion durch Glucocorticoide, PTHrP, TGF, EGF und atriales natriuretisches Hormon beobachtet werden, wohingegen Wachstumshormon, IGF1,  $T_3/T_4$  und Insulin eine gegenteilige Wirkung zeigten (BERNDT und KNOX 1992, KEMPSON 1996).

Ein Teil des Einflusses der alimentären P-Zufuhr auf die maximale  $P_i$ -Transportkapazität der Niere scheint aber auch unabhängig von PTH, Vit.  $D_3$ , Plasmacalcium oder Wachstumshormon zu sein (MURER und BIBER 1992). Bislang ist jedoch nicht geklärt, über welche Mechanismen diese Adaptation vermittelt wird. Untersuchungen an Ratten mit chronischem P-Mangel konnten zeigen, daß transkriptionale und/oder translationale Mechanismen an dieser Adaptation beteiligt sind (LÖTSCHER et al. 1996).

Wie schon erwähnt, wurde die  $P_i$ -Affinität des Transportsystems durch die Fütterung nicht beeinflußt. Dies wurde auch von PENNY (1991) für Schafe und von STORELLI et al. (1980) für Ratten beschrieben. Es ergibt sich damit ein Hinweis darauf, daß die erhöhte Transportkapazität bei P-Depletion nicht auf einer Modifikation des Transportproteins selbst beruht, sondern auf einem vermehrten Einbau von Transporterprotein in die Membran.

Bei Schafen hatte die P-Depletion weder auf die  $V_{max}$ - noch auf die  $K_m$ -Werte einen nennenswerten Einfluß. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Befunden von PENNY (1991). Er fand bei P-depletierten Schafen eine deutliche Steigerung der  $V_{max}$ -Werte. Für die fehlende Regulation der  $P_i$ -Transportkapazität in der vorliegenden Untersuchung sind zumindest zwei Ursachen denkbar. Erstens könnte die P-Depletion der Schafe, wie schon vorher diskutiert, nicht ausreichend gewesen sein, um eine Erhöhung der  $V_{max}$  zu induzieren. Zweitens ist auch denkbar, daß wie bei den Ziegen, die Transportkapazität des  $Na^+/P_i$ -Cotransporter Typ II schon unter adäquater P-Versorgung maximal war.

Beim direkten Vergleich der  $V_{\max}$ -Werte der vorliegenden Untersuchung ( $1,39 \text{ nmol/mg Protein}^{-1} \cdot 10\text{s}^{-1}$ ) und der von PENNY (1991) ( $0,141 \text{ nmol/mg Protein}^{-1} \cdot 10\text{s}^{-1}$ ) fällt auf, daß sie sich um ca. eine 10er Potenz unterscheiden. Allerdings gibt PENNY in derselben Arbeit an anderer Stelle eine initiale  $P_i$ -Aufnahme von  $0,208 \text{ nmol/mg}^{-1} \text{ Protein} \cdot 10\text{s}^{-1}$  an, die unter den gleichen Bedingungen gemessen wurde wie die Kinetik der  $\text{Na}^+$ -abhängigen  $P_i$ -Aufnahme. Da diese initiale  $P_i$ -Aufnahme in die Vesikel, die von ihm angegebene maximale Transportkapazität des  $P_i$ -Transportsystems deutlich überschreitet, läßt sich vermuten, daß es bei seiner Angabe der  $V_{\max}$  zu einem Einheitenfehler kam. Falls diese Vermutung nicht richtig ist und die von SHIRAZI-BEECHEY et al. (1996) veröffentlichten  $V_{\max}$ -Werte den tatsächlich gemessenen entsprechen, kann die erhebliche Differenz zu den  $V_{\max}$ -Werten der vorliegenden Arbeit nur mit unterschiedlichen Bedingungen bei den Transportuntersuchungen, wie bereits diskutiert, erklärt werden.

Bei den Ziegen waren die  $V_{\max}$ -Werte unabhängig von der Höhe der Ca-Versorgung und damit auch vom Plasmacalcitriolspiegel. Im Gegensatz dazu konnten BRANDIS et al. (1987) bei calcitriol-defizienten und hypocalcämischen Ferkeln im Vergleich mit normalen Ferkeln eine um die Hälfte erniedrigte  $V_{\max}$  der  $P_i$ -Aufnahme messen. Dieser verminderte  $V_{\max}$  Wert wurde auf den krankheitsbedingten Hyperparathyreoidismus zurückgeführt. Bei Ratten wurde mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gegen den renalen  $\text{Na}^+/\text{P}_i$ -Cotransporter Typ II in immunohistochemischen Untersuchungen eine Internalisierung unter PTH-Einfluß nachgewiesen (KEMPSON 1995, KEMPSON et al. 1996).

In der vorliegenden Arbeit wurden die PTH-Konzentrationen im Plasma der Ca-depletierten Ziegen nicht untersucht, da schon in vorhergehenden Untersuchungen mit ähnlichen Fütterungsbedingungen eindeutig gezeigt wurde, daß es unter Ca-Mangel zu einem Anstieg der PTH-Konzentration im Plasma dieser Ziegen kommt (KÄPPNER 1993, RÜBELT 1995). Dies deutet auf eine PTH-unabhängige Regulation der renalen P-Ausscheidung bei Wiederkäuern hin. Diese Vermutung wird von Untersuchungen von ALEXANDER und NIXON (1969) und CLARK et al. (1975) gestützt. Trotz PTH-Infusion kam es bei den untersuchten Schafen zu keiner Veränderung der renalen  $P_i$ -Ausscheidung.

Daß es trotz der geringen renalen  $P_i$ -Ausscheidung unter Ca-Mangel zu keiner Hyperphosphatämie kam, könnte auf die hohe endogene  $P_i$ -Sekretion mit dem Speichel zurückzuführen sein. Untersuchungen von CLARK et al. (1973), TOWNS et al. (1978), SCOTT und BEASTALL (1978), CHALLA und BRAITHWAITE (1988c) und WIDIYONO et al. (1998) zeigen, daß eine positive lineare Beziehung zwischen der  $P_i$ -Konzentration im Plasma und der  $P_i$ -Konzentration im Speichel von Wiederkäuern besteht. Erst ab einer Plasma- $P_i$ -Konzentration von  $3\text{-}5\text{ mmol l}^{-1}$  steigt die Speichel- $P_i$ -Konzentration nur noch wenig an und stellt sich trotz weiterer Konzentrationserhöhungen im Plasma auf einen Maximalwert ein.

Im Spezies-Vergleich weisen Schaf und Schwein im Vergleich zur Ziege eine um 30-50 % niedrigere maximale Transportkapazität auf. Diese unterschiedlichen Transportkapazitäten unter adäquater P-Versorgung spiegeln sich auch in den in Tab.1 aufgeführten renalen Ausscheidungsraten von  $P_i$  über die Niere wider.

Auch für die  $K_m$ -Werte lassen sich Speziesunterschiede beobachten. So liegt bei beiden Wiederkäuerspezies die  $P_i$ -Affinität des Transportsystems um 2,5-5-fach niedriger als die beim Schwein gemessene. Allerdings dürften diese Affinitäts-Unterschiede keine Rolle für die Gesamtkapazität des Transportsystems spielen. Aufgrund der freien Filtrierbarkeit von  $P_i$ -Anionen muß die  $P_i$ -Konzentration im Ultrafiltrat in der selben Größenordnung liegen wie im Blut, also  $\approx 2\text{ mmol l}^{-1}$  und damit weit oberhalb der halbmaximalen Sättigung der  $P_i$ -Transportsysteme aller drei Spezies.

Tab.8 Kinetische Parameter der Na<sup>+</sup>-abhängigen P<sub>i</sub>-Aufnahme in BSMV in Abhängigkeit von der P<sub>i</sub>-Konzentration (21°C, pH 7,4).

Spezies	Inkubation [s]	V <sub>max</sub> [nmol/mg Protein <sup>-1</sup> ·10s <sup>-1</sup> ]	K <sub>m</sub> [mmol/l <sup>-1</sup> ]	Autor
bovine renal epithelial cell line NBL-1 <sup>a</sup>	180	Kontrolle: 0,16* P-Depletion: 0,35* <sup>1</sup>	Kontrolle: 0,036 ± 0,007 P-Depletion: 0,017 ± 0,003	HELPS et al. (1991)
Schwein <sup>a</sup>	15	Kontrolle: 0,73* P-Depletion: 1,87*	Kontrolle: 0,089 P-Depletion: 0,061	BARRETT et al. (1980)
Schwein <sup>c</sup>	2-4	Kontrolle: 2,14* Rachitis: 1,19*	Kontrolle: 0,239 Rachitis: 0,252	BRANDIS et al. (1987)
Kaninchen <sup>a</sup>	20	Kontrolle: 0,46* P-Depletion: 0,985*	Kontrolle: 0,063 P-Depletion: 0,072	CHENG et al. (1983)
Schaf <sup>1,b</sup>	5	Kontrolle: 0,141* P-Depletion: 0,242*	Kontrolle: 0,2 ± 0,03 P-Depletion: 0,23 ± 0,05	PENNY (1991)

Spezies	Inkubation [s]	$V_{\max}$ [nmol/mg Protein <sup>-1</sup> ]	$K_m$ [mmol l <sup>-1</sup> ]	Autor
Ratte <sup>d</sup>	15	7,2*	0,08	HOFFMANN et al. (1976)
Ratte <sup>b</sup>	10	14,16	1,392	BURCKHARDT et al. (1981)
Ratte <sup>b</sup>	10	Kontrolle: 1,31 ± 0,66 P-Depletion: 4,99 ± 1,68	Kontrolle: 0,86 ± 0,21 P-Depletion: 0,88 ± 0,1	STORELLI et al. (1980)
Ratte <sup>a,+</sup>		2,09*	0,036	LEVINE et al. (1983)

\*  $V_{\max}$ -Werte auf 10 s umgerechnet; <sup>a</sup> P<sub>i</sub>-Konz. 0-1,0 mmol l<sup>-1</sup>; <sup>b</sup> P<sub>i</sub>-Konz. 0-2,0 mmol l<sup>-1</sup>; <sup>c</sup> P<sub>i</sub>-Konz. 0-3,0 mmol l<sup>-1</sup>; <sup>d</sup> P<sub>i</sub>-Konz. 0-1,0 mmol l<sup>-1</sup>; <sup>1</sup> 39°C; <sup>+</sup> pH 8,5

### 5.3.2 Einfluß von Na<sup>+</sup>

Da ein Cotransportsystem (wie der Na<sup>+</sup>/P<sub>i</sub>-Cotransporter Typ II) prinzipiell über Veränderungen der Transportkinetiken beider Substrate reguliert werden kann, wurde die Na<sup>+</sup>-Sensitivität des Systems ebenfalls näher untersucht. Dazu wurde bei konstanter P<sub>i</sub>-Konzentration die P<sub>i</sub>-Aufnahme als Funktion der Na<sup>+</sup>-Konzentration gemessen. Aus dieser Beziehung ergibt sich die Na<sup>+</sup>-Konzentration, bei der die P<sub>i</sub>-Aufnahme halbmaximal ist ( $K_{[0,5]Na}$ ). Damit ist der  $K_{[0,5]Na}$ -Wert ein Maß für die Na<sup>+</sup>-Sensitivität des P<sub>i</sub>-Transportsystems.

