

1 EINLEITUNG UND LITERATUR

1.1 Allgemeine Einleitung

Seit vielen Jahren ist bekannt, dass das Pansenepithel der Wiederkäuer in der Lage ist, sich in Abhängigkeit von der Fütterung an die im Pansen vorherrschenden Verhältnisse anzupassen. Beim Milchrind findet diese Anpassungsphase insbesondere in dem Zeitraum vor und nach dem Abkalben statt. In dieser Phase muss sich das Tier im Hinblick auf die bevorstehende bzw. beginnende Laktation an eine wesentlich energiereichere Futtermischung adaptieren. Eine unzureichende Adaptation der Pansenschleimhaut kann zu schwerwiegenden Erkrankungen wie Endometritis, Mastitis, Laminitis, Pansenazidose, Ketose und Verlagerungen des Labmagens führen (Berg und Edvi, 1976; Coppock *et al.*, 1974; Correa *et al.*, 1990; Livesey und Fleming, 1984; Nagaraja und Chengappa, 1998; Owens *et al.*, 1998). In der Praxis hat sich deswegen das sogenannte „Anfüttern“ (engl. „lead feeding“) bewährt (Dirksen *et al.*, 1992a). Trächtige, trockenstehende Milchkühe werden bei diesem Verfahren vor der Kalbung von einer reinen Raufuttermischung auf eine gemischte Rau-/Krautfuttermischung umgestellt, um die Pansenadaptation an energiereiche Rationen zu stimulieren. Die höhere Energiedichte in der Ration, welche bei der Anfütterung eingesetzt wird, stellt zwar eine starke Stimulation der Pansenadaptation dar, führt jedoch andererseits unter Umständen zu einer Verfettung der Tiere, die für den Geburtsvorgang als ungünstig angesehen wird (Dirksen *et al.*, 1992a).

Was passiert bei einem Futterwechsel im Pansen? Als Folge der verstärkten Fermentation bei energiereicher Fütterung verändern sich in der Pansenflüssigkeit unter anderem der pH-Wert, die Konzentration von flüchtigen Fettsäuren (short-chain fatty acids, SCFA), Natrium, Kalium und Ammoniak und der osmotische Druck (Bennink *et al.*, 1978; Leedle *et al.*, 1982; Peters *et al.*, 1990; Wohlt und Blaisdell, 1976).

Das Pansenepithel reagiert auf diese Veränderungen einerseits durch Proliferation, um eine größere Fläche für die Absorption zu schaffen. Diese Proliferation des Epithels wurde in der Vergangenheit durch histologische Untersuchungen wiederholt charakterisiert (Brownlee, 1956; Dirksen *et al.*, 1984; Kauffold *et al.*, 1977a; Kauffold *et al.*, 1977b; Liebich *et al.*, 1987; Liebich *et al.*, 1990; Weiss, 1994).

Andererseits wird angenommen, dass sich auch die einzelne Epithelzelle funktionell anpasst, indem sie ihre Zelloberfläche mit mehr Transportproteinen zur Absorption der Nährstoffe ausstattet. Absorptionsstudien (Ussing-Kammer Technik; Methode des gewaschenen Pansens) haben gezeigt, dass diese funktionelle Anpassung des Epithels in Form von verstärkter Absorption von Nährstoffen (SCFA) und Mineralstoffen (Na^+ , Mg^{++}) stattfindet (Dirksen *et al.*, 1984; Doreau *et al.*, 1997; Gäbel *et al.*, 1987b; Sehested *et al.*, 2000).

Der zeitliche Rahmen der morphologischen Adaptation bewegt sich in einem Rahmen von vier bis sechs Wochen (Dirksen *et al.*, 1984). Im Hinblick auf die funktionelle Adaptation zeigt die Arbeit von SUPLIE (2005), dass diese in Bezug auf die Absorption von Natrium wesentlich zügiger (innerhalb einer Woche) geschieht. Bisher ist jedoch nicht bekannt, welche Mechanismen für diese schnelle funktionelle Veränderung verantwortlich sind.

In der vorliegenden Arbeit werden deshalb zunächst in einem Fütterungsversuch (Wechsel energiereicher Heufütterung zu energiereicher Fütterung mit Heu und Krafffutter) die üblichen Fermentationsparameter in der Pansenflüssigkeit erfasst und *in vitro* mit Hilfe der Ussing-Kammer-Methode transportphysiologische Messungen zur Charakterisierung veränderter Transportraten (Natrium, Acetat) durchgeführt. Ergänzt werden diese Untersuchungen durch die Bestimmung des Insulin-like growth factors 1 (IGF-1) im Plasma, von dem eine stimulierende Wirkung auf das Epithelwachstum ausgeht. Außerdem wird vermutet, dass dieser Wachstumsfaktor die Steigerung des Natrium-Transportes anregt (Shen *et al.*, 2004a; Shen *et al.*, 2004b).

Um zu klären, welche Mechanismen auf zellulärer Ebene für die schnelle funktionelle Adaptation verantwortlich sind (s. o.), sollen in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe molekularbiologischer Methoden *ex vivo* entnommene Pansenepithelzotten im Verlauf der Adaptation auf eine Veränderung der relativen mRNA-Kopienzahl¹ untersucht werden. Am adaptierenden Epithel des Gastrointestinaltrakts von Modelltieren gibt es Studien, in denen Genregulationen auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden konnten (Erwin *et al.*, 2000; Hass *et al.*, 1997; Hodin, 2000; Jiang *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2000; Ljungmann *et al.*, 2000; Musch *et al.*, 2001). In der Arbeit von SUPLIE (2005) wurden auch an isolierten Pansenepithelzellen erste Hinweise auf eine Adaptation durch Steigerung der mRNA-Menge mehrerer Gene gefunden. Diese sollen nun am *ex vivo* entnommenen Material im Hinblick auf eine Änderung der relativen mRNA-Menge geprüft werden. Nach Literaturrecherche wurden außerdem weitere Kandidaten-Gene ausgewählt, die bei Modellstudien an Gastrointestinaltrakt, Niere und Muskulatur eine Regulation auf mRNA-Ebene zeigten (s. 1.5.2.2, 1.5.2.5, 1.5.2.6, 1.5.2.7, 1.5.2.8.)

Die Ergebnisse dieser Arbeit zur Adaptation des Pansenepithels beim Schaf, welches als Modelltier für das Milchrind eingesetzt wird, sollen zur Verbesserung des Verständnisses entsprechender Anpassungsmechanismen bei Rindern beitragen. Da mit einer zu schnellen Futterumstellung (vor und nach dem Kalben) häufig gesundheitliche Probleme der Milchkühe verbunden sind, ist ein besseres Verständnis der Adaptationsvorgänge von großer wirtschaftlicher Bedeutung und zusätzlich im Sinne des Tierschutzes von hoher Relevanz.

¹ mRNA-Kopienzahl eines Genes in Bezug zu der mRNA-Kopienzahl eines nicht auf die Umstellung reagierenden Referenzgenes

1.2 Morphologie der Pansenschleimhaut

1.2.1 Einleitung

Der Pansen der Wiederkäuer ist eine Fermentationskammer, die einen Großteil der linken Bauchhöhle ausfüllt. In seinem Inneren wird das vom Tier aufgenommene Futter von Bakterien und Protozoen zersetzt und Ionen und Nährstoffe (SCFA; short chain fatty acids) werden durch die Pansenwand resorbiert. Die Futterzusammensetzung und damit die Fermentation in den Vormägen können in der heutigen Milchrinderhaltung erheblich variieren. Dabei müssen Faktoren wie der pH-Wert und die Osmolalität des Panseninhaltes in gewissen Grenzen konstant gehalten werden. Abgesehen von der Regulation durch den Speichel trägt auch das Pansenepithel selbst in erheblichem Ausmaß zu dieser Regulation bei. Es ist in der Lage, sich morphologisch an verschiedene Futterrationen anzupassen.

1.2.2 Aufbau der Pansenschleimhaut

Die Pansenwand des Wiederkäuers ist luminal durch zungenförmige Zotten gekennzeichnet. Eine drüsenlose Schleimhaut (Epithelium mucosae) liegt dem bindegewebigen Grundgerüst (Lamina propria mucosae) auf. Durch Epithelzapfen und -leisten entsteht ein mehr oder weniger starker Papillarkörper, der eine Verzahnung mit dem Bindegewebe gewährleistet. Es folgt ein Kapillarnetz und eine sogenannte Zona compacta aus lamellär geschichtetem Bindegewebe. Eine Lamina muscularis mucosae ist nicht ausgebildet. Weitere Schichten sind die Tunica muscularis aus glatter Muskulatur und abschließend die Tunica serosa, die den äußeren Überzug des Pansens in der Bauchhöhle bildet (Liebich 1999).

Das Epithelium mucosae ist ein mehrschichtiges, verhornendes Plattenepithel, dass sich durch charakteristische Zelldifferenzierung von jedem anderen mehrschichtigen Plattenepithel unterscheidet (Schnorr und Vollmerhaus, 1967). Es lässt sich in 4 Schichten unterteilen:

1. Das Stratum basale (cylindricum) aus hochprismatischen Zellen, die mit der Basalmembran über Halbdesmomen in Verbindung steht (Basalzellschicht).
2. Das Stratum spinosum profundum und superficiale mit 6-10 Zelllagen und breiten Interzellularräumen (Parabasal- und Intermediärzellschicht).
3. Das Stratum granulosum, welches sich in Stratum transitionale und Stratum lucidum unterteilen lässt und sich durch eingelagerte Keratohyalin granula von den anderen Zellschichten abgrenzt (Körnerzellschicht).
4. Das Stratum corneum (superficiale) aus drei verschiedenen Arten von Hornzellen, in denen das Cytoplasma zu Keratin umgewandelt wird. Dort sind nur noch Reste der Zellkerne vorhanden (Hornzellschicht).

1.2.3 Funktion des Pansenepithels

Der Aufbau ist eng mit der Funktion des Pansenepithels verbunden.

Zum einen muss das Pansenepithel den Organismus gegen Einflüsse aus dem Lumen des Vormagens schützen. Dabei muss vor allem eine Barriere gegen die zahlreichen im Pansen lebenden Mikroorganismen vorhanden sein, deren Durchdringen der Pansenwand zu lebensbedrohlichen Erkrankungen führen kann (Nagaraja und Chengappa, 1998). Gleichzeitig sind fütterungsbedingte Schwankungen des luminalen pH-Wertes vom Körper abzuschirmen. Diese trennende Funktion des Pansenepithels wird durch die Hornzellen gewährleistet, die an ihren scharfen Rändern mit den Nachbarzellen stark verzahnt sind. Außerdem sind die Interzellularräume sowohl im Stratum corneum als auch im Stratum granulosum durch eine lipidhaltige Substanz ausgefüllt (Schnorr und Vollmerhaus, 1967), die die Zellen wie Kit zusammenhält.

Zum anderen müssen für den Organismus lebensnotwendige Stoffe durch die Pansenwand transportiert werden. Der Stofftransport findet primär transzellulär und in geringem Maße interzellulär (parazellulär) statt. Für den parazellulären Transport ist in den unteren Schichten ein sogenanntes Labyrinthsystem von Interzellularräumen ausgebildet (Schnorr und Vollmerhaus, 1967). Der transzelluläre Transport versorgt die Pansenepithelzellen und den Gesamtorganismus mit Ionen und Fettsäuren.

1.2.4 Adaptation auf morphologischer Ebene

Das Pansenepithel der Wiederkäuer ist kein statisches Gewebe, sondern es besitzt die Eigenschaft, sich an Veränderungen in der Zusammensetzung des Panseninhaltes anzupassen, die durch unterschiedliche Fütterung entstehen (Brownlee, 1956). Diese Anpassung findet auf morphologischer Ebene durch Veränderungen in der Länge, Form, Dichte und Verteilung der Zotten (Dirksen *et al.*, 1984; Liebich *et al.*, 1990), aber auch durch Veränderungen in der Dicke der einzelnen Epithelschichten und durch Quellungsvorgänge der Zellen und Zellkerne statt (Dirksen *et al.*, 1984; Kauffold *et al.*, 1977b; Kauffold *et al.*, 1975). Der Papillarkörper wird verbreitert und die Verzahnung von Epithel und Bindegewebe nimmt zu (Liebich *et al.*, 1990). Dabei wurde in verschiedenen Versuchen (s. Tab. 1) festgestellt, dass die Umbauprozesse vorwiegend von der Menge an flüchtigen Fettsäuren im Pansen ausgelöst wurden, während eine mechanische Reizung und andere Stoffe als Ursache ausgeschlossen werden konnten (Flatt *et al.*, 1958; Sander *et al.*, 1959; Tamate *et al.*, 1962). Die Konzentration der flüchtigen Fettsäuren (Acetat, Propionat, Butyrat) ist abhängig von der Fütterung. Bei Raufutter wie Heu und Silage ist die Menge an flüchtigen Fettsäuren niedrig (80 mmol/l), bei Zufütterung von Konzentratfutter und Getreide steigt die Menge bis zu über 140 mmol/l (Tamminga und van Vuuren, 1988).

Dabei wirken die einzelnen Fettsäuren auf verschiedene Art auf die Schleimhaut ein. Bei alleiniger Infusion von Na-Acetat wurden schmalere Zotten und eine starke Verhornung

gemessen. Es traten die meisten pathologischen Veränderungen in Form von Nekrosen, Atrophien und Hyperkeratosen auf. Propionat- und Butyrat-Infusionen hatten dickere Zotten und eine weniger starke Verhornung zur Folge (Kauffold *et al.*, 1977b). KAUFFOLD *et al.* (1977b) entdeckten außerdem eine Verringerung der Zellkernvolumina im Stratum basale, eine Reduzierung der Dicke des Stratum germinativum (Stratum basale und spinosum) und der Lamina propria mucosae bei Acetat, eine Verdickung der Lamina propria mucosae bei Propionat und des Stratum germinativum bei Butyrat. Jede der drei Fettsäuren induzierte eine Verringerung der Zellkernvolumina im Stratum basale.

Durch SAKATA und TAMATE (1978) wurde eine Erklärung für die Veränderung der Zotten gegeben: Sie stellten eine erhöhte Mitoseaktivität des Epithels bei schneller Infusion von Natrium-Butyrat in den Pansen fest. Die Mitoseaktivität erhöht sich ebenso bei Propionat. Dennoch ist die Proliferation bei Butyrat stärker, da die Apoptoserate des Epithels bei Butyrat nur ein Drittel von der Apoptoserate bei Propionat beträgt (Mentschel *et al.*, 2001). Butyrat scheint *in vivo* ein spezifischer Inhibitor der ruminalen Apoptose zu sein.

Ein weiterer wichtiger Faktor für die Proliferation des Pansenepithels ist der Insulin-like-growth-factor-I (IGF-I) (s. 1.6.1). Bei energiereicher (fettsäurereicher) Fütterung wurde von SHEN *et al.* (2004b) eine Erhöhung des Plasma-IGF-1-Spiegels, verbunden mit einer Zunahme der Rezeptoren für IGF-1 und der Rezeptor-Bindung am Pansenepithel, gemessen. Eine Erhöhung der Menge an mRNA (messenger ribonucleic acid) in den Pansenepithelzellen blieb jedoch aus. Kultivierte Pansenepithelzellen reagierten auf eine Behandlung mit IGF-1 mit einer Erhöhung der DNA-Synthese und Zellproliferation. In einer späteren Arbeit von SHEN *et al.* (2005) bei kastrierten Bullen wurden diese Reaktionen auf energiereiche Fütterung jedoch nicht beobachtet. Das Vorkommen des IGF-1-Rezeptors sank hier ebenso wie das der mRNA von IGF-1. Die Plasma-IGF-1-Konzentration wurde nicht von der Fütterung beeinflusst.

Bei energiearmem und damit fettsäurearmem Futter werden die Zotten durch Faltenbildung und/oder Abbrechen der Zottenspitzen kürzer (Liebich *et al.*, 1990). Die Bruchempfindlichkeit ist dabei durch das Vorherrschen von Kollagenfasertyp I gegeben, der zwar für Stabilität des Gewebes sorgt, aber keine Flexibilität gewährleistet (Liebich *et al.*, 1990).

Die Verlängerung der Zotten und das neue Aussprossen von Zotten aus basalen Anlagen wird von einer Zunahme von Kollagenfasertyp III und Fibronektin begleitet, die eine höhere Flexibilität und Dehnbarkeit der Zotten zur Folge hat. Zusätzlich steigt die Anzahl an einsprossenden Kapillaren und Venolen für die Sauerstoffversorgung des Gewebes einerseits und den Abtransport von energiehaltigen Substraten andererseits. Die Flexibilität des Gewebes nimmt jedoch im Laufe der Zeit wieder ab, Kollagentyp I ersetzt nach und nach Kollagentyp III und Fibronektin, so dass ein erneutes Abbrechen der Zotten möglich wird (Liebich *et al.*, 1990).

Die Proliferation des Pansenepithels führt als Anpassung an das gesteigerte Nährstoffangebot auch zu einer erhöhten Resorptionsfähigkeit. Eine adaptierte Schleimhaut ist in der Lage, in der gleichen Zeit die dreifache Menge an Fettsäuren aufzunehmen (Dirksen *et al.*, 1984). Außerdem kann der pH-Wert der Pansenflüssigkeit in der Hälfte der Zeit von pH 5 auf pH 7 neutralisiert werden (Weiss, 1994).

Unklar ist bisher, welche Zeitspanne für die morphologischen Veränderungen benötigt wird (s. Tab. 1). KAUFFOLD *et al.* (1977) beobachteten schon nach einer Woche Zustandsänderungen, LIEBICH *et al.* (1987) vermerkten nach 2 Wochen eine Zunahme des Flächeninhalts der Zottenquerschnitte von 14 %, die Proliferationsvorgänge liefen bis 8 Wochen post partum weiter, dann wurden die Messungen eingestellt. Bei DIRKSEN *et al.* (1984) erstreckte sich der Umbau der Schleimhaut über 4 bis 6 Wochen.

Eine klinische Kontrolle der Tiere fand nur bei BERG und EDVI (1976) statt. Wahrscheinlich wurde aufgrund einer überhöhten Konzentratfüttergabe eine Verschiebung der relativen Anteile der Leukozyten im Differentialblutbild gemessen. Die anteiligen Lymphozyten nahmen von 61 (Nullwert) auf 89 zu. Außerdem wurde eine lymphozytäre Infiltration im histologischen Schnittbild beobachtet. Diese Ergebnisse deuten auf eine Entzündung des Pansengewebes (Ruminitis) hin, es gab jedoch keine Verklebungen oder Verklumpungen. Hier wird deutlich, dass die Adaptation des Pansenepithels ihre Grenzen hat, die in diesem Fall überschritten wurden.

NOCEK *et al.* (1980) fanden bei Bullenkälbern, die ab einem Alter von 6 Wochen nahezu ausschließlich Konzentratfutter erhalten hatten, dickere und unterschiedlich lange Zotten mit Verklebungen und Läsionen im Alter von 20 Wochen. Das Epithel zeigte außerdem verringerte Transportraten für Acetat und Propionat. Die Trockenmasse der Pansenmucosa dieser Kälber überstieg deutlich die Werte von Kälbern, die mit Heu gefüttert wurden. Eine Entzündung des Pansenepithels ist zu vermuten. Ob subepitheliale Entzündungszellen auftraten, wurde nicht dokumentiert.

Tab. 1 Literaturübersicht: Versuche zum Thema Histologie des Pansenepithels in Abhängigkeit von der Fütterung / Behandlung

| Autor | Tiere | Dauer | Versuchsansatz | Durchführung | Ergebnis |
|---------------------------|---|---------------------|--|---|---|
| Brownlee 1956 | 14 Färsen 22 Bullenkälber | bis zu 5 Monate | Gruppen mit unterschiedlicher Fütterung Heu, Kraftfutter, Saffutter, bei den Kälbern plus Milch, makroskopische Betrachtung und Messung des Gewichts der Pansenmucosa | Gewebeproben aus dem dorsalen Blindsack und dem Reticulum | Gewebegewicht und Zottenentwicklung variiert mit der Fütterung |
| Flatt 1958 | Bullenkälber | bis zu 12 Wochen | Gabe von gereinigtem Futter, Cellulose-Schwämmen, Plastik-Schwämmen, einzelnen Fettsäure-Lösungen und Pansenflüssigkeit über eine Pansenfistel zusätzlich zur Milch, Kombinationen der Komponenten | FS-Lösungen: Pro Liter 250 g Na-FS im Verhältnis 50:20:20:10 (125 g Ac, 50 g Prop, 50 g But, 25g Lac) | Entwicklung der Pansen-Mucosa nicht durch mechanische Reizung bestimmt, sondern durch Endprodukte der Fermentation. Bei den Kälbern mit Fettsäure-Lösung und gereinigtem Futter: stärkere Zottenentwicklung |
| Sander 1959 | 12 Bullenkälber | 11 Wochen | Gabe von Acetat-, Propionat-, Butyrat-, Glucose-, NaCl- Lösung über die Pansenfistel | Fettsäure-Lösungen: Pro Liter 100 g des Na-Salzes der Fettsäure, pH 6,7 Glucose: 1,0 g pro Pfund KG / Tag NaCl: von 0,9-2,4% Lösung im Verlauf der 11 Wochen | Wenig Wachstum der Mucosa außer bei Propionat und Butyrat -Infusion. |
| Tamate 1962 | 25 neugeborene Kälber | 1 Tag-12 Wochen | 3 Gruppen mit unterschiedlicher Fütterung: (A) Milch, (B) Milch Heu, Getreide, (C) Milch + verschiedene Substanzen direkt ruminal: Fettsäurelösungen, Plastik-Schwämme | Fettsäure-Lösungen: pH 6,7 Essigsäure/Propionsäure 70/30, K- Ac/Na-Prop 70/30, Na-Butyrat, Na- Propionat, insges. bis zu 16,1 kg FS in 12 Wochen, gleiches totales Volumen (138,6 Liter/Tier) | Zottenwachstum bei Propionat und Butyrat, Plastikschwämme bewirkten ansteigende Kapazität Muskulaturentwicklung und Pigmentablagerung im Pansen. Extensives Wachstum bei 0-3 Tage alten Kälbern beobachtet. |
| Berg 1976 | 6 weibliche Schafe, 1-1/2 Jahre alt | 80-231 Tage | 1 Kontrollgruppe und 2 Versuchsgruppen mit steigendem KF-Anteil der Ration. Makroskopisch-anatomische, lupenmikroskopische und histologische Untersuchung, Differentialblutbild | Entnahme der Proben aus Atrium ruminis, HE-Färbung, Blutausstrich nach Pappenheim | Keine Verklebungen oder Verklumpungen, bei Versuchsgruppen morphologische Veränderungen, Pansenzotten-Anzahl pro cm ² ↓, Pansenzottenlänge ↓, Keratinschicht ↑, Corpus papillare-Dicke ↑, beginnende bis starke lymphozytäre Infiltration der Mucosa |
| Kauffold 1975d | 1 Kuh, nicht laktierend | 5 mal 3 Wochen | 5 verschiedene Rationen nacheinander gefüttert, am 1. und 20/21. Tag der Perioden Pansensaftproben und Pansenbiopsien, lupenmikroskopische und histologische Untersuchung, Ermittlung der Sauerstoff-Aufnahme | Rationen unterschiedlichen Futters, energie- und proteinäquivalent, bis auf eine mit doppelter Nettoenergie, Biopsie aus Atrium ruminis und vorderem Teil des ventralen kranialen Sackes | Veränderte Merkmale: Art und Dicke der Hornschicht, Dicke der Epithelien, Zellkernvolumina im Str. basale, Lam. propria, Sauerstoffaufnahme. Konzentratfütterung: Erhöhung der FFS- Konzentration im Pansensaft führt zu Hypertrophie und Stimulierung der Atmungsfunktionen des Gewebes |
| Kauffold 1977 | 3 Kühe, nicht Laktierend | 21 Wochen | 3-wöchige Kontrollperioden mit dazwischenliegenden 3- wöchigen Infusionsperioden (Infusion von Propion-, Essig- und Buttersäure), Pansensaftproben und Biopsien | FS-Lösungen: 0,63g Prop., 0,89 Ac., 0,4 But./kg KG mit pH 2,85-3,41 in 19 l Gesamt-Lösung über 10 Std. durch Fistel, in allen Perioden Ration energetisch gleich, Biopsie aus Atrium ruminis und dors. Teil des ventr. kran. Sackes in wöchentliche Abständen | Zotten bei Propionat- und Butyrat-Infusion dicker, bei Acetat-Infusion schmaler, bei allen Infusionsperioden: Keratinisierung verstärkt, Verringerung der Zellkernvolumina im Str. basale. Prop.-Infusion: Lam. propria-Dicke ↑, But.-Infusion: Str. germinativum-Dicke ↑, Ac-Infusion: Str. germ. und Lam. Prop. ↓, Nekrose, Hyperkeratose ↑ (34%), Zustandsänderungen nach 1 Woche |

| Autor | Tiere | Dauer | Versuchsansatz | Durchführung | Ergebnis |
|---------------------------|---|--------------------------------------|---|--|---|
| Sakata 1978 | 4 männliche Schafe | 6 Tage | Keine orale Fütterung, nur H ₂ O ad libitum, Na-Butyrat-Lösung mit oder ohne NaCl-Lösung, direkt intraruminal, schnell oder langsam, Biopsie vor und 24 Std. nach der letzten Gabe. Messung des Mitoseindex | Intraruminaler Eingabe in 10 s oder über 20-24 Std.; Na-Butyrat-Lösung: 2 g/kg KG/Tag, 10 %ig, NaCl-Lösung 0,9 %ig, Mitoseindex: Basalzellen in Mitose/Basalzellen gesamt | Mitoseindex stieg nur bei schneller Eingabe von Butyrat von 0,48 bis zu 2,65 %, bei langsamer Eingabe blieb der Mitoseindex bei 0,50% |
| Dirksen 1984 | 2 Kühe, 3 ½ Jahre alt, nicht laktierend | bis 27 Wochen | 3 Fütterungsperioden (energiearm, energiereich, energiearm), Resorptionsversuche, mit pH-Kontrolle und Regulation | Resorptionsversuch: am temporär isolierten Ersatz der Ingesta durch 20 l FS-Gemisch (69 mM Ac., 25 mM Prop., 15 mM But. pro Liter + Puffer), Messung des Konzentrationsabfalls | Bei energiereicher Fütterung: Umbau der Mucosa (innerhalb von 4-6 Wochen) und im Resorptionsversuch deutlich schnelleres Absinken der FS-Konzentration |
| Liebich 1987 | 11 Kühe, 60 Tage a.p. – 60 Tage p.p | 120 Tage | 2 Gruppen Kühe in der Trockenstehphase mit energiearmem Futter, Gruppe A 2 Wochen vor Kalbung auf energiereiches Futter umgestellt, Gruppe B zur Zeit der Kalbung, Biopsien im Abstand von bis zu 7 Tagen | Entnahme der Biopsien aus ventralem Pansensack hinter der vorderen Querrfurche | In Trockenstehphase: Flächeninhalt der Zottenquerschnitte in Gruppe B bis zu 66% ↓, Zottenumfang 25-30% ↓, Schnittfläche der Lam. epithelialis (mm ²): Verkleinerung um 30-40%, Epithelhöhe (mm) 15-20% ↓, Umfang des Papillarkörpers (mm) 10-15% ↓, In Gruppe A zur Kalbung Flächeninhalt bereits wieder auf 53 % des Ausgangswertes |
| Liebich 1990 | Trächtige Kühe | 6 Wochen a.p. bis mehrere Wochen p.p | Histologische Untersuchungen von Trockenstehen (energiearmes Futter) bis 8 Wochen post partum (energiereiches Anfüttern ca. 14 Tage vor der Kalbung) Immun-fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Kollagenfasertyp I und III und Fibronektin | Kollagenfasertyp I: für Stabilität des Gewebes, Verankerung der Zotten in der Tela submucosa Kollagenfasertyp II: Erhöhung der Flexibilität und Dehnbarkeit, Verbindung mit Tunica muscularis | Verkürzung der Zotten in der Trockenstehphase durch Faltenbildung oder Abbrechen der Zottenspitze, Energiearme Ration: Kollagen Typ I herrscht vor (2/3 des Gesamtbindegewebes der Zotte, Typ II nur 1/3, Fibronektin 5 %), Energiereiche Ration: Kollagenfaser-typ I 15 %, III 40 % und Fibronektin auf 45% |
| Weiss 1994 | 2 Kühe, nicht laktierend | 19 Wochen | 3 Fütterungsperioden: energiereich, energiearm, energiereich, histologische US der Schleimhaut, Neutralisationsversuch mit FS-Gemisch am Ende der Fütterungsperioden: Messung der Zeitspanne, um den pH auf 7 zu erhöhen | Biopsieentnahme am Boden des dorsalen Sackes, Neutralisationsversuch am temporär isolierten Pansen, FS-Lösung: 60mmol Ac, 25 mmol Prop, 15 mmol But + Puffer, pH 5 bei 39°C, Entnahme von 20 ml des Gemisches aus dem Pansen im Abst. von 5 Min. | Energiereiche Nahrung: Proliferation der Mucosa, Energiearme Nahrung: Regression der Mucosa Hohe Schleimhaut: 100% schnellere Neutralisation des pH-Wertes |
| Mentschel 2001 | 9 Kälber | 6 Wochen | 3 Gruppen, alle Kälber bekamen Milch-Austauscher und 100 g Heu, (A) + Prop., (B) + But., (C) + isokalorisch zu Gruppe A&B Milchaustauscher, Messung von Mitose, Apoptose und Zottenlänge | Mengen Propionat: ansteigend von 53 bis 390 g, Mengen Butyrat: steigend von 54 bis 326 g. | Zottenlänge ↑ signifikant von 1,0 mm (C), über 2,2 mm (A) bis zu 4 mm (B). Mitoserate bei (A) und (B) ↑, die Apoptoserate bei But-Fütterung nur 1/3 der Apoptoserate bei Prop.-Fütterung. Butyrat = spezifischer Inhibitor der ruminalen Apoptose in vivo |
| Shen 2004 | 24 Ziegen | 42 Tage | 2 Gruppen, Gruppe A hohe Energiezufuhr, Gruppe B niedrige Energiezufuhr, histologische US, Messung von IGF-1, Na-Flux (Amilorid-sensitiv), DNA-Synthese von isolierten PEZ bei IGF-1 Behandlung | IGF-1 Messung im Blut, IGF-1 Rez.- Bindung an PEZ, IGF-1-mRNA und IGF-1-Rez. mRNA in PEZ Gewebeproben aus Atrium ruminis, ventraler Sack, ventraler Blindsack | Bei energiereicher Fütterung: Na-Flux ↑, Plasma IGF ↑ (2 fach), Pansenepithel IGF-1 mRNA bleibt gleich, IGF-1-Rez. Bindung ↑, DNA-Synthese und Zell-Proliferation von kultivierten Epithelzellen bei IGF-1 Behandlung ↑ |