Der aus der Kinetik der  $\text{Na}^+$ -Bindungsstelle errechnete apparente  $V_{\max}$ -Wert lag bei den P-depletierten Ziegen um ca. 50 % über dem für Kontroll- und Ca-depletierten Ziegen. Aufgrund der hohen Streuung konnte dieser Unterschied statistisch aber nicht abgesichert werden. Die Zunahme der  $V_{\max,app}$  von  $1,37 \pm 0,57 \text{ nmolmg}^{-1} \text{ Protein} \cdot 10\text{s}^{-1}$  auf  $2,89 \pm 2,21 \text{ nmolmg}^{-1} \text{ Protein} \cdot 10\text{s}^{-1}$  bei alimentärem P-Mangel liegt in ähnlicher Größenordnung wie die von CAVERZASIO et al. (1987) bei Ratten beschriebenen Werte ( $V_{\max,app}$  Kontrolle:  $1,794 \pm 0,198 \text{ nmolmg}^{-1} \text{ Protein} \cdot 10\text{s}^{-1}$ ,  $V_{\max,app}$  P-Depletion:  $2,964 \pm 0,362 \text{ nmolmg}^{-1} \text{ Protein} \cdot 10\text{s}^{-1}$ ). Die Zunahme der  $\text{Na}^+$ -Transportkapazität bei P-Depletion entspricht damit dem Verhalten der  $V_{\max}$ -Werte der  $\text{P}_i$ -Transportraten. Dies unterstützt die schon vorher diskutierte Vermutung, daß die gesteigerte Transportkapazität für  $\text{P}_i$  tatsächlich aus einem vermehrten Einbau von  $\text{Na}^+/\text{P}_i$ -Cotransportern resultiert.

Die Ca-Depletion übte bei den Ziegen, wie schon auf die  $\text{P}_i$ -Transportkapazität ( $V_{\max}$ ) des  $\text{Na}^+/\text{P}_i$ -Cotransporters, keinen nennenswerten Effekt auf die  $\text{Na}^+$ -Transportkapazität ( $V_{\max,app}$ ) aus. Dieser Befund kann als ein weiterer Hinweis dafür gewertet werden, daß der renale  $\text{P}_i$ -Transport beim Wiederkäuer PTH-unabhängig reguliert wird. Im Gegensatz dazu konnten BRANDIS et al. (1987) bei rachitischen Ferkeln, wahrscheinlich als Folge des erhöhten PTH-Spiegels, eine Abnahme der  $V_{\max,app}$  auf  $0,27 \text{ nmolmg}^{-1} \text{ Protein} \cdot 10\text{s}^{-1}$  gegenüber den Kontrollferkeln mit  $0,74 \text{ nmolmg}^{-1} \text{ Protein} \cdot 10\text{s}^{-1}$  verzeichnen.

Die  $\text{Na}^+$ -Sensitivität des renalen  $\text{P}_i$ -Transporters von Schaf und Ziege wurde weder durch Ca- noch durch  $\text{P}_i$ -Mangel beeinflusst.

Bei Schafen hatte die P-Depletion keinen Einfluß auf die  $V_{\max,app}$ - und  $K_{[0,5],app}$ -Werte. Dies steht in Übereinstimmung mit den  $V_{\max}$ - und  $K_m$ -Werten der Kinetik der  $\text{Na}^+$ -abhängigen  $\text{P}_i$ -Aufnahme. Die möglichen Gründe für das Fehlen eines Fütterungseinflusses wurden bereits diskutiert.

Vergleicht man die  $\text{Na}^+$ -Transportkapazität des renalen  $\text{Na}^+/\text{P}_i$ -Cotransporters der einzelnen Spezies miteinander, so zeigt sich, daß die  $V_{\max,app}$ -Werte der Ziegen si-

gnifikant höher liegen als die von Schafen und Schweinen. Dies spiegelt die schon unter adäquater P-Versorgung hohe renale  $P_i$ -Resorption und die damit verbundene geringe  $P_i$ -Exkretion von Wiederkäuern im Vergleich zu monogastrischen Tieren (siehe Tab.1) wider.

Die hohe renale  $P_i$ -Resorption bei Wiederkäuern macht auch bei eher teleologischer Betrachtung Sinn. Der Verdauungstrakt von Wiederkäuern reflektiert eine Adaptation an die phylogenetische Ausbreitung von Gräsern und den damit verbundenen Evolutionsdruck, dieses Pflanzenmaterial zu verdauen. Zur Aufrechterhaltung eines effizienten mikrobiellen Stoffwechsels im Pansen mußte eine ausreichende Versorgung der Mikroorganismen mit Phosphor gewährleistet sein. Da das aufgenommene Pflanzenmaterial arm an Phosphor ist, mußten die renalen  $P_i$ -Verluste möglichst gering gehalten werden, um in der Lage zu sein entsprechende Mengen an  $P_i$  mit dem Speichel in den Pansen zu sezernieren.

Die Affinität des Na/ $P_i$ -Cotransportsystems für  $Na^+$ -Ionen war bei beiden Wiederkäuerspezies geringer als beim Schwein. Der Unterschied war jedoch nur zwischen Ziege ( $96 \text{ mmol l}^{-1}$ ) und Schwein ( $61 \text{ mmol l}^{-1}$ ) signifikant. Die  $Na^+$ -Konzentration im proximalen Tubulus beträgt ca.  $140 \text{ mmol l}^{-1}$ . Das könnte bedeuten, daß sowohl bei der Ziege als auch beim Schwein unter physiologischen Bedingungen die  $Na^+$ -Bindung schon maximal wäre.

Die in der vorliegenden Untersuchung für Schwein ermittelte  $K_{[0,5], \text{app}}$  liegt deutlich unter dem von BRANDIS et al. (1987) für Ferkel angegebenen Wert ( $112,6 \text{ mmol l}^{-1}$ ), entspricht aber dem von HOFFMANN et al. (1976) für Ratten beschriebenen  $K_{[0,5], \text{app}}$ -Wert von  $60 \text{ mmol l}^{-1}$ . CAVERZASIO et al. (1987) fanden dagegen bei Ratten einen  $K_{[0,5], \text{app}}$ -Wert von  $149,1 \text{ mmol l}^{-1}$ . Diese Unterschiede zwischen den von verschiedenen Arbeitsgruppen beschriebenen  $K_{[0,5], \text{app}}$ -Werten können mit den unterschiedlichen Präparationsbedingungen, wie bereits diskutiert, erklärt werden.

Der Kurvenverlauf der  $P_i$ -Aufnahme als Funktion der  $Na^+$ -Konzentration (Abb.12) deutet auf eine sigmoidale Beziehung zwischen  $P_i$ -Aufnahme und  $Na^+$ -Konzentration

hin. Dieses kann dadurch erklärt werden, daß mehr als ein  $\text{Na}^+$ -Ion an dem Transport eines  $\text{P}_i$ -Anions beteiligt ist.

In der vorliegenden Studie konnte bei allen Tieren unabhängig von der Spezies und der Fütterung diese sigmoidale Beziehung beobachtet werden. Im Gegensatz dazu berichteten CHENG et al. (1983) eine Abhängigkeit dieser Beziehung von der P-Versorgung. Bei P-depletierten Kaninchen beobachteten sie einen sigmoidalen Verlauf der  $\text{Na}^+$ -Kinetik und bei hoher P-Versorgung einen hyperbolischen Kurvenverlauf, was auf eine Modulation des Transporters selbst durch die P-Versorgung hindeuten würde. Dieser Fütterungseinfluß auf den Verlauf der  $\text{P}_i$ -Aufnahme als Funktion der  $\text{Na}^+$ -Konzentration wurde allerdings von keiner anderen Arbeitsgruppe beschrieben.

Durch Umformung der  $\text{Na}^+$ -Kinetik nach Hill läßt sich ein sogenannter Hill-Koeffizient ( $n_{\text{app}}$ ) berechnen, der als Maß für die am Transport beteiligten Bindungsstellen gilt. Die Ergebnisse der Hill-Plots (Tab.7) sprechen dafür, daß bei einem pH von 7,4 (innen und außen) mehr als zwei  $\text{Na}^+$ -Ionen mit jeweils einem  $\text{P}_i$  in die BSMV aufgenommen werden. Dieses spricht für einen elektrogenen Transport unter In-vivo-Bedingungen, der durch die negative Ladung des Zellinneren unterstützt würde. Zu ähnlichen Annahmen kamen MURER und BIBER (1997) in Untersuchungen am in Oozyten von *X. Laevis* exprimierten  $\text{Na}^+/\text{P}_i$ -Cotransporter Typ II.

#### **5.4 Strukturelle Charakterisierung der $\text{Na}^+/\text{P}_i$ -Cotransporter von Ziege, Schaf und Schwein**

Die funktionellen Daten, der untersuchten  $\text{P}_i$ -Transportsysteme in der renalen BSM von Ziege, Schaf und Schwein zeigen einen  $\text{Na}^+/\text{P}_i$ -Cotransport. Allerdings lassen diese Daten keinerlei Rückschluß auf strukturelle Homologien zu. Die in der RT-PCR mit für den  $\text{Na}^+/\text{P}_i$ -Cotransporter Typ II spezifischen Primern amplifizierten Fragmente lieferten die ersten Hinweise auf eine strukturelle Verwandtschaft der  $\text{P}_i$ -Transportsysteme von Ziege, Schaf und Schwein mit dem  $\text{Na}^+/\text{P}_i$ -Cotransporter Typ

II der Ratte. Die anschließende Sequenzierung dieser PCR-Fragmente ergab für die Aminosäuresequenz Homologien von 89%-98%.

Trotz einer Homologie von 89% zwischen Schaf bzw. Ziege und Ratte gibt es deutliche funktionelle Unterschiede, die sich in einer unterschiedlichen maximalen Transportkapazität und Affinität des Transportproteins zeigen. Auch die hormonelle Regulation des renalen  $P_i$ -Transportes weist deutliche Unterschiede zwischen Wiederkäuern und monogastrischen Tieren auf. Während bei Ratten gezeigt werden konnte, daß PTH zu einer endozytotischen Internalisierung und somit zu einer verminderten Präsenz von  $Na^+/P_i$ -Cotransportern in der apikalen Membran der Tubulusepithelzelle führt (LEVI et al. 1996), scheint PTH beim Wiederkäuer nicht an der Regulation der  $P_i$ -Ausscheidung beteiligt zu sein (ALEXANDER und NIXON 1969, CLARK et al. 1975).

Die größte Anhäufung von Aminosäureaustauschern befindet sich im Bereich eines postulierten cytosolischen Loops zwischen M3 und M4. Möglicherweise sind diese Unterschiede in der Aminosäuresequenz für die beobachteten Affinitätsunterschiede des Transporters bei den einzelnen Spezies verantwortlich. Diese Hypothese könnte allerdings nur durch gezielte Mutagenese der cDNA, Expression des mutierten Transporterproteins in einem geeigneten Expressionssystem und anschließenden Funktionsuntersuchungen verifiziert werden.

Die mutmaßliche Phosphorylierungsstelle für Proteinkinase C und die potentiellen N-Glycosylierungsstellen des  $Na^+/P_i$ -Cotransporter Typ II der Ratte sind auch in der Aminosäuresequenz von Ziege, Schaf und Schwein zu finden, d.h. dieser Sequenzabschnitt liefert keinen Hinweis auf eine mögliche Ursache für die teilweise unterschiedliche hormonelle Regulation des  $P_i$ -Transportes bei Wiederkäuern und monogastrischen Tieren.

Um Hinweise zur Erklärung für die funktionellen und regulatorischen Unterschiede zwischen Wiederkäuern und monogastrischen Tieren zu erhalten, muß sicherlich die molekulare Struktur des gesamten Transportproteins identifiziert werden. Mit einem klonierten renalen  $Na^+/P_i$ -Cotransporter von Ziege und Schaf könnten dann quantitative Untersuchungen zur Genexpression bei Ratte bzw. Schaf und Ziege durchgeführt werden. Durch gerichtete Mutagenese und Chimärenbildung könnten die strukturellen Unterschiede auf ihre Funktion hin untersucht werden. Schließlich

sollte nicht unerwähnt bleiben, daß Untersuchungen zur Modulation des renalen P-Transportes über akzessorische Proteine weitere Aufklärung der unterschiedlichen Regulationsprozesse liefern könnte.

## 6. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die kinetischen Parameter des renalen  $P_i$ -Transportsystems bei Ziegen und Schafen und ein möglicher Einfluß der P- und Ca-Homöostase auf die Transporteigenschaften untersucht. Für die Transportuntersuchungen wurden Bürstensaummembranvesikel (BSMV) verwendet, die mittels  $Mg^{2+}$ -EGTA-Präzipitation und anschließender Differentialzentrifugation aus NierenCortices von 3-4 Monate alten Ziegen- und Schaflämmern isoliert wurden. Die Bestimmung der  $P_i$ -Aufnahme in die BSMV erfolgte mittels Schnellfiltration und  $^{32}P$  als Tracer. Um methodisch vergleichbare Daten für eine monogastrische Spezies zu erhalten, wurden Kontrollversuche an Schweinen durchgeführt.

Mit Hilfe von RT-PCR und DNA-Sequenzierung wurde geprüft, ob es sich bei dem renalen,  $Na^{+}$ -abhängigen Phosphattransportsystem von Ziege, Schaf und Schwein um den in der Rattenniere nachgewiesenen  $Na^{+}/P_i$ -Cotransporter Typ II handelt.

Die Untersuchungen führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Die maximale  $P_i$ -Aufnahmeraten ( $V_{max}$ ) des renalen  $Na^{+}$ -abhängigen  $P_i$ -Transportsystems von Ziegen war unabhängig von der Ca-Versorgung (Kontrolle:  $1,98 \pm 1,21 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ Protein} \cdot 10 \text{ s}^{-1}$ ; Ca-Depl.:  $1,93 \pm 0,99 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ Protein} \cdot 10 \text{ s}^{-1}$ ), stieg aber in Folge der P-Depletion um ca. 50 % an (P-Depl.:  $2,99 \pm 2,2 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ Protein} \cdot 10 \text{ s}^{-1}$ ). Allerdings war dieser Effekt aufgrund der hohen interindividuellen Streuung in der P-depletierten Gruppe nicht signifikant.

Die  $P_i$ -Affinitäten ( $K_m$ ) des  $P_i$ -Transportsystems wurden durch keine der Fütterungsvarianten signifikant beeinflusst (Kontrolle:  $0,34 \pm 0,14 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ; P-Depl.:  $0,35 \pm 0,07 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ; Ca-Depl.:  $0,28 \pm 0,17 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ).

2. Bei Schafen hatte die P-Depletion weder auf die  $V_{max}$ -Werte (Kontrolle:  $1,39 \pm 0,56 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ Protein} \cdot 10 \text{ s}^{-1}$ ; P-Depl.:  $1,03 \pm 0,6 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ Protein} \cdot 10 \text{ s}^{-1}$ ) noch auf die  $K_m$ -Werte (Kontrolle:  $0,55 \pm 0,21 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ; P-Depl.:  $0,33 \pm 0,29 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) einen signifikanten Einfluß.

3. Die  $V_{\max}$ -Werte der Ziegen lagen um 30-50 % höher als die für Schaf und Schwein ermittelten. Bei beiden Wiederkäuerspezies war die  $K_m$  um das 2,5-5-fache geringer als beim Schwein ( $p < 0,01$ ).
4. Bei alimentärem P-Mangel stieg die  $\text{Na}^+$ -Transportkapazität ( $V_{\max,app}$ ) des renalen  $\text{Na}^+$ -abhängigen  $\text{P}_i$ -Transportsystems der Ziegen um ca. 50 % an (Kontrolle  $1,37 \pm 0,57 \text{ nmolmg}^{-1} \text{ Protein} \cdot 10 \text{ s}^{-1}$ ; P-Depl.:  $2,89 \pm 2,21 \text{ nmolmg}^{-1} \text{ Protein} \cdot 10 \text{ s}^{-1}$ ), dieser Effekt war allerdings aufgrund der hohen Streuung innerhalb dieser Gruppe nicht signifikant. Die Ca-Versorgung übte keinen Einfluß auf die  $V_{\max,app}$ -Werte aus (Ca-Depl.:  $1,3 \pm 0,96 \text{ nmolmg}^{-1} \text{ Protein} \cdot 10 \text{ s}^{-1}$ ). Die Affinität des  $\text{P}_i$ -Transportsystems für  $\text{Na}^+$ -Ionen ( $K_{[0,5]\text{Na}}$ ) wurde durch keine der Fütterungsvarianten signifikant beeinflusst (Kontrolle:  $95,9 \pm 16,3 \text{ mmol l}^{-1}$ ; P-Depl.:  $128,1 \pm 43,1 \text{ mmol l}^{-1}$ ; Ca-Depl.:  $114,6 \pm 35,4 \text{ mmol l}^{-1}$ ).
5. Bei Schafen hatte die P-Depletion weder auf die  $V_{\max,app}$ -Werte (Kontrolle:  $0,43 \pm 0,1 \text{ nmolmg}^{-1} \text{ Protein} \cdot 10 \text{ s}^{-1}$ ; P-Depl.:  $0,57 \pm 0,16 \text{ nmolmg}^{-1} \text{ Protein} \cdot 10 \text{ s}^{-1}$ ) noch auf die  $K_{[0,5]\text{Na}}$ -Werte (Kontrolle:  $81,0 \pm 10,0 \text{ mmol l}^{-1}$ ; P-Depl.:  $93,8 \pm 14,5 \text{ mmol l}^{-1}$ ) einen signifikanten Einfluß.
6. Die bei Ziegen ermittelte  $V_{\max,app}$  ( $1,37 \pm 0,57 \text{ nmolmg}^{-1} \text{ Protein} \cdot 10 \text{ s}^{-1}$ ) lag signifikant höher ( $p < 0,05$ ) als bei Schafen ( $0,43 \pm 0,1 \text{ nmolmg}^{-1} \text{ Protein} \cdot 10 \text{ s}^{-1}$ ) und Schweinen ( $0,58 \pm 0,09 \text{ nmolmg}^{-1} \text{ Protein} \cdot 10 \text{ s}^{-1}$ ). Die  $K_{[0,5]\text{Na}}$ -Werte waren bei beiden Wiederkäuerspezies geringer, unterschieden sich jedoch nur zwischen Ziege ( $95,9 \pm 16,3 \text{ mmol l}^{-1}$ ) und Schwein ( $61,0 \pm 1,06 \text{ mmol l}^{-1}$ ) signifikant ( $p < 0,05$ ).
7. Für alle Spezies konnte ein Hill-Koeffizient  $> 2$  berechnet werden. Dies deutet auf einen elektrogenen,  $\text{Na}^+$ -abhängigen  $\text{P}_i$ -Transport hin. Im Speziesvergleich lag der für die Schafe berechnete Hill-Koeffizient ( $2,35 \pm 0,1$ ) signifikant niedriger ( $p < 0,01$ ) als der von Ziegen ( $3,01 \pm 0,33$ ) und Schweinen ( $3,32 \pm 0,19$ ). Ein signifikanter Einfluß der Fütterung auf die Stöchiometrie konnte weder bei Ziegen noch bei Schafen beobachtet werden.