Abkürzungen und Symbole: ↑ = steigt, ↓ sinkt, Abst. = Abstand, Ac. = Acetat, a.p. = ante partum, But. = Butyrat, FS = Fettsäure, germ. = germinativum, IGF-1 = Insulin-like growth factor 1, KF = Krafftutter, KG = Körpergewicht, Lac = Lactat, Min. = Minuten, NaCl = Natriumchlorid, PEZ = Pansenepithelzellen, p.p. = post partum, Prop. = Propionat, Std. = Stunden, Str. = Stratum, US = Untersuchung

1.3 Zusammensetzung der Pansenflüssigkeit im Hinblick auf die Fütterung

1.3.1 Allgemeines

Durch die Fermentation im Pansen entsteht ein Gemisch aus Futterpartikeln, Wasser, Speichel, Bakterien, gelösten Mineralstoffen, Fettsäuren, Spurenelementen, Vitaminen und Kohlenhydraten (v.a. Zellulose), das als Pansenflüssigkeit bezeichnet wird. Im Folgenden wird zunächst ein Überblick über die wichtigsten Mineralstoffe in der Pansenflüssigkeit gegeben. Anschließend werden mit der Osmolarität, den flüchtigen Fettsäuren, dem Ammoniak und dem pH-Wert die Eckpfeiler der Fermentation vorgestellt.

Der Mineralstoffgehalt der Pansenflüssigkeit ist abhängig von verschiedenen Faktoren:

- Mineralstoffgehalt des Futters
- Löslichkeitsrate der Mineralstoffe von den Futterpartikeln
- Löslichkeit der Mineralstoffe
- Sekretion von Speichel
- Absorption aus dem Pansen
- Abfluss aus dem Pansen

Dabei sind Kalium (K^+), Kalzium (Ca^{++}) und Magnesium (Mg^{++}) vor allem abhängig von der Aufnahme über das Futter, während Natrium (Na^+), Chlorid (Cl^-) und Phosphat primär durch die Speichelsekretion beeinflusst werden. Als weitere Anionen sind Hydrogencarbonat und Lactat zu nennen.

1.3.2 Natrium

Natrium ist das Ion mit dem größten Vorkommen im Pansensaft (80-160 mmol/l (Bennink *et al.*, 1978)), die Na^+ -Konzentration ist jedoch immer niedriger als im Speichel (Bailey, 1961). Dadurch stellt der Na^+ -Gehalt des Speichels einen dominierenden Faktor für die Na^+ -Konzentration im Pansen dar. Eine lange Periode, in der Wiederkäuer Futter mit einem niedrigen Na^+ -Gehalt fressen, kann allerdings zu einem Absinken der Na^+ -Gehalte führen (Bailey, 1961). BENNINK (1978) stellte fest, dass Na^+ größeren stündlichen Variationen unterliegt als die anderen Ionen. Dabei kommt es insbesondere nach Heufütterung zu einem schnellen Abfall der Na^+ -Konzentration. Durch eine Stimulation der elektrogenen Na^+ -Absorption führt außerdem eine höhere K^+ -Konzentration im Futter zu einer erniedrigten luminalen Na^+ -Konzentration (Bennink *et al.*, 1978; Lang und Martens, 1999; Scott, 1967). Dadurch wird ein Anstieg des osmotischen Druckes der Pansenflüssigkeit vermieden. Es ergibt sich ein reziprokes Verhältnis der beiden Kationen. DUFFIELD (2004) stellte fest, dass bei Entnahme von Pansensaftproben von verschiedenen Regionen des Vormagens in der Mitte des Pansens die niedrigsten Na^+ -Werte auftraten (91,7 mmol/l).

1.3.3 Kalium

Das Kalium-Kation besitzt laut BAILEY (1961) im Speichel eine niedrigere Konzentration als im Pansensaft (30-80 mmol/l). Die K^+ -Konzentration im Plasma beträgt nur 3,5-4,5 mmol/l (Kraft und Dürr, 1999). Nach den Mahlzeiten (1-2 h nach Fütterung) sind die höchsten Konzentrationen für K^+ (bis zu 111 mmol/l) im Pansen zu finden, das Kation ist dafür bekannt, schnell in Lösung zu gehen (Bennink *et al.*, 1978). Im Vergleich zwischen verschiedenen Futterarten wurden bei BENNINK (1978) die höchsten K^+ -Konzentrationen bei Heufütterung und Luzerne-Pellets erreicht. Bei Pelletierung des Futters ist eine schnellere Freisetzung des Kations dafür verantwortlich, dass rasch ein Maximum erreicht wird. Der Anstieg der K^+ -Konzentration führt außerdem zu einem Abfall der Na^+ -Konzentration (s. 1.3.2). Im weiteren Verlauf fällt die K^+ -Konzentration als Folge von Absorption durch das Pansenepithel und Verdünnung durch den Speichel (Bailey, 1961; Bennink *et al.*, 1978).

1.3.4 Chlorid

Die Cl^- -Konzentration in der Pansenflüssigkeit liegt mit 10-20 mmol/l (Engelhardt und Breves, 2005) höher als im Speichel. Das Anion geht schnell in Lösung, so dass kurz nach der Mahlzeit (1-2 h) die höchste Konzentration (bis zu 34 mmol/l, (Bennink *et al.*, 1978)) erreicht wird. Wie bei K^+ sorgt anschließend die Verdünnung durch den Speichel und Absorption durch das Pansenepithel für einen Abfall der Konzentration (Bailey, 1961). Im Vergleich zwischen verschiedenen Fütterungen stellte BENNINK (1978) bei Konzentrat-Silage-Heu-Fütterung und Fütterung von Luzerne-Pellets einen starken Anstieg postprandial fest, bei anderen Futtermitteln (Maissilage oder kombinierte Heu-Silage-Konzentrat-Fütterung) erhielt er konstante Werte.

1.3.5 Phosphat

BAILEY bemerkte 1961, dass die Phosphat-Konzentration im Pansen je nach Futter variiert. Im Vergleich zum Speichel liegen abhängig davon gleiche, höhere oder niedrigere (vor allem nach Heu- oder Silagefütterung) Konzentrationen (1-40 mmol/l, (Bennink *et al.*, 1978), 10-15 mmol/l, (Engelhardt und Breves, 2005)) vor. BAILEY (1961) vermutete, dass entweder unterschiedliche Absorptionsraten oder Veränderungen der Löslichkeit bzw. Bildung von unlöslichen Salzen vorliegen. Nach der Futteraufnahme erfolgt keine nennenswerte Veränderung (Bennink *et al.*, 1978).

1.3.6 Magnesium und Kalzium

Die mittlere Konzentration von Mg^{++} und Ca^{++} in der Pansenflüssigkeit (1-10 mmol/l im Mittel (Engelhardt und Breves, 2005), bis 18 mmol/l (Bennink *et al.*, 1978)) hängt im Wesentlichen von der Aufnahme über das Futter ab. BENNINK *et al.* (1978) bemerkten bei ihren Messungen eine enge Korrelation von Mg^{++}/Ca^{++} -Konzentration und pH-Wert, die auf eine

größere Löslichkeit von Mg^{++} und Ca^{++} in saueren Lösungen zurückzuführen ist. Der stärkste Anstieg von sowohl der Ca^{++} - als auch der Mg^{++} -Konzentration fand bei der Fütterung von Luzerne-Pellets (von 1,7/4,4 mmol/l auf 18,6/18 mmol/l) statt (Bennink *et al.*, 1978).

1.3.7 Flüchtige Fettsäuren

Als Endprodukte der mikrobiellen Fermentation fallen im Pansen vor allem die drei kurzkettigen Fettsäuren Acetat, Propionat und Butyrat an (s. Abb. 1).

Die Konzentration der flüchtigen Fettsäuren (short-chain fatty acids, SCFA) schwankt je nach Fütterung zwischen 100-200 mmol/l (Bennink *et al.*, 1978). Bei Aufnahme einer gleichen Energiemenge scheint jedoch die Fütterung verschiedener Futtermittel keinen Einfluss auf die Gesamtkonzentration der SCFA zu besitzen (Peters *et al.*, 1990).

Nach der Fütterung bemerkten verschiedene Autoren einen deutlichen Anstieg des SCFA-Gehaltes, der etwa zwischen der 2. und 5. Stunde nach Futteraufnahme stattfindet (Bennink *et al.*, 1978; Leedle *et al.*, 1982; Peters *et al.*, 1990). Die Höchstwerte werden bei Fütterungen mit leichtverdaulichen Kohlenhydraten (Konzentrat/ Pellets) erreicht (Bennink *et al.*, 1978). Bei einmaliger Fütterung pro Tag beobachteten LEEDLE *et al.* (1982) ein Absinken der SCFA-Konzentrationen erst nach 16 h bei Raufuttergabe, während bei Konzentratfutter der Konzentrationsabfall schon nach 8 h begann.

Bei einem Vergleich der verschiedenen Fettsäuren fällt auf, dass bei stärkereicher Fütterung der Anteil von Propionat an der Gesamtmenge der SCFA zunimmt, während der Anteil an Acetat abnimmt (Engelhardt und Breves, 2005; Leedle *et al.* 1982; Peters *et al.*, 1990). Dieser Effekt wird abgemildert, wenn die Tiere mehrmals am Tag Futter vorgelegt bekommen (Froetschel und Amos, 1991).

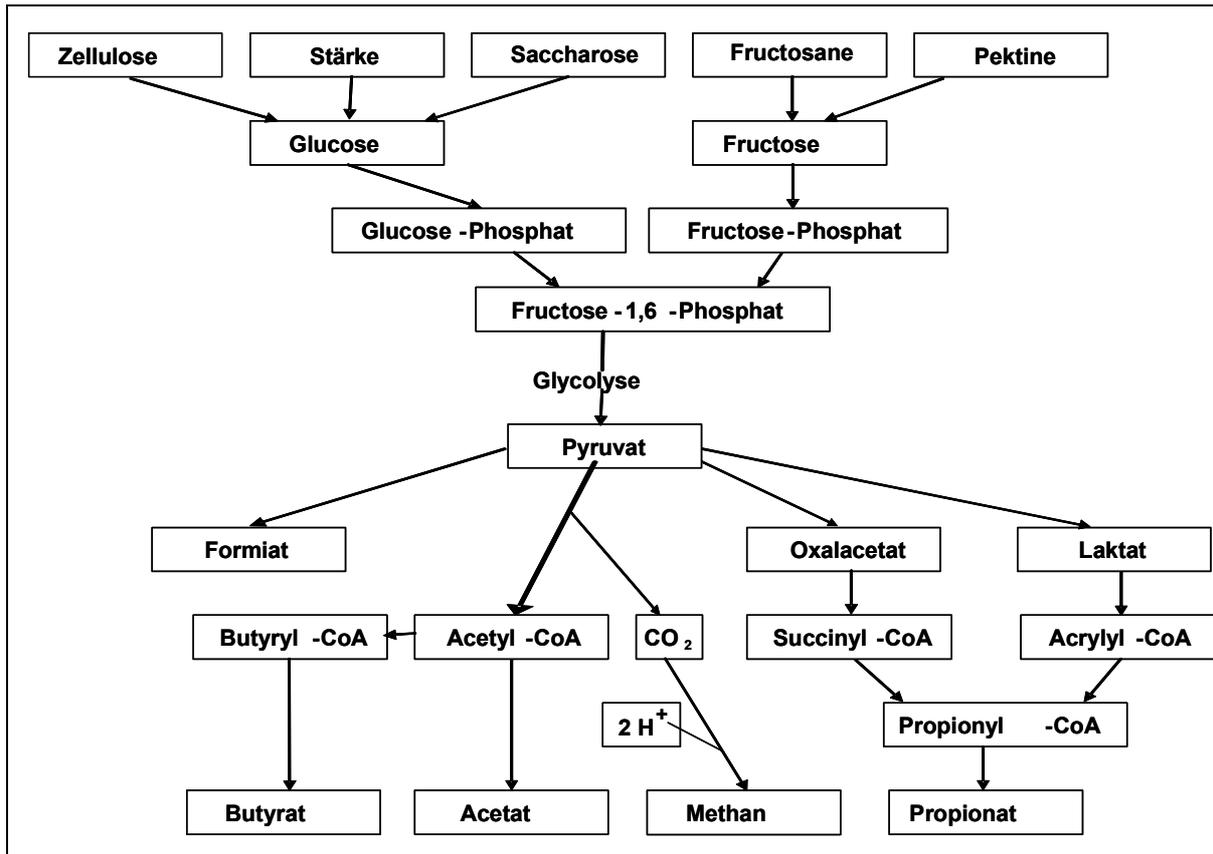


Abb. 1 Schematische Darstellung einiger mikrobieller Stoffwechselprozesse im Pansen.

1.3.8 Osmolarität, Volumen, Wasser

Der osmotische Druck einer Flüssigkeit kann in mosmol/l (Osmolarität) oder mosmol/kg (Osmolalität) ausgedrückt werden. Die quantitative Differenz zwischen Osmolarität und Osmolalität ist in den Lösungen, die im Tier vorkommen, weniger als 1 % (Guyton *et al.*, 1986), so dass der Unterschied zu vernachlässigen ist.

Grundsätzlich besteht im Panseninhalt eine Abhängigkeit der Osmolarität von mehreren Faktoren:

- Mineralstoffgehalt des Futters (dabei liegt die Summe der molaren Konzentration der Mineralstoffe unabhängig von der Fütterung über der Konzentration der SCFA (Bennink *et al.*, 1978)),
- Aktivität der Mikroben (Carter und Grovum, 1990),
 - Produktion von flüchtigen Fettsäuren (Froetschel und Amos, 1991),
 - Proteolyse (Entstehung von Ammonium-Ionen) (Warner und Stacy, 1965),
- Futter-Menge, die in einer bestimmten Zeit konsumiert wird (Warner und Stacy, 1965),
- Futterqualität (Kationen-Austausch und Hydrationskapazität der Pflanzenfasern (Allen, 1997) und Quelle der Rohfaser im Futtermittel (Froetschel und Amos, 1991))
- Wasseraufnahme (Carter und Grovum, 1990).

Vor der Fütterung ist die Osmolarität der Pansenflüssigkeit leicht hypoton (260-280 mmol/l, (Engelhardt und Breves, 2005); 285-340 mmol/kg (Bennink *et al.*, 1978)), ähnlich wie der Speichel, der mit einer Osmolalität von 259 mosmol/kg ebenfalls im hypotonen Bereich liegt. Nach der Fütterung wurde von BENNINK *et al.* (1978) eine Abhängigkeit der Osmolalität von dem aufgenommenen Futtermittel erfasst, während PETERS *et al.* (1990) bei Fütterung einer raufutterreichen oder einer konzentratfutterreichen Ration mit gleichem Energiegehalt weder in der Pansenflüssigkeit noch im Speichel einen Unterschied beobachten konnten. Beide Autoren sind sich aber einig, dass ein zeitabhängiger Effekt nach der Fütterung auftritt. Dabei verzeichneten BENNINK *et al.* (1978) bei Fütterung von Heu und Luzerne-Pellets die schnellsten Anstiege (bis 356 mosmol/kg bei Heufütterung/ bis 421 mosmol/kg bei Fütterung von Luzerne-Pellets), die Maxima traten nach 2-4 h auf. Diese Veränderungen sind hauptsächlich auf ein Ansteigen der SCFA-Konzentration zurückzuführen (Bennink *et al.*, 1978). Eine Osmolarität von 350 mosmol limitiert laut BERGEN (1972) das Fermentationgeschehen. Es bildet sich ein steady-state zwischen Fermentation und Verschwinden der organischen Säuren. Wenn also der osmotische Druck infolge Absorption des Pansenepithels von Ionen, Passage der Ionen zum Omasum und Wassereinstrom in den Pansen sinkt, steigt die Fermentation wieder an (Bennink *et al.*, 1978).

Dabei beobachteten WARNER & STACY (1972) ab 335 mosmol/kg einen Wassereinstrom, der eine Intensität von 65 ml/h (Gäbel *et al.*, 1987a) bis 290 ml/h erreichen kann. Höchstwahrscheinlich ist dafür die Kraft des osmotischen Gradienten zwischen Pansenflüssigkeit und dem Blut, das den Pansen durchfließt, verantwortlich (Dobson, 1984). Das maximale Volumen des Pansen wird bei einmaliger Fütterung pro Tag erreicht (Froetschel und Amos, 1991). PETERS *et al.* (1990) registrierten auch eine Steigerung des Volumens bei konzentratreicher Fütterung gegenüber raufutterreicher Fütterung.

Die Osmolalität im Speichel erfährt nach der Fütterung (3 h) unabhängig vom verwendeten Futtermittel einen Anstieg (Peters *et al.*, 1990). CHRISTOPHERSON und WEBSTER (1972) stellten fest, dass nach der Fütterung das Plasma-Volumen merkbar sinkt, wahrscheinlich infolge von Speichel-Produktion, Wassereinstrom in den Pansen und erhöhte Sekretion der Drüsen in Magen, Pankreas und Leber.

1.3.9 Ammoniak

Das im Pansen infolge von Proteolyse durch Bakterien entstehende Ammoniak liegt nur zu 0,1 Prozent als NH_3 vor. Aufgrund eines pK-Wertes von 9,25 ist der größte Teil des Ammoniaks protoniert und wird als Ammonium-Ion (NH_4^+) bezeichnet. Die NH_4^+ -Konzentration beträgt 3-10 mmol/l (in Extremfällen 30-40 mmol/l) und wird durch Freisetzung und Assimilation durch die Mikroorganismen, Hydrolyse des Harnstoffs aus dem ruminohepatischen Kreislauf, Resorption durch die Pansenwand und Abfluss in den unteren Verdauungstrakt bestimmt (Engelhardt und Breves, 2005). Die NH_4^+ -Konzentration scheint

aber auch je nach Schicht zu variieren, da in den Proben aus dorsalen, zentralen und ventralen Regionen ein signifikanter Unterschied der NH_4^+ -Konzentration ermittelt wurde. Dorsal traten dabei die höchsten Werte auf (Wohlt und Blaisdell, 1976).

Da Ammoniak im Gegensatz zu den Ammonium-Ionen per Diffusion durch die Pansenwand resorbiert wird (Engelhardt und Breves, 2005), ist die Resorption pH-Wert-abhängig. Bei höherem pH-Wert liegt mehr NH_3 vor, welches durch die Pansenwand aufgenommen werden kann.

Nach der Fütterung stellten WOHLT & BLAISDELL (1976) sowohl bei „normaler“ als auch bei konzentratreicher Ration einen Anstieg der NH_4^+ -Konzentration fest, wobei jeweils nach 30 bis 90 Minuten die höchsten Werte gemessen wurden. 8 h nach der letzten Fütterung wurde ein Anstieg beobachtet, der nicht zeitlich mit einer Fütterung korrelierte. WOHLT & BLAISDELL (1976) schlagen verschiedene Möglichkeiten vor, die dafür verantwortlich sein könnten. Zum einen wäre eine erhöhte Freisetzung von NH_4^+ aus den Bakterien denkbar, wenn die löslichen Kohlenhydrate oder die Energie für die Aminosäuresynthese fehlen. Zum anderen hätte eine erhöhte Aktivität von cytolytischen Bakterien bei der Verstoffwechslung von anderen Mikroorganismen diesen Effekt.

LEEDLE et al. (1982) bemerkten nur bei Fütterung einer raufutterreichen Ration einen Anstieg der NH_4^+ -Konzentration von 16 mmol/l auf 23,2 mmol/l. Bei konzentratreicher Ration fand dagegen ein Absinken der NH_4^+ -Konzentration von ca. 20 mmol/l auf 14 mmol/l statt. Die Experimente von WOHLT & BLAISDELL (1976) zeigten gegensätzliche Ergebnisse: Unter Fütterung einer konzentratreichen Ration ergaben sich höhere NH_4^+ -Konzentrationen im Gegensatz zur „normalen“ Ration, obwohl die Tiere bei „normaler“ Ration mehr Rohprotein aufnahmen. Die Autoren weisen aber auch darauf hin, dass nach Verrechnung mit dem Volumen kein Unterschied zwischen den Mengen an Ammonium-Ionen festzustellen war.

1.3.10 pH-Wert

Der pH-Wert (potentia hydrogenii) der Pansenflüssigkeit beträgt unter physiologischen Bedingungen 5,5 bis 7,0. Er wird durch die Konzentration der SCFA (d. h. durch die Menge an leicht verdaulichen Kohlenhydraten im Futter), den Speichelfluss (vor allem beim Wiederkauen) und damit dem Rohfaseranteil der Nahrung und dem Hydrogencarbonatgehalt (Puffersystem) beeinflusst, der auch durch Sekretion von Bicarbonat durch das Pansenepithel gesteigert werden kann. BENNINK et al. (1978) stellten ein reziprokes Verhältnis zwischen pH-Wert und SCFA-Konzentration fest.

Bei einer raufutterreichen Ration sinkt der pH-Wert von 7,2 auf ein Minimum von 6,2 nach 8 h, während bei konzentratreicher Ration der pH-Wert von einem niedrigeren Ausgangswert (6,4) nach 4 h auf ein Minimum von 5,7 fällt. Anschließend steigt der pH-Wert langsam und kehrt zum Ausgangswert zurück (Leedle et al., 1982). Die Ergebnisse der Versuche von

BENNINK et al. (1978) fallen sehr ähnlich aus.

Eine Beprobung in der Mitte des Pansens ergibt die niedrigsten pH-Werte (Duffield *et al.*, 2004), am repräsentativsten erscheint die Beprobung cranial und ventral, da dort die größte Durchmischung stattfindet (Duffield *et al.*, 2004).

1.4 Zellphysiologie: Transportvorgänge am Pansenepithel

1.4.1 Allgemein

Das Pansenepithel ist, wie in 1.2.2 beschrieben, ein mehrschichtiges, verhorntes Epithel, das einen dichten Zellverband darstellt. Somit werden parazelluläre Bewegungen von Molekülen durch das Epithel erschwert. Die im Folgenden dargestellten Ionen und Nährstoffe (SCFA) müssen also transzellulär durch das Pansenepithel befördert werden, die Vernetzung der Zellen durch „gap junctions“² erleichtert diesen Weg. Der transzelluläre Transport kann aktiv oder passiv stattfinden. Den passiven Transportweg stellt die Diffusion dar, die durch einen chemischen oder elektrischen Gradienten ermöglicht wird. Wichtig sind hierbei lipophile Eigenschaften und eine kleine Teilchengröße. Die erleichterte Diffusion erfolgt durch Carrier- oder Kanalproteine in der Zellmembran. Ein aktiver Transport ist ein Transport gegen einen chemischen oder elektrischen Gradienten. Man unterscheidet hierbei den primär aktiven Transport über eine Ionenpumpe unter Verbrauch von Energie (ATP) und den sekundär aktiven Transport. Beim sekundär aktiven Transport wird der Konzentrationsgradient, der für ein bestimmtes Ion besteht, für den Transport eines weiteren ausgenutzt.

1.4.2 Untersuchungsmethoden: Ussing-Kammer (in vitro) und gewaschener Pansen (in vivo)

Mit der *in vitro*-Versuchsmethode Ussing-Kammer ist es möglich, die Menge einer gegebenen Ionen-Art, die pro Zeiteinheit eine Membraneinheit in einer Richtung durchquert, zu bestimmen (= Flux) (Ussing, 1949).

Im Gegensatz dazu werden bei der *in vivo*-Versuchsmethode „gewaschener Pansen“ Ionen-Ströme aus dem Pansen in das Epithel dargestellt, indem das „Verschwinden“ der Ionen aus der in den isolierten Pansen eingegebenen Lösung gemessen wird.

Der Transport in oder durch das Pansenepithel sagt aber noch nichts über den vorliegenden Transportmechanismus aus. Für die Charakterisierung der im Pansenepithel vorhandenen Mechanismen wurden verschiedene Inhibitoren eingesetzt, die Konzentrationen der Ionen und der pH-Wert wurden variiert und bestimmte Ionen wurden durch inaktive Metaboliten oder nicht-transportfähige Ionen ersetzt. Ein Großteil der vorhandenen Transportsysteme

² Gap junctions sind Zell-Zell-Kanäle (lat. Nexus) aus porenbildenden Proteinkomplexen (Connexone), die beide Plasmamembranen der benachbarten Zellen durchqueren, den Spalt zwischen den Zellen überbrücken und dadurch die Cytoplasmen der Zellen miteinander verbinden.

konnte auf diesem Wege am Pansenepithel bestimmt werden.

1.4.3 Natriumtransport über das Pansenepithel

1.4.3.1 Allgemein

Während im Pansen eine Na^+ -Konzentration von 20-160 mmol/l (siehe 1.3.2) gemessen wurde, beträgt die Konzentration für Na^+ in der Zelle nur 10-15 mmol/l (Dobson, 1959). Es besteht also ein Konzentrationsgradient für den Eintritt von Na^+ in die Zelle. Gleichzeitig ist das Zellinnere negativ geladen (Martens *et al.*, 1990), was einen Kationeneinstrom zusätzlich begünstigt. Das Blutplasma enthält Na^+ in einer Konzentration von 139-145 mmol/l (Martens *et al.*, 1990). Außerdem ist die Blutseite sowohl gegenüber dem Panseninhalt, als auch gegenüber dem Zellinneren positiv geladen (30-60 mV) (Dobson, 1959; Martens und Blume, 1987). Von der Zelle in Richtung Blut muss Na^+ also gegen einen chemischen und einen elektrischen Gradienten transportiert werden.

1.4.3.2 Beeinflussung des Natriumtransportes

In *in vitro*-Versuchen wurde gezeigt, dass der Na^+ -Transport durch hohe Konzentrationen von Amilorid (1mM), einem Hemmer des NHE (Benos, 1982), zu 87 % reduzierbar ist (bei Verwendung von Pufferlösungen arm an permeablen Ionen wie Chlorid, Bicarbonat und SCFA) (Martens und Gäbel, 1988) und auch der Karboanhydrase-Hemmer Azetazolamid den Na^+ -Transport senkt (Emanovic *et al.*, 1976). Dagegen zeigten sowohl Hemmer des Na^+ - K^+ - Cl^- -Kotransporters wie Bumetanid oder Furosemid (Martens und Gäbel, 1988) als auch Hydrochlorothiazid (Hemmer des Na^+ - C^- -Kotransporters) (Gäbel *et al.*, 1993) und DIDS (Hemmer der Cl^- -Bicarbonat-Austauschers) (Sehested *et al.*, 1996) keine Effekte. Genauso wenig wurde eine Beeinflussung durch eine veränderte K^+ -Konzentration festgestellt (Martens und Gäbel, 1988). HARRISON *et al.* (1975) beobachteten einen vollständigen Stillstand des Transportes bei Zugabe von Ouabain, einem Hemmer der Na^+ - K^+ -ATPase. Die Betrachtung dieser Versuchsergebnisse haben zu der Annahme der unter 1.4.3.3 vorgestellten Transportwege für Na^+ geführt.

1.4.3.3 Transportwege für Natrium im Pansenepithel

Die Absorption von Na^+ aus dem Pansen wurde schon 1959 von DOBSON nachgewiesen (Dobson, 1959). FERREIRA bewies (1964), dass ein aktiver Transport stattfindet. Im Verlauf der nächsten Jahre wurde gezeigt, dass auf der apikalen Zellmembran zwei Mechanismen für den Na^+ -Transport in die Zelle vorhanden sind: Ein elektroneutraler Mechanismus über einen NHE (NHE3, 80-90% des Transportes) und ein elektrogener Transport über einen Na^+ -Kanal (Lang und Martens, 1999; Leonhard-Marek *et al.*, 2005; Martens und Gäbel, 1988). Ein Transport über zwei verschiedene Mechanismen ist sinnvoll, weil im Pansen große

Schwankungen in der Na^+ -Konzentration vorkommen. Bei niedrigen Konzentrationen reduziert sich der chemische Gradient und nur mit Hilfe des elektrischen Gradienten ist die Aufnahme von Na^+ in die Zelle möglich. Bei hohen Konzentrationen dagegen verschiebt sich das Verhältnis der Transportmechanismen zugunsten des NHE, da in diesem Falle der Konzentrationsgradient stark ausgeprägt ist (Martens *et al.*, 1990).

Auf der basolateralen Seite ist zunächst ein primär aktiver Transport notwendig, um den Konzentrationsgradienten für Na^+ aufrecht zu erhalten. Dort ist die Na^+ - K^+ -ATPase lokalisiert, die jeweils 3 Na^+ in Richtung Blut und 2 K^+ unter Spaltung von einem ATP in die Zelle befördert (Martens *et al.*, 1990; Sen und Post, 1964; Skou und Esmann, 1992; Thomas, 1969).