8. Mit RT-PCR konnten mit für den  $\text{Na}^+/\text{P}_i$ -Cotransporter Typ II spezifischen Primern sowohl in der Schweine- als auch in der Ziegen- und Schafniere entsprechende Fragmente von ca. 768 Basenpaaren amplifiziert werden.

9. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen des klonierten PCR-Fragmentes ergab folgende Homologien: Ziege/Ratte 90%, Schaf/Ratte 89%, Schwein/Ratte 89%, Ziege/Schaf 98%, Ziege/Schwein 94% und Schaf/Schwein 92 %.

Diese Ergebnisse zeigen eine strukturelle Verwandtschaft der  $\text{P}_i$ -Transportsysteme von Ziege, Schaf und Schwein mit dem  $\text{Na}^+/\text{P}_i$ -Cotransporter Typ II der Ratte, aber auch deutliche funktionelle Unterschiede des renalen  $\text{P}_i$ -Transportsystems von Wiederkäuern im Vergleich zu monogastrischen Tieren. In weiteren Untersuchungen sollte die molekulare Struktur des gesamten Transportproteins identifiziert werden, um durch gerichtete Mutagenese die strukturellen Unterschiede auf ihre Funktion hin überprüfen zu können.

## 7. Literaturverzeichnis

**Abdel-Hafeez H.M., M. Manas-Almendros, R. Ross and A.D. Care (1982)**

Effects of dietary phosphorus and calcium on the intestinal absorption of Ca in sheep.  
Br. J. Nutr. 47, 69-77

**Alexander D.P. and D.A. Nixon (1969)**

Effect of parathyroid extract in foetal sheep.  
Biol. Neonat. 14, 117-130

**Amiel C., H. Kuntziger and G. Richet (1970)**

Micropuncture study of handling of phosphate by proximal and distal nephron on normal and parathyroidectomized rat. Evidence for distal reabsorption.  
Pfluegers Arch. 317, 93-109

**Banks J.N. and R.H Smith (1984a)**

True and apparent absorption of phosphate between reticulum and duodenum of the ruminating calf.  
Proc. Nutr. Soc. 43, 8A

**Banks J.N. and R.H Smith (1984b)**

Sites of absorption of magnesium and phosphate in the stomach of ruminating calf.  
Proc. Nutr. Soc. 43, 9A

**Bar A., J. Rosenberg and S. Hurwitz (1983)**

Induced changes in the affinity of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptors in chick intestine.  
FEBS Letters 163, 261-264

**Barlet J.P. (1972)**

The effect of porcine, salmon and human calcitonin on urinary excretion of some electrolytes in sheep.  
J. Endocr. 55, 153-161

**Barlet J.P. and Care (1972)**

The influence of parathyroid hormone on urinary excretion of calcium, magnesium and inorganic phosphorus in sheep.  
Horm. Metab. Res. 4, 315-316

**Barret P.Q., J.M. Gertner and H. Rasmussen (1980)**

Effect of dietary phosphate on transport properties of pig renal microvillus vesicles.  
Am. J. Physiol. 239, F 352-F359

**Baumann K., C. De Rouffignac, N. Roinel, G. Rumrich and K.J. Ullrich (1975)**  
Renal phosphate transport: inhomogeneity of local proximal transport rates and sodium dependence.  
Pfluegers Arch. 356, 287-297

**Baxter L.A. and H.F. De Luca (1979)**  
Stimulation of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-1 $\alpha$ -Hydroxylase by phosphat depletion.  
J. Biol. Chem. 251, 3158-3161

**Baylink D., J. Wergedal and M. Stauffer (1971)**  
Formation, mineralization and resorption of bone in hypophosphatemic rats.  
J. Clin. Invest. 50, 2519-2530

**Beardsworth L.J., P.M. Beardsworth and A.D. Care (1989)**  
The effect of ruminal phosphate concentration on the absorption of calcium, phosphorus and magnesium from the reticulo-rumen of sheep.  
Br. J. Nutr. 61, 715-723

**Beck, L.H. and M. Goldberg (1974)**  
Mechanism of the blunted phosphaturia in saline-loaded thyroparathyroidectomized dogs.  
Kidney intern. 6, 18-23

**Beck J.C. and B. Sacktor (1975)**  
Energetics of the Na<sup>+</sup>-dependent transport of D-glucose in renal brush border membrane vesicles.  
J. Biol. Chem. 250, 8674-8680

**Ben-Ghedalia D., H. Tagari and A. Geva (1982)**  
Absorption by sheep of calcium, magnesium and phosphorus in digesta flowing along the gut of the sheep.  
Br. J. Nutr. 33, 87-94

**Ben-Ghedalia D., H. Tagari, S. Zamwel and A. Bondi (1975)**  
Solubility and net exchange of calcium, magnesium and phosphorus in digesta flowing along the gut of the sheep.  
Br. J. Nutr. 33, 87-94

**Berndt T.J. and F.G. Knox (1992)**  
Renal Regulation of Phosphate Excretion.  
In: Seldin D.W., Giebisch G., eds. The Kidney. Physiology and Pathophysiology. 2nd Ed. New York, Raven Press Ltd., 2511-2532

**BertelootA. and G. Semenza (1990)**  
Advantages and limitations of vesicles for characterization and the kinetic analysis of transport systems.  
In: Methods of Enzymology (S. Fleischer und B. Fleischer, eds.) 192, 409-437, Academic Press, New York

**Biber J., G. Caderas, G. Stange, A. Werner and H. Murer (1993)**

Effect of low phosphate diet on sodium/phosphate cotransport mRNA and protein content and on oocyte expression of phosphate transport.  
Pediatr. Nephrol. 7, 823-26

**Biber J, J. Forgo, and H. Murer (1988)**

Modulation of Na<sup>+</sup>-P<sub>i</sub> cotransport in opossum kidney cells by extracellular phosphate.  
Am. J. Physiol. 22, C155-C161

**Biber J. and H. Murer (1985)**

Na-P<sub>i</sub> cotransport in LLC-PK<sub>1</sub> cells: Fast adaptive response to P<sub>i</sub> deprivation.  
Am. J. Physiol. 249, C430-C434

**Bindels R.J.M., J.A.M. Geertsen and C.H. Van Os (1986)**

Increased transport of inorganic phosphate in renal brush borders of spontaneously hypertensive rats.  
Am. J. Physiol. 250, F 470-F475

**Blank M.E., F. Bode, E. Huland, D.F. Diedrich and K. Baumann (1985)**

Kinetic studies of D-glucose transport in renal brush border membrane vesicles of streptozotocin- induced diabetic rats.  
Biochim. Biophys. Acta 844, 314-319

**Boehncke E., J. Gropp und M. Wandl (1976)**

Zur renalen Elektrolytausscheidung wachsender Mastkälber, 1. Mitteilung: Renale Phosphatausscheidung.  
Zbl. Vet. Med. A 23, 688-696

**Boehncke E., A. Langner und F. Weissmann (1981)**

Zum Phosphat- und Natriumstoffwechsel bei Aufzuchtälbern.  
Zbl. Vet. Med. A. 28, 357-365

**Böntgen-Simonet R. (1993)**

Untersuchungen zur P-Verdaulichkeit und -Retention beim Mastschwein in Abhängigkeit von der P-Aufnahme.  
Inaug.-Diss. med. vet., Tieräztl. Hochsch. Hannover

**Bonilla S.E (1976)**

Phosphorus in nutrition of sheep: composition of body fluids, microbial fermentation and feed intake.  
Davis Univ., California, Thesis

**Bonjour J.P. and J. Caverzasio (1984)**

Phosphate transport in the kidney.  
Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 100, 161-214

**Borle A.B. (1974)**

Calcium and phosphate metabolism.  
Annu. Rev. Physiol. 36, 361-390

**Boxebeld A., L. Gueguen, G. Hannequart and M. Durand (1983)**

Utilization of phosphorus and calcium and minimal maintenance requirement for phosphorus in growing sheep fed a low-phosphorus diet.  
Reprod. Nutr. Devel. 23 (6), 1043-1053

**Braithwaite G.D. (1984)**

Some observations on phosphorus homeostasis and requirements of sheep.  
J. Agric. Sci., Camb., 102, 295-306

**Brandis M., J. Harmeyer, R. Kaune, M. Mohrmann, H. Murer and Z. Zimolo (1987)**

Phosphate transport in brush-border membranes from control and rachitic pig kidney and small intestine.  
J. Physiol. 384, 479-490

**Brazy P.C., R.S. Balaban, S.R. Gullans, L.J. Mandel and V.W. Dennis (1980a)**

Inhibition of renal metabolism: Relative effects of arsenate on sodium, phosphate and glucose transport by the rabbit proximal tubule.  
J. Clin. Invest. 66, 1211-1221

**Brazy P.C., J.W. McKeown, R.H. Harris and V.W. Dennis (1980b)**

Comparative effects of dietary, unilateral nephrectomy, and parathyroid hormone on phosphate transport by the rabbit proximal tubule.  
Kidney Int. 17, 788-800

**Breves G. and H. Höller (1987a)**

Effects of dietary phosphorus depletion in sheep on dry matter and organic matter digestibility.  
J. Am. Physiol. Anim. Nutr. 58, 280-286

**Breves G. and H. Höller (1987b)**

Gastrointestinal nitrogen turnover in sheep fed non-protein nitrogen and a phosphorus-deficient diet.  
In: Isotope aided studies on non-protein-nitrogen and agroindustrial byproducts utilization by ruminants. International Atomic Energy Agency, pp. 19-29, IAEA Vienna Proc. Series, STI/PUB/748

**Breves G., H. Höller, P. Packheiser, G. Gäbel and H. Martens (1988)**

Flux of inorganic phosphate across the sheep rumen wall in vivo and in vitro.  
Quart. J. Exp. Physiol. 73, 343-351

**Breves G., C. Rosenhagen and H. Höller (1987)**

Die Sekretion von anorganischem Phosphor mit dem Speichel bei P-depletierten Schafen (Saliva secretion of anorganic phosphorus in phosphorus-depleted sheep).  
J.Vet.Med. A 34, 42-47

**Breves G., R. Ross and H. Höller (1985)**

Dietary depletion in sheep: effects on plasma inorganic phosphorus, calcium, 1,25-(OH)<sub>2</sub>-Vit-D<sub>3</sub> and alkaline phosphatase and on gastrointestinal P and Ca balances.  
J. Agric. Sci., Camb., 105, 623-629