Zwei weitere auf der basolateralen Seite der Pansenepithelzelle gelegene Mechanismen haben eine regulierende Wirkung auf den intrazellulären pH-Wert: 2003 gelang es HUHN *et al.* sowohl an kultivierten Pansenepithelzellen, als auch am intakten Pansenepithel einen Natrium-Bicarbonat-Cotransporter (NBC) nachzuweisen. Der NBC transportiert Na^+ zusammen mit Bicarbonat in die Zelle. Er wird durch den Konzentrationsgradienten für Na^+ und den elektrischen Gradienten angetrieben (Blutseite positiv).

Gleichzeitig existiert ein NHE auf der basolateralen Membran der Pansenepithelzelle (NHE1, (Suplie, 2005)), der Protonen aus der Zelle in Richtung Blut schleust. Wie NHE3 ist auch NHE1 durch Zugabe von Amilorid hemmbar (Yun *et al.*, 1995a; Yun *et al.*, 1995b).

1.4.4 Kaliumtransport über das Pansenepithel

Die K^+ -Konzentration in der Pansenflüssigkeit unterliegt starken Schwankungen. Sie verhält sich reziprok zur Na^+ -Konzentration (siehe 1.3.3). Vor allem bei der Fütterung von Futtermitteln mit einem großen Anteil an leichtverdaulichen Kohlenhydraten und K^+ kommen Konzentrationen von über 100 mmol/l in der Pansenflüssigkeit vor (Engelhardt und Breves, 2005). Dagegen beträgt die Plasmakonzentration für K^+ nur 4-5 mmol/l (Engelhardt und Breves, 2005). Es besteht also ein deutlicher chemischer Gradient für die Aufnahme von K^+ über das Pansenepithel.

In vivo wurde entsprechend dem Konzentrationsgradienten eine Nettoresorption von K^+ beobachtet (Scott, 1967), *in vitro* wurde bei gleicher Konzentration auf der mucosalen und serosalen Seite eine Nettosekretion gemessen (Ferreira *et al.*, 1964).

Es ist bekannt, dass basolateral die Na^+ - K^+ -ATPase zwei Kaliumionen im Austausch gegen drei Natriumionen in die Zelle pumpt. Der K^+ -Transport ist nachweislich durch das Hemmen der Na^+ - K^+ -ATPase mittels Ouabain deutlich vermindert (Harrison *et al.*, 1975). Basolateral werden K^+ -Kanäle vermutet, durch die das K^+ rezirkuliert und damit den osmotischen Druck der Zelle stabil hält (Martens *et al.*, 1990). MARTENS nahm an, dass im Pansenepithel auch ein apikaler K^+ -Kanal existiert (Martens *et al.*, 1990). Diese Annahme wurde durch die Tatsache gestützt, dass die transepitheliale Potentialdifferenz (PD_t) des Pansenepithels von

der intraruminalen K^+ -Konzentration abhängt (Ferreira *et al.*, 1966; Leonhard-Marek und Martens 1996). Eine Erhöhung der luminalen K^+ -Konzentration hat eine Erhöhung der PD_t zur Folge (Engelhardt und Breves, 2005). 2005 wurde durch ABDOUN *et al.* der Beweis geführt, dass ein apikaler Kanal in den Pansenepithelzellen sowohl K^+ als auch NH_4^+ transportiert, wobei die Permeabilität von der Konzentration der Ionen abhängt (Abdoun *et al.*, 2005).

1.4.5 Chloridtransport über das Pansenepithel

Bei der Untersuchung des Cl^- -Transportes am Pansenepithel fiel auf, dass eine enge Kopplung mit Na^+ besteht: Bei Na^+ -armem Medium fiel der Cl^- -Transport ab, im Gegenzug sank der Na^+ -Transport bei Cl^- -Mangel im Medium (Chien und Stevens, 1972). Da aber ein Na^+ - Cl^- -Cotransport ausgeschlossen werden kann (keine Hemmung durch Hydrochlorothiazid, siehe 1.4.3), wird eine indirekte Kopplung in Form eines Anionen-Austauschers (AE, Chlorid-Bicarbonat-Austauscher) vermutet (Martens und Gäbel, 1988). Der gemeinsame Nenner ist hierbei die Karboanhydrase, durch deren Aktivität H^+ und HCO_3^- entstehen. Das H^+ stellt das Austausch-Ion am NHE dar, während das HCO_3^- im Austausch mit Cl^- ins Pansenlumen sezerniert wird und einer Übersäuerung des Inhalts entgegenwirkt. Es handelt sich also um einen sekundär aktiven Transportmechanismus (Chien und Stevens, 1972; Ferreira *et al.*, 1972; Martens und Gäbel, 1988).

Diese Theorie wird durch eine Beeinflussung mit Azetazolamid (Hemmer der Karboanhydrase) untermauert (Emanovic *et al.*, 1976). Na^+ - und Cl^- -Transport zur Blutseite werden bei Einsatz dieses Hemmstoffes deutlich vermindert. Zusätzlich konnte eine Hemmung des Cl^- -Transportes unter Zugabe von DIDS, SITS und Nitrat nachgewiesen werden (Gäbel *et al.*, 1993).

Über den basolateralen Transportweg für Cl^- ist bislang nichts bekannt.

1.4.6 Transport von kurzkettigen Fettsäuren über das Pansenepithel

1.4.6.1 Allgemein

Die flüchtigen Fettsäuren, die im Pansen hauptsächlich durch mikrobiellen Abbau von Kohlenhydraten entstehen (siehe 1.3.7), führen durch ihren niedrigen pK-Wert zu einer Ansäuerung der Pansenflüssigkeit. Der von den Tieren produzierte Speichel kann auch unter physiologischen Fütterungsbedingungen nur 15-20% der produzierten SCFA neutralisieren, was zu einem pH von unter 4,5 führen würde (Ash und Dobson, 1963). Die Fettsäuren müssen also effektiv aus dem Pansen resorbiert werden, da sie noch dazu wichtige Energielieferanten des Wiederkäuers darstellen (Bergman, 1990; Bugaut, 1987).

Die Konzentration der Fettsäuren im Pansenlumen variiert mit der Fütterung und beträgt 60 bis 160 mmol/l (Gäbel und Sehested, 1997). Damit besteht ein starker

Konzentrationsgradient, denn die Fettsäurekonzentration in der Pansenvene liegt bei nur 5 mmol/l (Gäbel und Sehested, 1997).

1.4.6.2 Transportwege für kurzkettige Fettsäuren über das Pansenepithel

Es wird allgemein angenommen, dass eine passive und transzelluläre Aufnahme der Fettsäuren erfolgt (Engelhardt und Breves, 2005; Gäbel *et al.*, 2002; Gäbel und Sehested, 1997; Martens *et al.*, 1990; Sehested *et al.*, 1999a). Dabei kommen ein passiver Transport durch reine Diffusion in undissoziierter, protonierter Form und ein sekundär aktiver Transport als deprotoniertes Anion in Frage. Der sekundär aktive Transport muss elektroneutral sein, da keine Korrelation mit dem Kurzschlussstrom besteht und eine Aufnahme in die Zelle gegen den elektrischen Gradienten unwahrscheinlich ist (Gäbel und Sehested, 1997). Ein Austausch mit HCO_3^- über einen Anionen-Austauscher (AE) wäre also denkbar (Ash und Dobson, 1963; Gäbel und Sehested, 1997; Gäbel *et al.*, 1991b; Kramer *et al.*, 1996; Sehested *et al.*, 1999a), da zusätzlich eine Hemmung durch DIDS und Nitrat beobachtet wurde (Gäbel und Sehested, 1997; Kramer *et al.*, 1996; Sehested *et al.*, 1999b). Ein Ersatz von SCFA durch Gluconat kehrte tatsächlich die HCO_3^- -Sekretion in HCO_3^- -Absorption um (Gäbel *et al.*, 1991a). Gestützt wird die Vermutung des Transportes über einen Anionen-Austauscher durch die Wechselwirkung mit Cl^- . Bei hoher Cl^- -Konzentration sinkt die Fettsäureabsorption, eine hohe Fettsäurekonzentration hat anders herum eine niedrigere Cl^- -Aufnahme zur Folge (Kramer *et al.*, 1996).

Eine Aufnahme hauptsächlich über Diffusion wird von MARTENS (1990) postuliert. Dabei kommen verschiedene Protonenlieferanten in Frage: Der NHE, der intraruminale Kohlensäurezerfall zu H^+ und HCO_3^- (Ash, 1963) und die vakuoläre Protonen-ATPase (vHATPase) (Schweigel und Martens, 2003). Die Resorptionsrate der Fettsäuren nimmt entsprechend der Diffusionstheorie mit steigender Kettenlänge und damit steigender Lipidlöslichkeit zu, d.h. bei gleichen Konzentrationen wird Butyrat > Propionat > Acetat resorbiert (Gäbel *et al.*, 2002; Gäbel *et al.*, 1991a). GÄBEL stellt jedoch in seinem Review von 2002 fest, dass in allen Absorptionsstudien die Differenz in der Absorptionsrate der Fettsäuren wesentlich kleiner ist, als die Differenz in der Lipophilität (Gäbel *et al.*, 2002).

Über die basolaterale Abgabe der Fettsäuren in Richtung Blut gibt es neue Erkenntnisse am Pansen von Ziegen. KIRAT *et al.* (2006) konnten durch *in vivo*- und *in vitro*-Studien einen direkten Zusammenhang zwischen MCT1 und dem transepithelialen Transport bzw. Efflux von SCFA durch Stratum spinosum und Stratum basale nachweisen. An anderen Epithelien (Colon des Menschen und des Schweines) werden die Fettsäuren sowohl apikal in Austausch mit Bicarbonat als auch basolateral zusammen mit Protonen über einen Monocarboxylat-Transporter (MCT) transportiert (Cuff *et al.*, 2002; Cuff und Shirazi-Beechey, 2002; Ritzhaupt *et al.*, 1998a; Ritzhaupt *et al.*, 1998c).

1.4.6.3 Metabolisierung der Fettsäuren in der Pansenepithelzelle

In der Zelle werden die Fettsäuren entsprechend dem intrazellulären pH-Wert zum größten Teil deprotoniert und dienen zum Teil der Energieversorgung der Pansenepithelzelle (Stevens und Stettler, 1966). Über den Prozentsatz, der verstoffwechselt wird, gibt es unterschiedliche Angaben. Es steht fest, dass weniger Butyrat als Acetat und Propionat im Portal-Blut gemessen wurden (Masson und Phillipson, 1951). Kristensen et al. (2000) beobachteten, dass bis zu 95% des absorbierten Propionats im Portalblut ankommen, dagegen sollen bis zu 95% des absorbierten Butyrats im Pansenepithel metabolisiert werden (Bergman, 1990; Gäbel *et al.*, 2002; Sehested *et al.*, 1999a). Acetat verhält sich ähnlich wie Propionat und wird kaum verstoffwechselt (Gäbel *et al.*, 2002). Für die Metabolisierung werden die Fettsäuren zunächst durch Acyl-CoA-Synthetasen mit Koenzym A (CoA) gekoppelt. Im Pansenepithel kommen 2 Acyl-CoA-Synthetasen vor, eine nicht-spezifische für alle drei kurzkettigen Fettsäuren und eine spezifische für n-Butyrat (Scaife und Tichivangana, 1980). Bei der Metabolisierung entstehen außer Energie auch Ketonkörper wie Beta-Hydroxy-Butyrat und Acetoacetat (Baldwin und Jesse, 1996). Diese können nach Ausschleusung aus der Zelle über einen Monocarboxylat-Transporter (MCT, (Müller *et al.*, 2002)) mit Hilfe des Blutstromes zu anderen Geweben gelangen und dort zur Energiegewinnung dienen (Holtenius und Holtenius, 1996). Gleichzeitig wird ein Proton aus der Zelle geschleust (Müller *et al.*, 2002).

1.4.7 Magnesiumtransport über das Pansenepithel

Der Pansen ist das Hauptabsorptionsorgan für Mg^{++} innerhalb der Vormägen (Martens, 1978).

Für Mg^{++} besteht zwar ein chemischer Gradient, der die Mg^{++} -Aufnahme fördert, der elektrische Gradient wirkt jedoch entgegengesetzt und macht eine passive Mg^{++} -Aufnahme unmöglich (Martens, 1978; Martens und Hammer, 1981; Martens und Harmeyer, 1978). MARTENS (1978) beobachtete außerdem eine Kopplung mit Na^+ .

Weitere Untersuchungen ergaben, dass zwei Mechanismen für die Aufnahme von Mg^{++} existieren: ein elektroneutraler, K^+ -insensitiver Transport (62 %), der vom intrazellulären pH-Wert und damit von der SCFA-Aufnahme der Zelle abhängt und ein elektrogener, Potentialdifferenz-abhängiger und K^+ -sensitiver Transport (wahrscheinlich über einen Kanal) (Leonhard-Marek und Martens, 1996; Schweigel und Martens, 2000). Aufgrund der Abhängigkeit vom intrazellulären pH-Wert wurde zunächst ein Austausch gegen 2 H^+ (Schweigel *et al.*, 1999) vermutet. Schließlich wurde ein Anionen-Kotransport zur Diskussion vorgeschlagen (HCO_3^- -Kotransport (Schweigel *et al.*, 2000), Cl^- -Kotransport (Schweigel und Martens, 2003)). Im Zusammenhang mit dem Cl^- -Kotransport wurde an kultivierten Pansenepithelzellen eine vHATPase nachgewiesen, die an der apikalen Zellmembran H^+ unter Aufwenden von Energie in das Pansenlumen sezerniert (Schweigel und Martens,

2003) und wahrscheinlich die Mg^{++} -Resorption fördert. Die vHATPase wurde 2005 von SUPLIE auch am frisch entnommenen Pansengewebe nachgewiesen (Suplie, 2005).

1.4.8 Adaptation des Pansenepithels auf funktioneller Ebene

Im Verlauf von Fütterungsumstellungen, bei denen der Raufutteranteil zugunsten des Kraffutteranteils reduziert wird, verändern sich verschiedene Parameter der Pansenflüssigkeit. Unter anderem akkumulieren ruminale Fermentationsprodukte wie kurzkettige Fettsäuren und CO_2 . Dadurch sinkt der pH-Wert und die Osmolarität steigt an (siehe 1.3). Während der Umbau des Epithels auf morphologischer Ebene längere Zeit dauert (s. 1.2.4), müssen die Epithelzellen auf funktioneller Ebene schneller reagieren. Bei verschiedenen Transportvorgängen des Pansenepithels wurde eine Steigerung beobachtet.

1.4.8.1 Stimulation des Natrium-Transportes

Eine Stimulation des Na^+ -Transportes über das Pansenepithel wurde allgemein bei Konzentratfütterung (Gäbel *et al.*, 1987a; Sehested *et al.*, 1997; Suplie, 2005) und speziell Erhöhung der SCFA-Konzentration (Diernaes *et al.*, 1994; Gäbel, 1988; Gäbel *et al.*, 1987a; Uppal *et al.*, 2003a) beschrieben.

Bei erhöhter SCFA-Konzentration diffundieren mehr protonierte Fettsäuren ins Zellinnere, die dort aufgrund ihres niedrigen pK-Wertes dissoziieren und H^+ freigegeben. Dabei ist der stimulierende Effekt bei allen drei SCFA gleich (Sehested *et al.*, 1996).