**Breves G. and B. Schröder (1991)**

Comperative aspects of gastrointestinal phosphorus metabolism.  
Nutr. Res. Rev. 4, 125-140

**Bruce J., E.D. Goodall, R.N.B. Kay, A.T. Phillipson and L.E. Vowles (1966)**

The flow of organic and inorganic materials through the alimentary tract of the sheep.  
Proc. Roy. Soc. B 166, 46-62

**Brunette M.G., M. Chan, U. Maag and R. Béliveau (1984)**

Phosphate uptake by superficial and deep nephron brush border membranes. Effect of the dietary phosphate and parathyroid hormone.  
Pfluegers Arch. 400, 356-362

**Burckhardt G., H. Stern and H. Murer (1981)**

The influence of pH on phosphate transport in rat renal brush border membrane vesicles.  
Pfluegers Arch. 390, 191-197

**Busch A.E., J. Biber, H. Murer and F. Lang (1996a)**

Electrophysiological insights of type I and II Na/Pi transporters.  
Kidney Int. 49, 986-987

**Busch A.E., A. Schuster, S. Waldegger, C.A. Wagner, G. Zempel, S. Broer, J. Biber, H. Murer and F. Lang (1996b)**

Expression of a renal type I sodium/phosphate-transporter (NaPi-1) induces a conductance in *Xenopus* oocytes permeable for organic and inorganic anions.  
Proc. Natl. Acad. Sic. USA 93, 5347-5351

**Caverzasio J., C.D.A. Brown, J. Biber, J. P. Bonjour and H. Murer (1985)**

Adaptation of phosphate transport in phosphate-deprived LLC-PK<sub>1</sub> cells.  
Am. J. Physiol. 248, F122-F127

**Carverzasio J., H. Murer, H. Fleisch and J.P. Bonjour (1982)**

Phosphate transport in brush border membrane vesicles isolated from renal cortex of young growing and adult rats. Comparison with the whole kidney data.  
Pfluegers Arch. 394, 217-221

**Carverzasio J., G. Danisi, R.W. Straub, H. Murer and J.P. Bonjour (1987)**

Adaptation of phosphate transport to low phosphate diet in renal and intestinal brush-border vesicles: Influence of sodium and pH.  
Pfluegers Arch. 409, 333-336

**Challa J. and G.D. Braithwaite (1988a)**

Phosphorus and calcium metabolism in growing calves with special emphasis on phosphorus homeostasis. 1. Studies of the effect of changes in the dietary phosphorus intake on phosphorus and calcium metabolism.  
J. Agric. Sci., Camb., 110, 573-581

**Challa J. and G.D. Braithwaite (1988b)**

Phosphorus and calcium metabolism in growing calves with special emphasis on phosphorus homeostasis. 2. Studies of the effect of different levels of phosphorus, infused abomasally, on phosphorus metabolism.  
J. Agric. Sci., Camb., 110, 583-589

**Challa J. and G.D. Braithwaite (1988c)**

Phosphorus and calcium metabolism in growing calves with special emphasis on phosphorus homeostasis. 3. Studies of the effect of continuous intravenous infusion of different levels of phosphorus in ruminating calves receiving adequate dietary phosphorus.  
J. Agric. Sci., Camb., 110, 591-595

**Challa J., G.D. Braithwaite and M.S. Dhanoa (1989)**

Phosphorus homeostasis in growing calves.  
J. Agric. Sci., Camb., 112, 217-226

**Cheng L., C.T. Liang and B. Sacktor (1983)**

Phosphate uptake by renal membrane vesicles of rabbits adapted to high and low phosphorus diets.  
Am. J. Physiol. 245 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 14), F 175-F180

**Cheng L. and B. Sacktor (1981)**

Sodium gradient-dependent phosphate transport in renal brush border membrane vesicles.  
J. Biol. Chem. 256, 1556-1564

**Clark R.C., O.E. Budtz-Olsen, R.B. Cross, P. Finnermore and P.A. Bauert (1973)**

The importance of the salivary glands in the maintenance of phosphorus homeostasis in the sheep.  
Aust. J. Agric. Res. 24, 913-919

**Clark R.C., T.J. French, A.M. Beal, R.B. Cross and O.E. Budtz-Olsen (1975)**

The acute effect of intravenous infusion of parathyroid hormone on urine, plasma and saliva in sheep.  
Quart. J. Exp. Physiol. 60, 95-106

**Compton J.S., S. Nelson, R.D. Wright and J.A. Young (1980)**

A micropuncture investigation of electrolyte transport in the parotid glands of sodium-repleted and sodium-depleted sheep.

J. Physiol. Lond. 309, 429-446

**Costanzo L.S., P.R. Sheehe and I.M. Weiner (1974)**

Renal actions of vitamin D in D-deficient rats.

Am. J. Physiol. 226 (6), 1490-1495

**Davicco M.-J., V. Coxam, J. Lefavivre and J.P. Barlet (1992)**

Parathyroid hormone-related peptide increases urinary phosphate excretion in fetal lambs.

Exp. Physiol. 77, 377-383

**Delisle M.C., V. Vacon, S. Giroux, M. Potier, R. Laprade and R. Beliveau (1992)**

Molecular size of the renal sodium/phosphate symporter in native and reconstituted systems.

Biochim. Biophys. Acta 1104, 132-136

**Dennis V.W. and P.C. Brazy (1978)**

Sodium phosphate, glucose, bicarbonate, and alanine interactions in the isolated proximal convoluted tubule of the rabbit kidney.

J. Clin. Invest. 62, 387-397

**Dennis V.W. and P.C. Brazy (1982)**

Divalent anion transport in isolated renal tubules.

Kidney Int. 22, 498-506

**Dennis V.W., E. Bello-Reuss and R.R. Robinson (1977)**

Response of phosphate transport to parathyroid hormone in segments of rabbit nephron.

Am. J. Physiol. 233 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 2) F29-F38

**Dennis V.W., W.W. Stead and J.L. Meyers (1979)**

Renal handling of phosphate and calcium.

Annu. Rev. Physiol. 41, 257-271

**Dennis V.W., P.B. Woodhall and R.R. Robinson (1976)**

Characteristics of phosphate transport in isolated proximal tubule.

Am. J. Physiol. 231, 979-985

**Dillon J. and D. Scott (1979)**

Digesta flow and mineral absorption in lambs before and after weaning.

J. Agric. Sci., Camb., 92, 289-297

**Dousa T.P. (1996)**

Modulation of renal Na-Pi cotransport by hormones acting via genomic mechanism and by metabolic factors.  
Kidney Int. 49, 997-1004

**Dua K, S. Leonhard, H. Martens, S.K. Abbas and A.D. Care (1994)**

Effects of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein on rates of absorption of magnesium, sodium, potassium and phosphate ions from the reticulo-rumen of sheep.  
Exp. Physiol. 79, 408-409

**Dunlay, R. and K.A. Hruska (1990)**

PTH receptor coupling to phospholipase C is an alternative pathway of signal transduction in bone and kidney.  
Am. J. Physiol. 258, F223-F231

**Durand M., B. Bertier, G. Hannequart and L. Gueguen (1982)**

Influence d'une subcarence en phosphate et d'un excès de calcium alimentaire sur la phosphatémie et les teneurs en phosphore et calcium des contenus de rumen du mouton.  
Reprod. Nutr. Dévelop. 22, 865-879

**Enderise B.M. and R.H. Smith (1979)**

Absorption and secretion in omasum of the young steer.  
Ann. Rech. Vet. 10, 354-355

**Enderise B.M. and R.H. Smith (1986)**

Exchanges of magnesium and phosphorus at different sites in the ruminant stomach.  
Archiv für Tierern. 36, 1019-1027  
(Archiv Anim. Nutr. Berlin 36, 1019-1027)

**Engelhardt W.v. and R. Hauffe (1975)**

Funktionen des Blättermagens bei kleinen Hauswiederkäuern.  
IV. Resorption und Sekretion von Elektrolyten (Functions of the omasum in small domestic ruminants. IV. Absorption and secretion of electrolytes).  
J. Vet. Med. A 22, 363-375

**Farries F.E. und J. Krasnodebska (1972)**

Untersuchungen über die Verwertung von Harnstoff bei Wiederkäuern. C. Einsatz halbsynthetischer Rationen. 8. Mitteilung: Zum Einfluß unterschiedlicher P-Versorgung auf den N-Stoffwechsel bei ausschließlicher NPN-Zufuhr.  
Z. Tierphys. Tierernährg. Futtermittelk. 30, 33-47

**Field A.C. (1981)**

Some thoughts on dietary requirements of macro-elements for ruminants.  
Proc. Nutr. Soc. 40, 267-272

**Field A.C., R.L. Coop, R.A. Dingwall and C.S. Munro (1982)**

The phosphorus requirements for growth and maintenance of sheep.  
J. Agric. Sci., Camb., 101, 597-602

**Field A.C., J. Kamphues and J.A. Woolliams (1983)**

The effect of dietary intake of calcium and phosphorus on the absorption and excretion of phosphorus in chimaera-derived sheep.  
J. Agric. Sci., Camb. 101, 597-602

**Field A.C., N.F. Suttle and D.I. Nisbet (1975)**

Effects of diets low in calcium and phosphorus on the development of growing lambs.  
J. Agric. Sci., Camb., 85, 435-442

**Fox J. and A.D. Care (1979)**

The effect of hydroxylated derivatives of vitamin D<sub>3</sub> and extracts of *Solanum malacoxylon* on the absorption of calcium, phosphate and water from the jejunum of pigs.  
Calcif. Tissue Res., 21 Suppl., 147-152

**Fox J. and R. Ross (1985)**

Effects of low phosphorus and low calcium diets on the production and metabolic clearance rates of 1,25-dihydroxycholecalciferol in pigs.  
J. Endocr. 105, 169-173

**Freeman D., S. Bartlett, G.K. Radda and B. Ross (1983)**

Energetics of sodium transport in the kidney. Saturation transfer <sup>31</sup>P-NMR.  
Biochim. Biophys. Acta 762, 325-336

**Goldfarb S. (1980)**

Juxtamedullary and superficial nephron phosphate reabsorption in the cat.  
Am. J. Physiol. 239 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 8) F336-F342

**Grace N.D. (1972)**

Studies on the movement of magnesium, calcium, phosphorus, sodium and potassium across the gut wall of sheep fed fresh pasture.  
Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod. 32, 77-84

**Grace N.D., M.J. Ulyatt and J.C. Macrae (1974)**

Quantitative digestion of fresh herbage by sheep. III. The movement of Mg, Ca, P, K und Na in the digestive tract.  
J. Agric. Sci., Camb., 82, 321-330

**Grace N.D., E. Davies and J. Munroe (1977)**

Association of Mg, Ca, P, and K with various fractions in the diet, digesta and faeces of sheep fed fresh pasture.  
N. Z. J. Agric. Res. 20, 441-448

**Gray R.W., T.C. Garthwaite and L.S. Phillips (1983)**

Growth hormone and triiodothyronine permit an increase in plasma  $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  concentrations in response to dietary phosphate deprivation in hypophysectomized rats. *Calcif. Tissue Intern.* 35, 100-106

**Greene L.W., K.E. Webb Jr. and J.P. Fontenot (1983)**

Effect of potassium level on site of absorption of magnesium and other macroelements in sheep. *J. Anim. Sci.* 56, 1214-1221

**Grinstein S., R.J. Turner, M. Silverman and A.Rothstein (1980)**

Inorganic anion transport in kidney and intestinal brush border and basolateral membranes. *Am. J. Physiol.* 238 (Renal Fluid Electrlyte Physiol.), F 452-F460

**Haas J.A., T. Berndt and F.G. Knox (1978)**

Nephron heterogeneity of phosphate reabsorption. *Am. J. Physiol.* 234 (Renal Fluid Electrolyte Physiol.3) F 287-F290

**Hagenbuch B. and H. Murer (1986)**

Phosphate transport across the basolateral membrane from rat kidney cortex: sodium-dependence? *Pflugers Arch.* 407, S 149-155

**Hammerman M.R. (1986)**

Phosphate transport across renal proximal tubular cell membranes. *Am. J. Physiol.* 251, F385-F398

**Hammerman M.R. and Hruska K.A. (1982)**

Cyclic AMP-dependent protein phosphorylation in canine renal brush-border membrane vesicles is associated with decreased phosphate transport. *J. Biol. Chem.* 257, 992-999

**Hayes G., A. Busch, M. Lötscher, S. Waldegger, F. Lang, F. Verrey, J. Biber and H. Murer (1994)**

Role of N-linked glycosylation in rat renal Na/Pi-cotransport. *J. Biol. Cem.* 269, 24143-24149

**Hayes G., A. Busch, F. Lang, J. Biber and H. Murer (1995)**

Protein kinase C consensus sites and the regulation of renal Na/Pi-cotransport (Na/Pi) expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Pfluegers Arch.* 430, 819-824

**Helps C.R. and J. McGivan (1991)**

Adaptive regulation of  $\text{Na}^+$ -dependent phosphate transport in the bovine renal epithelial cell line NBL-1. *Eur. J. Biochem.* 200, 797-803

**Hilden S.A., C.A. Johns, W.B. Guggino and N.E. Madias (1989)**

Techniques for isolation of brush-border and basolateral membrane vesicles from dog kidney cortex.

Biochim. Biophys. Acta 983, 77-81

**Hodge R.W. (1973)**

The effect of level of calcium intake on utilization of phosphorus by the pre-ruminant lamb.

Aust. J. Agric. Res. 24, 921-926

**Höller H., A. Figge, J. Richter and G. Breves (1988)**

Nettoabsorption von Calcium und anorganischem Phosphat aus dem perfundierten Colon und Rectum von Schafen (Calcium and inorganic phosphate net absorption from the sheep colon and rectum perfused in vivo).

J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 58, 9-15

**Hoffmann N.M., M. Thees and R. Kinne (1976)**

Phosphate transport by isolated renal brush border vesicles.

Pfluegers Arch. 362, 147-156

**Hopfer U. (1989)**

Tracer studies with isolated membrane vesicles.

In: Methods in Enzymology (S. Fleischer und B. Fleischer, eds.) 172, 313-331, Academic Press, New York

**Hruska K.A. and M.R. Hammermann (1981)**

Parathyroid hormone inhibition of phosphate transport in renal brush border vesicles from phosphate-depleted dogs.

Biochim. Biophys. Acta 645, 351-356

**Hughes M.R., P.F. Brumbaugh, M.R. Haussler, J.E. Wergedal and D.J. Baylink (1975)**

Regulation of serum  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin  $D_3$  by calcium und phosphate in the rat.

Science 190, 578-580

**Jaques K., D.L. Harmon, W.J. Croom and W.M. Hagler Jr. (1989)**

Estimating salivary flow and ruminal water balance of intake, diet, feeding pattern and slaframine.

J. Dairy Sci. 72, 443-452

**Käppner H. (1993)**

In-vitro-Untersuchungen zum intestinalen Phosphat-Transport bei kleinen Wiederkäuern.

Inaug.-Diss. med. vet., JLU Giessen

**Kay R.N.B. (1960)**

The rate of flow and composition of various salivary secretions in sheep and calves.

J. Physiol. Lond. 150, 515-537

**Kempson S.A. (1996)**

Peptide hormone action on renal phosphate handling.  
Kidney Int. 49, 1005-1009

**Kempson S.A. and T.D. Dousa (1979)**

Phosphate transport across renal cortical brush border membrane vesicles from rats stabilized on a normal, high or low phosphate diet.  
Life Sic. 24, 881-888

**Kempson S.S., M. Lötscher, B. Kaissling, J. Biber, H. Murer and M. Levi (1995)**

Parathyroid hormone action on phosphate transporter mRNA and protein in rat renal proximal tubules.  
Am. J. Physiol. 268, F784-F791

**Kienzle E. und S. Wilms-Eilers (1993)**

Untersuchungen zur Struvitsteindiätetik: 2. Einfluß von Ammoniumchlorid und Carbonaten auf den Säure-Basen- und Mineralstoffhaushalt der Katze.  
DTW 100, 399-405

**Knox, F.G. and C. Lechene (1975)**

Distal site of action of parathyroid hormone on phosphate reabsorption.  
Am. J. Physiol. 229, 1556-1560

**Knox F.G., H. Oswald, G.R. Marchand, W.S. Spielman, J.A. Haas, T. Berndt and S.P. Youngberg (1977)**

Phosphate transport along the nephron (Editorial review).  
Am. J. Physiol. 233 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 2) F 261-F268

**Knox F.G., J.A. Haas and A. Haramati (1982)**

Nephron sites of adaptation to changes in dietary phosphate.  
Adv. Exp. Med. Biol. 151, 13-19

**Kooh S.W. (1980)**

Parathyroid hormone responsiveness in the sheep fetus and newborn lamb.  
Can J. Physiol. Pharmacol. 58, 934-939

**Kuntziger H., C. Amiel and C. Gaudebout (1972)**

Phosphate handling by the rat nephron during saline diuresis.  
Kidney Int. 2, 318-323

**Lambert P.P (1964)**

Study of phosphate excretion by the stop-flow technique. Effect of parathyroid hormone.  
Nephron 1, 103-117

**Lang F., R. Greyer, F.G. Knox and H. Oberteithner (1981)**

Factors modulating renal handling of phosphate.  
Renal Physiol. 4, 1-16

**Le Grimellec C., N. Roinel and F. Morel (1974)**

Simultaneous Mg, Ca, P, K, Na and Cl analysis in rat tubular fluid. IV. During acute phosphate plasma loading.  
Pflugers Arch. 346, 189-204

**Levi M., B.M. Baird and P.V. Wilson (1990)**

Cholesterol modulates rat renal brush border membrane phosphate transport.  
J. Clin. Invest. 85, 231-237

**Levi M., S.A. Kompson, M. Lötscher, J. Biber and H. Murer (1996)**

Molecular regulation of renal phosphate transport.  
J. Membrane Biol. 154, 1-9

**Levine B.S., K. Ho, J.A. Kraut, J.W. Coburn and K. Kurokawa (1983)**

Effect of metabolic acidosis on phosphate transport by renal brush border membrane.  
Biochim. Biophys. Acta 727, 7-12

**Lin J.T., K. Szwarz, R. Kinne and C.Y. Jung (1984)**

Structural state of the Na<sup>+</sup>/D-glucose cotransporter in calf kidney brush border membranes. Target size analysis of Na<sup>+</sup>-dependent phlorizin binding and Na<sup>+</sup>-dependent D-glucose transport.  
Biochim. Biophys. Acta 777, 201-208

**Lötscher M, P. Wilson, S. Nguyen, B. Kaissling, J. Biber, H. Murer and M. Levi (1996)**

New aspects of adaptation of rat renal Na-P<sub>i</sub> cotransporter to alterations in dietary phosphate.  
Kidney Int. 49, 1012-1018

**Magagnin S., A. Werner, D. Markovich, V. Sorribas, J. Biber and H. Murer (1993)**

Expression cloning of human and rat renal cortex Na/P<sub>i</sub>-cotransport.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 5979-5983

**Mahler M. (1991)**

Untersuchungen an der Labmagenwand von Schafen: Elektrophysiologische Eigenschaften, transepithelialer Transport von Calcium und Phosphat und Beeinflussung durch kurzkettige Fettsäuren.  
Inaug.-Diss. med. vet., Tierärztl. Hochsch. Hannover

**Manas-Almendros M., R. Ross and A.D. Care (1982)**

Factors affecting the secretion of phosphate in parotid saliva in the sheep and goat.  
Quart. J. Exp. Physiol. 67, 269-280

**Marcovich D., T. Verri, V. Sorribas, J. Forgo, J. Biber and H. Murer (1995)**

Regulation of opossum kidney (OK) cell Na/P<sub>i</sub> cotransport by P<sub>i</sub> deprivation involves mRNA stability.  
Pflugers Arch.-Eur. J. Physiol. 430, 459-463

**Matsui T., Y. Kanagawa, H. Yano and R. Kawashima (1984)**

Effect of calcitonin on salivary phosphorus and calcium excretion in sheep.  
J. Endocrinol. 102, 365-368

**Matsui T., H. Yano and R. Kwashima (1983)**

Effect of extracellular volume expansion on renal phosphate reabsorption in the dog.  
J. Clin. Invest. 48, 1237-1245