Die vermehrte Anflutung der protonierten SCFA bewirkt also eine vermehrte Bereitstellung von H^+ im Inneren der Zelle, die den Na^+ -Transport über den NHE anregt.

Dass es sich bei konzentratreicher Fütterung tatsächlich um eine Steigerung des elektroneutralen Transportes handelt, konnten SHEN *et al.* (2004b) nachweisen. Der Na^+ -Transport ließ sich durch Zugabe des NHE-spezifischen Hemmstoffes Amilorid blockieren.

In vivo steigt der Na^+ -Transport auch bei Senkung des luminalen pH-Wertes (von 7,3 auf 6,5) an (Gäbel *et al.*, 1991b), da mit sinkendem pH-Wert der Anteil der protonierten Fettsäuren steigt und damit die Möglichkeit zur vermehrten Diffusion durch die Zellmembran gegeben ist. Im Gegensatz dazu führt ein Überschreiten der physiologischen Grenzen (pH 5,5/pH 4,79) zu einer Reduktion des Transportes *in vitro* und *in vivo* (Gäbel *et al.*, 1989; Gäbel *et al.*, 1987a), wobei GÄBEL *et al.* (1987a) feststellten, dass das Maß an Reduktion von der vorherigen Fütterung (über 15 Wochen) abhängt.

UPPAL *et al.* (2003a) beobachteten *in vitro* bei heugefütterten Schafen eine Sättigung der Na^+ -Absorption bei 80 mmol/l Fettsäuren, während bei konzentratgefütterten Schafen eine lineare Steigerung des Na^+ -Nettotransportes bei 80, 100 und 120 mmol/l Fettsäuren stattfand.

Über den Einfluss der Osmolarität auf die Na^+ -Absorption *in vivo* sind mehrere Versuchsergebnisse vorhanden: Während GÄBEL *et al.* (1987b) am gewaschenen Pansen

bei 422 mosmol/l (gegenüber 315 molmol/l) unabhängig von der Fütterung keine Veränderung der Na⁺-Absorption feststellen konnten, wurde bei TABARU et al. (1990) eine sinkende Absorption bei 500 mosmol/l (gegenüber 300 mosmol/l) beobachtet.

LODEMANN & MARTENS (2006) entdeckten bei Versuchen in der Ussing-Kammer eine fütterungsabhängige Adaptation des Pansenepithels von Schafen gegenüber einer luminalen Hyperosmolarität. Dabei bewirkte der luminal erhöhte osmotische Druck einen erhöhten Na⁺-Transport von serosal nach mucosal und folglich einen reduzierten Netto-Transport für Na⁺. Die Leitfähigkeit nahm bei luminaler Hyperosmolarität zu. Dieser Effekt war jedoch bei den Schafen am geringsten, die eine konzentrat-supplementierte Fütterung erhielten.

SCHWEIGEL et al. (2005) fassten den Einfluss der Osmolarität auf den Na⁺-Transport folgendermaßen zusammen: Zwei voneinander unabhängige Effekte wirken auf den Na⁺-Transport bei Hyperosmolarität ein: 1. Die Steigerung der passiven Permeabilität und 2. die Hemmung des NHE. Dementsprechend ist der Netto-Transport in Richtung Blut erniedrigt, einerseits durch den verminderten Transport von mucosal nach serosal durch den gehemmten NHE, andererseits durch die vermehrte Bewegung von Na⁺ in Richtung Pansenslumen durch die erhöhte passive Permeabilität.

Bei konzentratgefütterten Schafen wurde eine Stimulation der Na⁺-Transportes durch Ammoniak/Ammonium-Ionen (NH₃/NH₄⁺) festgestellt, die bei heugefütterten Schafen ausblieb (Abdoun *et al.*, 2003). NH₃ und NH₄⁺ gelangen durch unterschiedliche Mechanismen in das Pansenepithel: Die Aufnahme von NH₃ in die Epithelzellen erfolgt per Diffusion. Aufgrund des hohen pK-Wertes (9,25) wird NH₃ in der Zelle protoniert (NH₄⁺) und „stiehlt“ damit dem NHE das H⁺ (Abdoun *et al.*, 2003). Die Aufnahme von NH₄⁺ erfolgt über einen Kanal, der sowohl für K⁺ als auch für NH₄⁺ permeabel ist (Abdoun *et al.*, 2005). Durch Aufnahme über diesen Kanal stehen der Zelle mehr Protonen zur Verfügung und es erfolgt eine Stimulation des NHE. Der unterschiedliche Effekt von NH₃/NH₄⁺ auf den Na⁺-Transport bei heu- und konzentratgefütterten Schafen kann durch die Wirkung der Fütterung auf den luminalen pH-Wert erklärt werden. Der pH-Wert im Pansen bestimmt, welche Form (NH₃ oder NH₄⁺) in der Pansenflüssigkeit vorherrscht und damit auch, welche Form hauptsächlich in die Pansenzellen aufgenommen wird (Abdoun *et al.*, 2005).

1.4.8.2 Stimulation des Kaliumtransportes

Der K⁺-Transport ist sensibel für die Osmolarität der Pansenflüssigkeit. So entdeckten TABARU et al. (1990) eine Steigerung des K⁺-Transportes bei 500 mosmol/l gegenüber 300 mosmol/l.

1.4.8.3 Stimulation des Chloridtransportes

Während beim Na⁺-Transport *in vivo* eine deutliche Steigerung bei SCFA-reicheren Medien beobachtet wurde, ändert sich unter diesen Versuchsbedingungen der Cl⁻-Transport nicht

(Gäbel, 1988). Die Erhöhung der Osmolarität und der Laktatkonzentration hatten ebenfalls keinen Einfluss (Gäbel, 1988). Dagegen zeigte eine konzentratreiche Fütterung (Gäbel, 1988; Gäbel *et al.*, 1987a) stimulierende Wirkung. Bei pH-Senkung erfolgte auch eine Senkung des Cl⁻-Transportes, bei kraftfuttergefütterten Tieren minderte die luminale pH-Wert-Erniedrigung den Cl⁻-Nettotransport weniger als bei heugefütterten (Gäbel, 1988).

1.4.8.4 Stimulation des SCFA-Transportes

Die Absorptionsrate der SCFA steigt signifikant mit dem Angebot an SCFA (Lopez *et al.*, 2003). DOREAU *et al.* (1997) bemerkten eine Erhöhung der SCFA-Aufnahme um 32 %, als sie die Tiere nach Fütterung von 73 % des Energiebedarfs für 5 Wochen mit 126 % des Energiebedarfes fütterten. DIRKSEN (1984) verzeichnete ebenfalls eine deutliche Steigerung der Resorptionsleistung bei energiereich gefütterten Kühen. Eine Senkung des pH-Wertes führt ebenfalls zu einer Erhöhung der Resorptionsrate, der Effekt nimmt mit steigender Kettenlänge zu (Sehested *et al.*, 1999a). Stimulierende Wirkung zeigte auch ein gesteigertes Stickstoff-Angebot (Nocek *et al.*, 1980). Dagegen nimmt die Absorptionsrate bei steigender Osmolarität ab (Tabaru *et al.*, 1990).

1.4.8.5 Stimulation des Magnesiumtransportes

Eine Steigerung der Mg⁺⁺-Resorption konnte bei Konzentratfütterung (Gäbel *et al.*, 1987a) und Erhöhung der luminalen SCFA-Konzentration beobachtet werden (Leonhard-Marek, S. *et al.*, 1998). Die Osmolarität zeigte keinen Effekt (Gäbel *et al.*, 1987a), ein niedriger pH-Wert reduzierte die Mg⁺⁺-Aufnahme.

1.5 Molekularbiologie: Transportproteine/Enzyme im Pansenepithel

1.5.1 Einleitung

Die Stimulation auf funktioneller Ebene kann bei Versuchen am gewaschenen Pansen auf eine morphologische Adaptation in Form von Zottenverlängerung und Oberflächenvergrößerung zurückgeführt werden. Dabei findet eine Umstrukturierung des Gewebes statt.

Für die Versuche mit der Ussing-Kammer-Technik werden die eingespannten Gewebestücke immer dem Boden des ventralen Pansensackes entnommen und weisen makroskopisch keine Veränderungen in Zottenbesatz und Zottenlänge auf. Die höhere Transportleistung in diesen Gewebestücken z.B. für Na⁺ (Suplie, 2005) nach bereits einer Woche impliziert also in diesem Fall eine gesteigerte Leistung der Zellen eines Gewebestückes nach der Futterumstellung.

Eine gesteigerte Leistung der Einzelzellen kann einerseits durch Veränderung der Genexpression von Enzymen und Transportproteinen des Pansenepithels ausgelöst werden. Dabei kommt auf der Ebene der Transkription eine Änderung der mRNA-Kopienzahl bestimmter Gene durch gesteigerte Produktion von mRNA oder durch erhöhten Abbau/verringerte Produktion in Frage. Auch auf der Ebene der Translation ist eine Änderung der Genexpression möglich. Diese Formen der Adaptation werden als „long-term-regulation“ bezeichnet. Andererseits ist es ebenfalls möglich, dass die bereits vorhandenen Proteine über Enzyme oder Regulationsfaktoren zusätzlich aktiviert oder deaktiviert werden, z. B. durch Phosphorylierung/Dephosphorylierung. Eine weitere Strategie stellt das Fusionieren der Zellmembran mit Vesikeln aus dem Zellinneren dar, die ein intrazelluläres Reservoir für Transportproteine bieten (Exocytose bzw. „vesicle trafficking“). Diese beiden Mechanismen können schneller auf die Zellfunktionen wirken und werden daher mit dem Begriff „short-term-regulation“ charakterisiert.

Eine Änderung der mRNA-Kopienzahl kann relativ einfach untersucht werden und bietet eine erste Möglichkeit, die Adaptationsmechanismen des Pansenepithels zu untersuchen.

1.5.1.1 Quantifizierung der Genexpression

Zur Zeit sind 4 Methoden in Gebrauch, um die Transkription zu quantifizieren:

1. Das Northern Blotting wurde von dem Biochemiker Northern entwickelt. Dabei wird denaturierte und elektrophoretisch aufgetrennte RNA durch Kapillarkräfte, ein elektrisches Feld oder ein Vakuum auf Nitrocellulose oder Nylonfilter übertragen. Auf dem Filter wird die RNA mit einer spezifischen, radioaktiv markierten Sonde hybridisiert. Das Verfahren erlaubt eine Beurteilung von Größe und Integrität der mRNA und post-transkriptionelle Veränderungen der RNA wie alternatives Splicen.

2. Bei der In-Situ-Hybridisierung bindet die markierte radioaktive Sonde mit hoher Spezifität aufgrund komplementärer Sequenz an ein mRNA-Molekül, um die Verteilung spezifischer mRNA-Transkripte in einem Organismus, einem Gewebe oder innerhalb einer Zelle zu bestimmen. Die In-Situ-Hybridisierung kann auch zur Lokalisation von Gensequenzen auf bestimmten Chromosomen oder Chromosomenregion benutzt werden.

3. Der RNase protection assay gestattet das Auffinden von Intron-Exon-Grenzen, Initiation- und Termination-Stellen des Transkriptes und die Unterscheidung von verwandten mRNAs mit gleicher Größe.

Diese drei Methoden besitzen zwar eine hohe Spezifität, aber eine vergleichsweise niedrige Sensitivität.

4. Die vierte Methode ist die real-time Reverse Transkription Polymerase-Ketten-Reaktion. Diese in vitro Methode ist von den beschriebenen die sensitivste und flexibelste. Dabei werden definierte Sequenzen der RNA mit Hilfe von spezifischen Primern amplifiziert (auch aus einer Zelle) und die doppelsträngigen Anteile bei jedem PCR-Zyklus durch einen

fluoreszierenden Marker sichtbar gemacht. Die Auswertung der Fluoreszenzkurve ermöglicht einen Vergleich der mRNA-Level in verschiedenen Proben-Populationen und die Erstellung eines Musters der mRNA-Expression. Die anschließende Schmelztemperatur-Analyse oder eine Sequenzierung der Produkte lässt die Unterscheidung zwischen sehr verwandten RNAs und eine Analyse der RNA-Struktur zu.

1.5.2 Übersicht zu den biochemischen und molekularbiologischen Charakteristika der einzelnen Transporter/Enzyme

Im Folgenden werden einige wichtige Transportproteine und Enzyme der Pansenepithelzellen in ihrer Funktion, ihren biochemischen Eigenschaften, ihrem Vorkommen und ihrer Regulation charakterisiert.

1.5.2.1 Natrium-Protonen-Austauscher (NHE)

Sämtliche bekannte NHE transportieren 1 Natrium-Ion in die Zelle hinein und im Gegenzug 1 Proton aus der Zelle heraus (Burckhardt *et al.*, 2002; Wakabayashi *et al.*, 1997; Yun *et al.*, 1995b). Damit besitzen die NHE einige wichtige Funktionen für die Zelle: intrazelluläre pH-Homöostase, Regulation des Zellvolumens und Natrium-Transport (Orlowski und Grinstein, 1997).

Es wurden bisher 9 Isoformen des NHE entdeckt (s. Tab. 2), NHE1-4 sind auch in ihrer Regulation erforscht. NHE1-5 besitzen zu 34-60% die gleiche Aminosäuren-Sequenz bei einer Molekularmasse von 81-93 kDa (Burckhardt *et al.*, 2002; Kandasamy und Orlowski, 1996; Noel und Pouyssegur, 1995; Orlowski und Grinstein, 1997). NHE6 hat nur zu 20% Ähnlichkeit mit den anderen Isoformen (Orlowski und Grinstein, 1997). NHE7-9 sind strukturell divergenter und besitzen zum Teil nur 23-27% Aminosäuren-Übereinstimmung mit NHE1-6 (Nakamura *et al.*, 2005). Über NHE8 ist bekannt, dass es auch ein Kalium-Ion im Gegenzug zu einem Proton transportieren kann.

Die Primärstruktur des NHE weist ein langes N-terminales Ende (500 Aminosäuren) auf, das extrazellulär beginnt und 10-12 Mal die Zellmembran durchläuft (transmembranäre Segmente (=TM) 1-12). Das hydrophile C-terminale Ende (300 Aminosäuren) liegt im Zytosol (Orlowski und Grinstein, 1997). Die TM 6 und 7 sind die am meisten konservierten Regionen zwischen den Isoformen. Es wird vermutet, dass die NHE als Homodimere in der Membran vorliegen (Kandasamy und Orlowski, 1996; Orlowski und Grinstein, 1997). Die Aktivität der NHE wird durch zahlreiche Signale beeinflusst, wie zum Beispiel Neurotransmitter, Wachstumsfaktoren, Peptidhormone, cAMP, chemotaktische Reize, osmotische Verhältnisse, pH-Verhältnisse sowie Glucocorticoide und Schilddrüsenhormone (Kandasamy und Orlowski, 1996; Noel und Pouyssegur, 1995).