**Maunder, E.M.W., A.V. Pillay and A.D. Care (1986)**

Hypophosphataemia and vitamin D metabolism in sheep.  
Quart. J. Exp. Physiol. 71, 391-399

**Mc Keown J.W., P.C. Brazy and V.W. Dennis (1979)**

Intrarenal heterogeneity for fluid, phosphate and glucose absorption in the rabbit.  
Am. J. Physiol. 237 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 6) F312-F318

**Meyer H. (1972)**

Über eine Anomalie der renalen Phosphor-Ausscheidung bei Schafen.  
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 79, 426-427

**Milton J.T.B. and J.H. Ternouth (1984)**

The effects of phosphorus upon microbial digestion.  
Proc. Aust. Soc. Anim. Prod. 15, 472-475

**Milton J.T.B. and J.H. Ternouth (1984)**

Phosphorus metabolism in ruminants. II. Effects of inorganic phosphorus concentration upon food intake and digestibility.  
Aust. J. Agric. Res. 36, 647-654

**Mircheff A.K. and E.M. Wright (1976)**

Analytical isolation of plasma membranes of intestinal epithelial cells: Identification of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase rich membranes and the distribution of enzyme activities.  
Membr. Biol. 28, 309-333

**Mizgala C.L. and G.Q. Quamme (1985)**

Renal handling of phosphate.  
Physiol. Rev. 64, 431-466

**Molitoris B.A., A.C. Alfrey, R.A. Harris and F.R. Simon (1985)**

Renal apical membrane cholesterol and fluidity in regulation of phosphate transport.  
Am. J. Physiol. 249, F12-F19

**Mühlbauer R.C., J.P. Bonjour and H. Fleisch (1977)**

Tubular localization of adaptation to dietary phosphate in rats.  
Am. J. Physiol. 233 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 2) F342-F348

**Mulrone S.E. and A. Haramati (1990)**

Renal adaption to changes in dietary phosphate during development.  
Am. J. Physiol. 258 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 27) F1650-F1656

**Murer H. and J. Biber (1992)**

Renal tubular phosphate transport: Cellular mechanisms.  
In: Seldin D.W., Giebisch G., eds. The Kidney. Physiology and Pathophysiology. 2nd Ed.  
New York, Raven Press Ltd., 2481-2509

**Murer H. and J. Biber (1997)**

A molecular view of proximal tubular inorganic phosphate ( $P_i$ ) reabsorption and of its regulation.  
Pfluegers Arch. - Eur. J. Physiol. 433, 379-389

**Murer H. and R. Kinne (1980)**

The use of isolated membrane vesicles to study epithelial transport processes.  
J. Membrane Biol. 55, 81-95

**Murer H., H. Stern, G. Burckhardt, C. Storelli and R. Kinne (1980)**

Sodium-dependent transport of inorganic phosphate across the renal brush border membrane.  
Adv. Exp. Med. Biol. 128, 11-23

**Nemere I. (1996a)**

Parathyroid hormone rapidly stimulates phosphate transport in perfused duodenal loops of chicks: Lack of modulation by vitamin D metabolites.  
Endocrinology 137, 3750-3755

**Nemere I. (1996b)**

Apparent nonnuclear regulation of intestinal phosphate transport: Effects of 1,25-dihydroxyvitamin  $D_3$ , 24,25-dihydroxyvitamin  $D_3$  and 25-hydroxyvitamin  $D_3$ .  
Endocrinology 137, 2254-2261

**Penny J.I. (1991)**

Mechanisms of phosphate transport in sheep small intestine and kidney.  
PhD thesis, University of Wales

**Peter R. (1982)**

Klinische Chemie  
Basel, München: Karger Verlag

**Peterlik M. and R. H. Wasserman (1978)**

Effect of vitamin D on transepithelial phosphate transport in chick intestine.  
Am. J. Physiol. 234 (4), E379-E388

**Petri A., H. Müschen, G. Breves, O. Richter and E. Pfeffer (1988)**

Response of lactating goats to low phosphorus intake. 2. Nitrogen transfer from rumen ammonia to rumen microbes and proportion of milk protein derived from microbial amino acids.

J. Agric. Sci., Camb., 111, 265-271

**Pfeffer E., A. Tompson and D.G. Armstrong (1970)**

Studies on intestinal digestion in the sheep. 3. Net movement of certain inorganic elements in the digestive tract on rations containing different proportions of hay and rolled barley.

Br. J. Nutr. 24, 197-204

**Poppi D.P. and J.H. Ternouth (1979)**

Secretion and absorption of phosphorus in the gastrointestinal tract of sheep on four diets.

Aust. J. Agric. Res. 30, 503-512

**Preston R.L. and W.H. Pfander (1964)**

Phosphorus metabolism in lambs fed varying phosphorus intakes.

J. Nutr. 83, 369-378

**Puschett J.B., P.C. Fernandez, I.T. Boyle, R.W. Gray, J.L. Omdahl and H.F. DeLuca (1972)**

The acute renal tubular effects of 1,25-dihydroxycholecalciferol.

Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 141, 379-384

**Quamme G.A. and N.L.M. Wong (1984)**

Phosphate transport in proximal convoluted tubule: effect of intraluminal pH.

Am. J. Physiol. 246 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 15) F 323-F333

**Rader J.I., D.J. Baylink, M.R. Hughes, E.F. Safilian and M.R. Haussler (1979)**

Calcium and phosphorus deficiency in rats: effect on PTH and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>.

Am. J. Physiol. 236, E118-122

**Ray Sarker B.C. and U.P.S. Chauhan (1967)**

A new method for determining microquantities of calcium in biological materials.

Anal. Biochem. 20, 155

**Reshkin S.J., J. Forgo and H. Murer (1990a)**

Functional asymmetry of phosphate transport and its regulation in OK-cells: phosphate transport.

Pfluegers Arch. 416, 554-560

**Reshkin S.J., J. Forgo and H. Murer (1990b)**

Functional asymmetry of phosphate transport and its regulation in OK-cells: parathyroid hormone inhibition.

Pfluegers Arch. 416, 624-631

**Reshkin, S.J., F. Wuarin, J. Biber and H. Murer (1990c)**

Parathyroid hormone-induced alterations of protein content and phosphorylation in enriched apical membranes of opossum kidney cells.  
J. Biol. Chem. 256, 15261-15266

**Ribovich M.C. and H.F. De Luca (1978)**

Effect of dietary calcium and phosphorus on intestinal calcium absorption and vitamin D metabolism.  
Arch. Biochem. Biophys. 188, 145-156

**Rübelt A.C. (1995)**

Untersuchungen zur Phosphat-Aufnahme durch die intestinale Bürstensaummembran von Ziegen.  
Inaug.-Diss. med. vet., JLU Giessen

**Saiki, R., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich and N. Arnheim (1985)**

Enzymatic amplification of  $\beta$ -globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.  
Science 230, 1350-1354

**Sansom B.F., K.J. Bunch and S.M. Dew (1982)**

Changes in plasma calcium, magnesium, phosphorus and hydroxyproline concentrations in ewes from twelve weeks before until three weeks after lambing.  
Br. Vet. J. 138, 393-401

**Scharrer E. (1975)**

Developmental changes in sugar and amino acid transport in different tissues of ruminants.  
In: McDonald I. und A.C.I. Warner, eds. Digestion and Metabolism in the Ruminant. A.C.I., University of New England, Australia, 49-59

**Schöneseiffen R. (1993)**

Untersuchungen über den Ansatz von Calcium und Phosphor bei wachsenden Ziegen in Abhängigkeit von der Versorgung mit diesen Elementen.  
Inaug.-Diss. agr., Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

**Schröder B., G. Breves and E. Pfeffer (1990)**

Binding properties of duodenal 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptors as affected by phosphorus depletion in lactating goats.  
Comp. Biochem. Physiol. 96A, 495-498

**Schröder B., H. Käppner, K. Failing, E. Pfeffer and G. Breves (1995)**

Mechanisms of intestinal phosphate transport in small ruminants.  
Br. J. Nutr. 74, 635-648

**Schröder B. und G. Breves (1993)**

Vergleichende Aspekte zum Mechanismus und zur Regulation der intestinalen Phosphat-Absorption.  
Z. Gastroenterol. 31 (Suppl. 4), 58-60

**Schröder B. and G. Breves (1996)**

Mechanisms of phosphate uptake into brush-border membrane vesicles from goat jejunum.  
J. Comp. Physiol. B 166, 230-240

**Schwab S.J. and M.R. Hammermann (1986)**

Electrogenic  $\text{Na}^+$ -independent  $\text{P}_i$  transport in canine renal basolateral membrane vesicles.  
Am. J. Physiol. 250, F 419-F424

**Schwab S.J., S. Klahr and M.R. Hammermann (1984)**

$\text{Na}^+$  gradient dependent  $\text{P}_i$  uptake in basolateral membrane vesicles from dog kidney.  
Am. J. Physiol. 246, F 663-F669

**Scott D. and G. Beastall (1978)**

The effects of intravenous phosphate loading on salivary phosphate secretion and plasma parathyroid hormone levels in sheep.  
Quart. J. Exp. Physiol. 63, 147-156

**Scott D. and W. Buchan (1985)**

The effects of feeding either roughage or concentrate diets on salivary phosphorus secretion, net intestinal phosphorus absorption and urinary phosphorus excretion in the sheep.  
Quart. J. Exp. Physiol. 70, 365-375

**Scott D. and W. Buchan (1987)**

The effect of feeding either hay or grass diets on salivary phosphorus secretion, net intestinal phosphorus absorption and on the partition of phosphorus excretion between urine and faeces in the sheep.  
Quart. J. Exp. Physiol. 72, 331-338

**Scott D. and W. Buchan (1988)**

The effects of feeding pelleted diets made from either coarsely or finely ground hay on phosphorus balance and on the partition of phosphorus excretion between urine and faeces in sheep.  
Quart. J. Exp. Physiol. 73, 315-322

**Scott D. and A.F. McLean (1981)**

Control of mineral absorption in ruminants.  
Proc. Nutr. Soc. 40, 257-266

**Scott D., A.F. McLean and W. Buchan (1984a)**

The effect of variation in phosphorus intake on net intestinal phosphorus absorption, salivary phosphorus secretion and pathway of excretion in sheep fed roughage diets. Quart. J. Exp. Physiol. 69, 439-452

**Scott D., A.F. McLean and W. Buchan (1984b)**

The effect of intravenous phosphate loading on salivary phosphorus secretion, net intestinal phosphorus absorption and pathway of excretion in sheep fed roughage diets. Quart. J. Exp. Physiol. 69, 453-461

**Scott D., F.G. Whitelaw, W. Buchan and L.A. Bruce (1985)**

The effect of variation in phosphorus intake on salivary phosphorus secretion, net intestinal phosphorus absorption and faecal endogenous phosphorus excretion in sheep.

J. Agric. Sci., Camb., 105, 271-277

**Sevilla C.C. and J.H. Ternouth (1980)**

Effects of different levels of calcium and phosphorus in sheep.

Proc. Aust. Soc. Anim. Prod. 13, 449

**Sevilla C.C. and J.H. Ternouth (1982)**

Effects of calcium and phosphorus depletion and repletion in lambs.

Proc. Aust. Soc. Anim. Prod. 14, 633

**Shah S.V., S.A. Kempson, T.E. Northrup and T.P. Dousa (1979)**

Renal adaptation to a low phosphate diet in rats. Blockade by actinomycin D.

J. Clin. Invest. 64, 955-966

**Shirazi-Beechey S.P., R.B. Beechey, J.I. Penny, W. Buchan and D. Scott (1991)**

Mechanisms of phosphate transport in sheep intestine and parotid gland: response to variation in dietary phosphate supply.

Exp. Physiol. 76, 231-241

**Shirazi-Beechey S.P., J.I. Penny, J. Dyer, I.S. Wood, P.S. Tarpey, D. Scott and W. Buchan (1996)**

Epithelial phosphate transport in ruminants, mechanisms and regulation.

Kidney Int. 49, 992-996

**Sklan D. and S. Hurwitz (1985)**

Movement and absorption of major minerals and water in ovine gastrointestinal tract.

J. Dairy Sci. 68, 1659-1666

**Smith F.D. Jr., B.O. Tinglof, J. Meuli and M. Borden (1969)**

Fetal response to parathyroid hormone in sheep.

J. App. Physiol. 27 (2), 276-279

**Stoll R., R. Kinne and H. Murer (1979)**

Effect of dietary phosphate intake on phosphate transport by isolated rat renal brush border vesicles.

Biochem. J. 180, 465-470

**Storelli C. and H. Murer (1980)**

On the correlation between alkaline phosphatase and phosphate transport in rat renal brush border membranes vesicles.

Pfluegers Arch. 384, 149-153

**Strickler, J.C., D.D. Thompson, R.M. Lose and G. Giebisch (1964)**

Micropuncture study of inorganic phosphate excretion in the rat.

J. Clin. Invest. 43, 1596-1607

**Symonds H.W. (1970)**

The effect of thyroidectomy and thyroparathyroidectomy upon phosphorus hoemeostasis in the goat: a hypothesis for the cause of hypophosphataemia.

Res. Vet. Sci. 11, 260-269

**Tanaka J. and H.F. De Luca (1973)**

The control of 25-hydroxyvitamin D metabolism by inorganic phosphorus.

Arch. Biochem. Biophys. 154, 566-574

**Thewis A. and E. Francois (1985)**

Intestinal absorption and secretion of total lipid phosphorus in adult sheep fed chopped meadow hay.

Reprod. Nutr. Develop. 25, 389-397

**Ternouth J.H., H.M.S. Davies, J.T.B. Milton, M.W. Simpson-Morgan and H.E. Sands (1985)**

Phosphorus metabolism in ruminants. I. Techniques for phosphorus depletion.

Aust. J. Agric. Res. 36, 637-645

**Tomas F.M., R.T. Moir and M. Somers (1967)**

Phosphorus turnover in sheep.

Aust. J. Agric. Res. 18, 635-645

**Tomas F.M. and M. Somers (1974)**

Phosphorus homeostasis in sheep I. Effect of ligation of parotid salivary ducts.

Aust. J. Agric. Res. 29, 587-593

**Towns K.M., R.C. Boston and D.D. Leaver (1978)**

The effect of intravenous administration of phosphorus and calcium metabolism in sheep.

Aust. J. Agric. Res. 29, 587-593

**Turner S.T. and T.P. Dousa (1985)**

Phosphate transport by brush-border membranes from superficial and juxtamedullary cortex.

Kidney Int. 27, 879-885

**Ullrich K.J., G. Campasso, G. Rumrich, F. Papavassiliou and S. Kloess (1977)**

Coupling between proximal tubular transport process.

Pfluegers Arch. 368, 245-252

**Ullrich K.J. and H. Murer (1982)**

Sulphate and phosphate transport in the renal proximale tubule.

Philos. Trans. R. Soc. Lond. [Bio.] 299, 549-558

**Ullrich K.J., F. Papavassiliou, G. Rumrich and G. Fritsch (1985)**

Contraluminal phosphate transport in the proximal tubule of rat kidney.

Pfluegers Arch. 405, 106-109

**Ullrich K.J., G. Rumrich and S. Kloess (1978)**

Phosphate transport in in the proximal convolution of the rat kidney. III. Effect of extracellular and intracellular pH.

Pfluegers Arch. 377, 33-42

**Van't Klooster A.T (1967)**

De toestand van calcium, magnesium en enzele andere mineralen in darminhond en mest van herkauwers in verband met hun resorptie.

Meded. Landb. Hooges. Wageningen 5, 1-135

**Vayro S, R. Kemp, R.B. Beechey and S. Shirazi-Beechey (1991)**

Preparation and characterization of basolateral plasma-membrane vesicles from sheep parotid glands.

Biochem. J. 279, 843-848

**Verri T., D. Marcovich, C. Perego, F. Norbis, F. Stange, V. Sorribas, J. Biber and H. Murer (1995)**

Cloning of a rabbit renal Na-P<sub>i</sub> cotransporter, which is regulated by dietary phosphate.

Am. J. Physiol. 268 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 37), F626-F633

**Wadsworth J.C. and R.D.H. Cohen (1977)**

Phosphorus utilization by ruminants.

Rev. Rural. Sci. 3, 143

**Wald H., M. Dranitzki-Elhalel, R. Backenroth and M.M. Popovtzer (1998)**

Evidence for interference of vitamin D with PTH/PTHrP receptor expression in opossum kidney cells.

Pflügers Ach.-Euro. J. Physiol. 436, 289-294

**Walker, D.M. (1972)**

Calcium and phosphorus retention by milk-feed lamb, with estimates of endogenous losses.

J. Agric., Camb. 79, 171-179

**Wen S.F., J.W. Boyner Jr. and R.W. Stoll (1978)**

Effect of phosphate deprivation on renal phosphate transport in the dog.

Am. J. Physiol. 234, F199-F206

**Werner A., M.L. Moore, N. Mantei, J. Biber, G. Semenza and H. Murer (1991)**

Cloning and expression of cDNA for a Na/P<sub>i</sub>-cotransport system of kidney cortex.

Proc. Natl. Sic. USA 88, 9608-9612

**Widiyono I., K. Huber, K. Failing and G. Breves (1998)**

Renal phosphate excretion in goats.

J. Vet. Med. A45, 145-153

**Wilson W.D. and A.C. Field (1983)**

Absorption and secretion of calcium and phosphorus in the alimentary tract of lambs infected with daily doses of Trichostrongylus colubriformis or Ostertagia circumcincta larvae.

J. Comp. Path. 93, 61-71

**Wright E.M., A.K. Mircheff, S.D. Hanna, V. Harms, C.B. van Os, M.W. Walling and G. Sachs (1979)**

The dark side of the intestinal epithelium: The isolation and characterization of basolateral membranes.

In: Mechanisms of intestinal secretion. Alan R., Inc., 150 Fifth Avenue, New York NY 10011, 117-130

**Wright R.D., J.R. Blair-West, J.F. Nelson and G.W. Tregear (1984)**

Handling of phosphate by a parotid gland (ovine).

Am. J. Physiol. 246, F916-F926

**Wylie M.J., J.P. Fontenot and L.W. Greene (1985)**

Absorption of magnesium and other macro-minerals in the sheep infused with potassium in different parts of the digestive tract.

J. Anim. Sci. 61, 1219-1229

**Yusufi A.N.K., M. Szczepanska-Konkel, A. Hoppe and T.P. Dousa (1989)**

Differential mechanisms of the increase in Na<sup>+</sup>/P<sub>i</sub> cotransport across the renal brush border membrane by thyroid hormone and by dietary phosphate deprivation.

Am. J. Physiol. 256, F 852-F861

**Zentek J., H. Meyer und K. Behnsen (1994)**

Einfluß der Fütterung auf die Mengenelementgehalte im Harn beim Hund.

Kleintierpraxis 39, 12, 821-884

## ***Herzlichen Dank!***

Herrn Prof. Dr. G. Breves danke ich für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die fachliche Unterstützung beim Entstehen dieser Arbeit.

Herrn PD Dr. B. Schröder danke ich für die wissenschaftliche Betreuung und die stets gewährte freundschaftliche Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

Frau Dr. K. Huber danke ich für ihre freundschaftliche Unterstützung in allen fachlichen Fragen, ihre Diskussionsbereitschaft und die wissenschaftliche Betreuung im Bereich der Molekularbiologie.

S. Handstein und M. Haas in Gießen, sowie M. Rohde und F. Herkenrat in Hannover danke ich für die Betreuung der Versuchstiere.

G. Becker, M. Burmester und K. Hansen danke ich für die Einweisung in die Arbeitsabläufe in den Labors des Institutes für Physiologie der TiHo-Hannover.

Christoph, Korinna, Mike, Roland und Steffi danke ich für ihre Freundschaft die mich durch die Höhen und Tiefen beim Anfertigen dieser Arbeit begleitet hat und die Zeit im Institut für Veterinär-Physiologie in Gießen unvergeßlich macht.

Astrid, Conny, Eva, Helga, Hans-Dieter, Klaus und Sandra möchte ich danken, sie haben mir das Einleben in Hannover sehr erleichtert.

Ich danke allen nicht namentlich erwähnten Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Veterinär-Physiologie in Gießen und des Physiologischen Instituts der TiHo-Hannover für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Zu letzt möchte ich meiner Familie für ihre Unterstützung danken.