Tab. 2 Übersicht über die Eigenschaften der Isoformen NHE1-9

| Isoformen | Vorkommen | Lokalisation | Aktivierung durch | Hemmung durch |
|-----------|--|-----------------------|---|--|
| NHE1 | ubiquitär | basolateral | Wachstumsfaktoren, Proteinkinasen, Serumzugabe, Hyperosmolarität, cAMP, extra- und intrazelluläre Ionen (Na^+_{ez} , H^+_{iz} , $\text{Ca}^{2+}_{\text{iz}}$) | ATP-Mangel, Amilorid |
| NHE2 | Magen, Uterus, Niere, GIT, Nebenniere, Skelettmuskulatur, Leber, Trachea | Apikal | Siehe NHE1, außer cAMP | Azidose, Atp-Mangel, cAMP und Ca^+ erhöht, Hyperosmolarität |
| NHE3 | Niere, Magen, Darm | Apikal | Wachstumsfaktoren, Serumzugabe, Azidose, extra- und intrazelluläre Ionen (Na^+_{ez} , H^+_{iz}), Glucocorticoide | ATP-Mangel, Amilorid, Hyperosmolarität, cAMP und Ca^+ erhöht, NHERF1&2 (s.u.) |
| NHE4 | GIT, Uterus, Gehirn, Niere, Skelettmuskulatur | | Hyperosmolarität | ATP-Mangel, Amilorid |
| NHE5 | Gehirn, Milz, Hoden, Skelettmuskulatur | Nicht epithelial | | Amilorid |
| NHE6 | Gehirn, Skelettmuskulatur | Mitochondrial | | Amilorid |
| NHE7 | | Golgi-Apparat | | |
| NHE8 | Ubiquitär | Apikal, Golgi-Apparat | | |
| NHE9 | Ubiquitär | Endosomal | | |

Quellen: (Bookstein *et al.*, 1994; Bookstein *et al.*, 1999; Böttcher, 2000; Brant *et al.*, 1995; Burckhardt *et al.*, 2002; Doble *et al.*, 2002; Kandasamy und Orłowski, 1996; Lucioni *et al.*, 2002; Noel und Pouyssegur, 1995; Numata *et al.*, 1998; Orłowski und Grinstein, 1997)

Verschiedene Modelle wurden für die Untersuchung der Genexpression der Isoformen NHE1-3 genutzt.

1. Verstärkte Anflutung von Natrium und SCFA im Darm:

Ratten, die die lösliche Faser Pectin gefressen hatten, entwickelten im Colon eine zeitabhängige Zunahme an Protein, mRNA und Aktivität von NHE3, aber nicht von NHE2. Durch die Gabe von Pectin wird eine vermehrte Entstehung von SCFA im Colon hervorgerufen (Musch *et al.*, 2001).

FALCONE *et al.* (1999) und MUSCH *et al.* (2002) führten Untersuchungen der Genexpression von NHE1, 2 und 3 im Ileum nach Entfernung eines großen Teiles des Dünndarms (MSBR = massive small bowel resection) durch: Die Expression von mRNA und Protein für NHE3 steigerte sich 2,5-fach (Falcone *et al.*, 1999). Die Expression der

basolateralen Isoform NHE1 blieb unverändert (Musch *et al.*, 2002). Nach Entfernung von 80 % des Dünndarms wurde auch eine „Up“-Regulation von NHE2 und NHE3 im Colon beobachtet (Musch *et al.*, 2002). Dabei kommt es wahrscheinlich zu einer verstärkten Anflutung von Natrium-Ionen in den nicht resezierten Darmanteilen, die zu einer „Up“-Regulation führt (Musch *et al.*, 2002). Zugabe von EGF führte zu einer weiteren Steigerung der mRNA-Anzahl für NHE3, die NHE2-Expression blieb unverändert (Falcone *et al.*, 1999). KIELA *et al.* (2001) fanden bei Untersuchungen an Caco-2-Zellen heraus, dass Natrium-Butyrat im Gegensatz zu Natrium-Acetat und Natrium-Propionat die Transkription von NHE3 in seiner Eigenschaft als Histon-Deacetylase (HDAC) stimuliert. Dieser Effekt war abhängig von der Aktivität der Proteinkinase A (Kiela *et al.*, 2001).

2. Azidose und Entzündung:

Im Darm von Ratten mit induzierter Azidose wurde eine „Up“-Regulation von NHE2 und NHE3 in Protein und mRNA gemessen. Die mRNA-Menge von NHE1 blieb unverändert (Lucioni *et al.*, 2002). Nach Gabe des Entzündungsfaktors Interferon (IFN) gamma trat im Darmepithel von Ratten eine dosis-abhängige Reduktion der Aktivität, Protein-Expression und mRNA von NHE2 und NHE3 auf (Rocha *et al.*, 2001).

3. Einfluss von Proteinkinase C:

Die mRNA von NHE3, aber nicht von NHE1 oder NHE2, wurde vermindert durch Proteinkinase C alpha in Caco 2-Zellen (Alrefai *et al.*, 2001). Dagegen sorgte eine Aktivierung der Proteinkinase C im Experiment von ALPERN *et al.* (1993) für ein vermehrtes Vorkommen der mRNA von NHE1 in Primärkulturen von proximalen Tubuluszellen des Kaninchens.

1.5.2.2 Natrium-Protonen-Austauscher Regulations-Faktor (NHERF)

Der Natrium-Protonen-Austauscher Regulations-Faktor (NHERF) ist ein PDZ-Domäne-Protein. Unter dem Begriff PDZ-Domäne-Protein sind Proteine zusammengefasst, die Protein-Protein-Interaktionen ermöglichen. Sie sind nach den ersten drei Proteinen benannt, in denen diese Domänen, Regionen mit Sequenz-Homologie, gefunden wurden: PSD-95 (Post-Synaptic density-Protein mit 95 kDa), DLG (Disc large Protein aus *Drosophila melanogaster*) und ZO-1 (Zonula occcludens 1 Protein) (Harris und Lim, 2001). PDZ-Domänen sind relativ klein (ca. 90 Aminosäuren) und zu 6 β -Faltblättern (β A- β F) und 2 α -Helices (α A und α B) gefaltet. Peptid-Liganden binden in einer Rinne zwischen β B und α B durch einen speziellen Mechanismus (Harris und Lim, 2001). NHERF1 wurde 1993 von WEINMAN *et al.* in renalen Bürstensaum-Membran-Zellen entdeckt, als sie die Inhibition von NHE3 durch cAMP untersuchten. Wenig später konnte ein weiteres NHE3 Kinase-A Regulations-Protein identifiziert werden (E3KARP, später umbenannt zu NHERF2) (Yun *et al.*, 1997). Beide NHERF besitzen zwei PDZ-Domänen. Gleichzeitig wurde NHERF1 aufgrund seiner Eigenschaft, mit der Ezrin-, Radixin- und Moesin-Familie von Cytoskelett-

bindenden Proteinen zu interagieren, von RECZEK *et al.* (1997) gefunden und erhielt hier den Namen EBP50 (Ezrin-bindendes Protein, 50 kDa).

NHERF bildet einen Multiproteinkomplex. Dabei wird Ezrin über die PDZ II-Domäne von NHERF mit dem C-terminalen Ende von NHE3 verbunden, während Ezrin wiederum eine Verbindung zum Zytoskelett (Aktin) herstellt. Ezrin bietet außerdem der Proteinkinase A eine Verankerung. Die ERM-Domäne (Ezrin/Radixin/Moesin-bindende Domäne) von NHERF ist für die cAMP-abhängige Phosphorylierung zuständig (Weinman *et al.*, 2005). Im Gegensatz dazu findet unter Einfluss von β 2-adrenergen Agonisten eine Stimulation des NHE3 statt.

NHERF1 und 2 sind aber nicht nur für die Regulation von NHE3 zuständig. Sie gehen über ihre PDZ I oder II-Domäne Bindungen mit vielen verschiedenen Ionen-Transportern, Signalproteinen und Transkriptionsfaktoren ein (u.a. CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, H-ATPase, TRP4 und 6) (Shenolikar *et al.*, 2004; Weinman *et al.*, 2006). Außer in der Niere wurden NHERF 1 oder 2 in folgenden Geweben nachgewiesen: Retina-Pigment-Epithel (Nawrot *et al.*, 2004), Dünndarm (Morales *et al.*, 2004), Cochlea (Kanjhan *et al.*, 2006), Gehirn (Paquet *et al.*, 2006), Plazenta (Pepe *et al.*, 2001), Endometrium (Stemmer-Rachamimov *et al.*, 2001). Über die Regulation der Genexpression von NHERF1 oder 2 ist bislang nur ein Experiment von WEINMAN *et al.* (1999) veröffentlicht: Sie untersuchten die Genexpression von NHERF1 in OK-Zellen (Opossum kidney) bei Inkubation mit Serum oder cAMP für 6 und 24 h. Das mRNA-Level bei 24 h Inkubation mit cAMP veränderte sich im Gegensatz zum Protein-Vorkommen im Zytosol und membranassoziiert nicht. Das Protein-Vorkommen reduzierte sich um ca. 45 %. Bei Inkubation mit Serum sank sowohl das mRNA-Level als auch das Vorkommen der zytosolischen und membranären Proteinfractionen für NHERF1.

1.5.2.3 Bicarbonat-Transporter (NBC/AE)

Zu den Bicarbonat-Transportern zählen zwei Genfamilien: SLC4 (solute carrier) und SLC26.

Die Genfamilie SLC4 (s. Tab. 3):

Die Proteine der Genfamilie SLC4 besitzen 10-14 transmembranäre Segmente, eine lange hydrophile N-terminale Domäne und eine kürzere hydrophile C-terminale Domäne, beide Enden befinden sich intrazellulär (Romero *et al.*, 2004).

In der SLC4-Genfamilie sind 3 Chlorid-Bicarbonat-Transporter (AE1-3) und 5 mit Natrium gekoppelte Bicarbonat-Transporter (NBCe1, NBCe2, NBCn1, NDCBE, NCBE) enthalten. Der Transport ist bei NBCe1 und NBCe2 elektrogen (e für elektrogen), die anderen Transporter funktionieren elektroneutral (n für elektroneutral). Die meisten Mitglieder dieser Genfamilie sind mit DIDS hemmbar (Romero *et al.*, 2004). Ihre Aufgaben sind vielfältig: Sie sorgen durch Chlorid-Bicarbonat-Austausch in den Erythrozyten dafür, dass CO₂ von den Kapillaren der einzelnen Gewebe zu den Lungen-Kapillaren gelangt, sie ermöglichen die Sekretion oder Reabsorption von Säure-Basen-Äquivalenten in vielen Epithelien (zum Beispiel Natrium-

Bicarbonat-Reabsorption in der Niere, Salzsäure-Sekretion im Magen, Natrium-Bicarbonat-Sekretion im Pankreas) und sie sind an der NaCl-Reabsorption von bestimmten Epithelien massgeblich beteiligt (zum Beispiel am Ileum und proximalen Colon). Zu ihren Funktionen gehören außerdem die Regulation des Zellvolumens und des intrazellulären pH-Wertes (Romero *et al.*, 2004).

Tab. 3 Die SLC4-Genfamilie

| Genname | Proteinname | Substrat | Transport-Typ | Gewebeverteilung und zelluläre Expression |
|-----------------------------|--|---|-------------------------------|--|
| SLC4A1 | AE1 (Band 3) | Chlorid, Bicarbonat | Austauscher | Erythrozyten, intercalated Zellen des renalen Sammelrohres, Herz, Colon |
| SLC4A2 | A2 | Chlorid, Bicarbonat | Austauscher | Weit verbreitet, basolateral in den meisten Epithelzellen |
| SLC4A3 | A3 | Chlorid, Bicarbonat | Austauscher | Gehirn, Retina, Herzmuskel und glatte Muskulatur |
| SLCA4 | NBCe1 (NBC, NCB1) | Natrium, Bicarbonat (und/oder Carbonat) | Kotransporter | NBCe1-A: renaler proximaler Tubulus, Auge; NBCe1-B : weit verbreitet, Pankreas, Herz, Auge NBCe1-C: Gehirn |
| SLC4A5 | NBCe2 (NBC4) | Natrium, Bicarbonat (und/oder Carbonat) | Kotransporter | Leber, Hoden, Milz |
| SLC4A6 (nicht verwendet) | | | | |
| SLC4A7 | NBCn1 (NBC2, NBC3) | Natrium, Bicarbonat | Kotransporter | Weit verbreitet, Milz, Hoden, Gehirn, Herz, Lunge, Leber, Niere; nicht im Skelettmuskel |
| SLC4A8 | NDCBE (kNBC3) | Natrium, Bicarbonat und Chlorid | Kotransporter und Austauscher | Gehirn, Hoden Niere, Ovar |
| SLCA9 | (AE4) | Chlorid, Bicarbonat | Austauscher | Niere |
| SLC4A10 | (NCBE) | Natrium, Chlorid, Bicarbonat | Austauscher | Gehirn |
| SLC4A11 | BTR1 Bicarbonat-Transporter-related protein 1 | | | Niere, Speicheldrüse, Hoden, Schilddrüse, Trachea |

Quelle: (Romero *et al.*, 2004)

Die Genfamilie SLC26 (s. Tab. 4):

Unter der Annahme, dass die C- und N-terminale Domäne innerhalb der Zelle liegt, durchquert das Protein 10-14 Mal die Zellmembran. Am C-terminalen Teil besitzen alle 10

SLC26 Proteine den Sulfat-Transporter und die Anti-Sigma-Domäne (STAS). Diese Domäne umfasst eine variable Schleife mit 0-150 Aminosäuren nach einer β -Faltblattstruktur und anschließend, nach einer zwischengeschalteten α -Helix, eine Schleife mit konservierter Sequenz (Mount und Romero, 2004).

Tab. 4 Die SLC26-Genfamilie

| Genname | Synonyme | Transport-Typ/Substrat | Gewebeverteilung |
|----------|--|--|---|
| SLC26A1 | Sat-1 | Sulfat-Anionen Austausch | Leber, Niere, Gehirn, Herz, Skelettmuskulatur |
| SLC26A2 | DTDST (diastrophic dysplasia sulfate transporter) | Sulfat-Anionen-Austauscher | Weit verbreitet, Darm, Knorpel |
| SLC26A3 | DRA, CLD (down regulated in adenoma; congenitale Chlorid-Diarrhoe) | Chlorid-Bicarbonat-Austauscher | Dick- und Dünndarm |
| SLC26A4 | Pendrin (Pendred Syndrom) | Chlorid-Basen-Austauscher (Iodid, Formiat) | Niere, Schilddrüse, Milchdrüse, Endometrium, Plazenta, Innenohr |
| SLC26A5 | Prestin | Chlorid, Bicarbonat | Ohr, Gehirn, Herz, Milz, Hoden, Schilddrüse |
| SLC26A6 | PAT-1, CFEX | Chlorid-Oxalat, Sulfat-Oxalat, Sulfat-Chlorid, Chlorid-Formiat, Chlorid-Bicarbonat, Chlorid-Hydroxid-Austauscher | Weit verbreitet, Niere, Pankreas, Darm, Herz, Muskel, Plazenta, apikal in Epithelzellen |
| SLC26A7 | | Sulfat, Chlorid, Oxalat | Niere |
| SLC26A8 | Tat1 | Sulfat, Chlorid, Oxalat | Spermien, Gehirn |
| SLC26A9 | | Sulfat, Chlorid, Oxalat | Lunge |
| SLC26A10 | | | |
| SLC26A11 | | Sulfat | Weit verbreitet |

Quelle: (Mount und Romero, 2004)

Natrium-Bicarbonat-Cotransporter (NBC)

Die 4 Natrium-Bicarbonat Cotransporter NBC1 (NBCe1, SLC4A4), NBC2 (NBCn1, SLC4A7), NBC3 (kNBC3, SLC4A8), NBC4 (NBCe2, SLC4A5), und 2 NBC-related proteins AE4 und NCBE vermitteln außer AE4 den Cotransport von 1 Natriummolekül und 3 Bicarbonat-Molekülen (Soleimani, 2002). Die NBC werden durch Zugabe von DIDS und Carboanhydrase-Inhibitoren (Azetazolamid) und cAMP/Proteinkinase A (PKA) gehemmt und durch Proteinkinase C stimuliert. Für die Inhibition durch cAMP/PKA wird NHERF benötigt (Soleimani, 2002). Wahrscheinlich ist cAMP in der Lage, die Stöchiometrie des Transporters zu ändern, so dass nur noch 2 Moleküle Bicarbonat mit einem Molekül Natrium transportiert werden.

Für NBC1 wird vermutet, dass wie bei AE1 eine direkte Bindung zwischen dem C-terminalen Ende des Transporters und CA2 besteht (Soleimani, 2002). NBC2 ist resistent gegen eine Inhibition durch DIDS, kann aber durch Amilorid und seine Analoga gehemmt werden. Bei

Induktion einer subletalen Azidose in mIMCD-Zellen wurde eine Downregulation von NBC1 um 90% festgestellt, während NBC3 um das mehr als siebenfache „up“-reguliert wurde (Amlal *et al.*, 1999).

Im Pansen wurde 2003 von HUHN *et al.* eine NBC-Isoform gefunden, die 62% Homologie mit dem humanen renalen NBC, 66% mit dem der Ratten-Niere und 65% mit dem duodenalen Mäuse-NBC teilt (Huhn *et al.*, 2003).

Anionen-Austauscher (AE)

AE1 codiert das längere erythroide AE1 (eAE1) und das kürzere renale, basolateral liegende AE1 (kAE1, k für kidney) (Alper *et al.*, 2002; Alper 2006).

AE1 und AE2 sind Dimere (Alper 2006).

Intra- und extrazelluläre Protonen hemmen den AE2-vermittelten Chlorid-Austausch durch voneinander unabhängige Mechanismen (Alper 2006). Dagegen erfolgt eine Aktivierung von AE2 durch Hypertonizität und Ammonium (Alper *et al.*, 2001; Alper 2006).

AE1 in der Niere wird bei akuter, chronisch metabolischer (Fejes-Toth *et al.*, 1994) und respiratorischer Azidose „up“-reguliert und bei akuter Alkalose (Alper *et al.*, 2002; Sabolic *et al.*, 1997) „down“-reguliert. Im Colon sorgt Natrium-Mangel für eine „Down“- (Rajendran und Binder, 2000) und Aldosteron für eine „Up“-Regulation (Alper *et al.*, 2002).

Niedrige mRNA-Level für AE2 treten bei Thyroxin-Gabe und im Sammelrohr von Kaninchen bei metabolischer Azidose auf, eine metabolische Alkalose bewirkte das Gegenteil (durchschnittliche Steigerung 3,7-fach) (Alper *et al.*, 2002; Fejes-Toth *et al.*, 1998). Bei AE2 und AE3 wurde außerdem eine „Down“-Regulation im Laufe der Entwicklung beobachtet (AE2, Dünndarm, bei Entwöhnung von der Muttermilch, AE3, Herz, postnatal) (Alper *et al.*, 2002).

1.5.2.4 Vakuoläre Protonen-ATPase (vHATPase)

Die vakuoläre Protonen-ATPase kann Protonen mittels Energie aus der hydrolytischen Spaltung von ATP auch gegen einen starken entgegengesetzten Gradienten durch die Membran transportieren. In Lysosomen zum Beispiel wird ein niedriger pH-Wert benötigt, um die Enzyme zur Hydrolyse zu aktivieren (Nakhoul und Hamm, 2002).

Die Ionenpumpe besteht aus einem Komplex verschiedener Untereinheiten und besitzt 2 funktionell unterschiedliche Domänen:

- die extrazelluläre, katalysierende Domäne V1, an der ATP hydrolysiert wird
- die transmembranäre Protonen-Translokations-Domäne V0, die den eigentlichen Protonentransfer vornimmt (Bernasconi *et al.*, 1990; Graham *et al.*, 2000)

Die V1-Domäne gliedert sich in 8 Subunits (Polypeptide):

- Subunit A = Gen: VMA1, (für vacuolar membrane ATPase) 69 kDa, ATP-bindende katalytische Subunit
- Subunit B = Gen: VMA2, 60 kDa, ATP-bindende katalytische Subunit, Regulation der Aktivität der vHATPase
- Subunit C = Gen: VMA5, 42 kDa
- Subunit D = Gen: VMA 8, 32 kDa, interagiert mit VM A7
- Subunit E = Gen: VMA4, 27 kDa, interagiert mit VM A10
- Subunit F = Gen: VMA7, 14 kDa, interagiert mit VM A8
- Subunit G = Gen: VMA10, 16 kDa, stabilisiert VM A4
- Subunit H = Gen: VMA13, 54 kDa, aktiviert die vHATPase
- (Graham *et al.*, 2000).

Die V0-Domäne gliedert sich in folgende Untereinheiten:

- Subunit a = Gen: VPH 1, 100 kDa, vakuolenspezifisch
- Subunit b = Gen: VMA 3, 16,5 kDa, „proton – translocating proteopeptid“
- Subunit c = Gen: VMA 3
- Subunit c` = Gen: VMA 11, 17 kDa, Proteolipid, VMA 3 – ähnlich
- Subunit c`` = Gen: VMA 16, 23 kDa, Proteolipid, VMA 3 – ähnlich
- Subunit d = Gen: VMA 6, 36 kDa, hydrophil

Ferner konnten die Isoform STV 1 (100 kDa) und die assembly factors: VMA 12 (25 kDa), VMA 21 (8,5 kDa), VMA 22 (21 kDa) identifiziert werden. Die assembly factors sind für den Zusammenschluss der Untereinheiten von Bedeutung (Graham *et al.*, 2000).

Innerhalb der Untereinheit B lassen sich 2 Isoformen differenzieren: I = Nieren-Isoform (vor allem in der Niere lokalisiert) und II = Gehirn-Isoform (in verschiedenen Geweben lokalisiert). In einigen Fällen wird die Nierenform auch als B1-Typ und die Gehirnform als B2-Typ bezeichnet (Bernasconi *et al.*, 1990).

Im Rahmen verschiedener zellulärer Funktionen wurde eine Beteiligung der vakuolären Protonen-ATPase unter anderem an Vorgängen der Endozytose und des Proteinabbaus, an rezeptorvermittelten sowie intrazellulären Transportprozessen, an der Regulation des intrazellulären pH-Wertes sowie der Aufrechterhaltung des transmembranären elektrischen Gradienten, der die Antriebsquelle verschiedener Transportprozesse über die Membran gewährleistet, festgestellt (Stevens und Forgac, 1997).

Es wird eine Stöchiometrie von 2:1 vermutet (2 Protonen für ein ATP) (Finbow und Harrison, 1997; Nakhoul und Hamm, 2002).

Die Regulation der vHATPase wird durch verschiedene Mechanismen bewerkstelligt:

1. Transkriptionelle Regulation: Während der Differenzierung von nativen Monozyten und der Zelllinie THP-1 wurde von LEE et al. (1995) eine Steigerung der mRNA-Level der A- und B2-Untereinheit beobachtet. In höher entwickelten Pflanzen wurde bei Stress durch erhöhtes Salz-Vorkommen eine „Up“-Regulation vor allem der vHATPase Untereinheit C erfasst (Finbow und Harrison, 1997).

2. Posttranskriptionelle Regulation: Es wurde vermutet, dass die Stabilität der mRNA einen weiteren Mechanismus darstellt (Merzendorfer *et al.*, 1997), und in der Tat wurden verschiedene Polyadenylierungssignale für mRNAs, die vHATPase-Untereinheiten kodieren, festgestellt (Puopolo *et al.*, 1992), die für einen rascheren Abbau der mRNA nötig sind. Die mRNAs könnten auch durch Expression von antisense mRNA, also komplementärer mRNA, für die Translation unbrauchbar gemacht werden. Dabei hybridisieren die beiden komplementären Nucleinsäuren und werden durch eine dsRNase (RNase für doppelsträngige RNA) degradiert (Merzendorfer *et al.*, 1997).

3. Regulation auf funktioneller Ebene: Die vHATPase funktioniert nur, wenn sich die Untereinheiten zu einem Komplex zusammengeschlossen haben (Assembly). Ein Auseinanderdriften (Disassembly) wurde *in vitro* schon beobachtet und könnte einen weiteren Regulationsmechanismus anzeigen (Merzendorfer *et al.*, 1997).

Zusätzlich wurden mehrere Proteine entdeckt, die eine aktivierende oder hemmende Wirkung auf die vHATPase haben (Nelson, 1992; Zhang *et al.*, 1992). Eine Aktivierung durch Proteinkinase C und Agonisten wurde ebenfalls beobachtet (Nanda *et al.*, 1992).

1.5.2.5 Karboanhydrase (CA)

Karboanhydrasen sind in Zink-Metalloenzyme und katalysieren die folgende Reaktion:



Der zugrunde liegende Isomechanismus erfolgt in zwei Schritten am aktiven Zentrum der Karboanhydrase. Das dort lokalisierte Zink-Atom ist tetraedrisch von den Imidazol-Gruppen von drei Histidin-Molekülen und von einem Hydroxid-Ion umgeben. Vereinfacht dargestellt lagert sich an diesem negativ geladenen Hydroxid-Ion im ersten Schritt der Kohlenstoff des CO_2 an und das dort entstehende HCO_3^- wird durch ein neues Wasser-Molekül ausgetauscht und somit freigesetzt. Im zweiten Schritt wird das Proton vom Wasser-Molekül abgespalten, so dass die Ursprungsform erreicht wird.

1. Schritt: $\text{Zn}^{2+}\text{-OH}^- + \text{CO}_2 \leftrightarrow \text{Zn}^{2+} + \text{HCO}_3^-$

2. Schritt: $\text{Zn}^{2+} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{Zn}^{2+}\text{-OH}^-$

Die bisher bekannten Karboanhydrasen werden in 3 Klassen eingeteilt:

Die Alpha-Klasse kommt in Säugetieren vor (Tripp *et al.*, 2001) und besteht aus 11 enzymatisch aktiven Isozymen und 3 inaktiven homologen Proteinen (Lehtonen *et al.*, 2004), die als Monomere vorliegen (s. Tab. 5).

In der Beta-Klasse kommen Dimere, Tetramere, Hexamere und Oktamere bei Pflanzen und Algen vor (Tripp *et al.*, 2001).

Die Gamma-Klasse besteht aus Trimeren (Tripp *et al.*, 2001), der einzige bekannte Vertreter ist "Cam" von dem Archeon *Methanosarcina thermophila*.

Eventuell existiert auch eine Delta-Klasse (Tripp *et al.*, 2001). 1997 wurde eine monomere Carboanhydrase TWCA1 im marinen Diatom (*Thalassiosira weissflogii*) gefunden.

Tab. 5 Übersicht über die Isozyme der Alpha-Klasse

| Isozym | Lokalisation | Größe | Vorkommen in Mensch, Ratte und Maus | Aktivität |
|---------------|---|--------------|--|--|
| CA1 | Cytosol | 30 kDa | Oesophagus, Jejunum, Ileum, Colon, Cornealepithel, Linse, Ziliarkörperepithel, Schweißdrüsen, Fettgewebe, Myoepitheliale Zellen, Neutrophile, Erythrozyten, Zona glomerulosa-Zellen der Nebenniere | $2 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$, 15 % von CA2 |
| CA2 | Cytosol | 30 kDa | Osteoklasten, Oligodendrozyten, Epithel des Choroid-Plexus, des Ziliarkörpers, der Linse, der Müller-Zellen der Retina, Leber, Niere, Azinäre Zellen der Speicheldrüsen, Pankreas, GIT, Endometrium, Endothelium, Epithel der Samenvesikel und Ductus deferens, Spermatozoen, Erythrozyten, Thrombozyten, Neutrophile, Lunge (Typ 2-Zellen), Endotheliale und epitheliale Zellen von in Dünn- und Dickdarm, Zona glomerulosa-Zellen der Nebenniere | $1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ |
| CA3 | Cytosol | 30 kDa | Skelettmuskulatur (v.a. Faser-Typ I), Fettzellen, Speicheldrüse, Glatte Muskelzellen im Uterus, Prostata, Lunge, Niere, Colon, Hoden, Leber, Oesophagus | 1×10^4 , 1% von CA2 |
| CA4 | Membran-assoziiert über Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker an der Aussenseite der Zelle | 39-52 kDa | apikale Oberfläche von Epithelzellen bestimmter Segmente des Nephrons in der Niere (Ratte: Proximaler Tubulus, aufsteigende Henle-Schleife), apikale Plasmamembran im GIT, Endothel bestimmter Kapillarbetten, z.B. in der Lunge und im Gehirn, Auge, Skelett- und Herzmuskulatur, Colon | $1,1 \times 10^6$ |
| CA5 | Mitochondrial | 30 kDa | Leber, Herz, Lunge, Niere, Milz, Darm, Pankreas | pH-abhängig, steigt mit alkalischem pH-Wert 7×10^4 |

| Isozym | Lokalisation | Größe | Vorkommen in Mensch, Ratte und Maus | Aktivität |
|------------|---|-----------|---|--|
| CA6 | In Sekreten | 42 kDa | Speicheldrüse, in den serösen azinären Zellen der Submandibular- und Parotis-Drüse | Hohe Aktivität beim Tier (wie CA2), niedrige Aktivität beim Menschen |
| CA7 | Keine Funktion | | | |
| CA(-RP) 8 | CA-related protein | | Purkinje-Zellen | |
| CA9 | membran-assoziiert durch transmembranen Teil, C-terminales-Ende im Cytoplasma | 54/58 kDa | Magen, Darm | $3,8 \times 10^5$ |
| CA(-RP) 10 | CA-related protein | | Gehirn Protein-Tyrosin-Phosphatase | |
| CA(-RP) 11 | CA-related protein | | Gehirn Protein-Tyrosin-Phosphatase | |
| CA12 | membran-assoziiert durch transmembranen Teil, C-terminales-Ende im CYtoplasma | 44 kDa | Niere, Colon, Oesophagus, Gehirn | |
| CA13 | Cytosol | 30 kDa | Thymus, Dünndarm, Prostata, Ovar, Colon, Milz, Lunge, Niere, Herz, Gehirn, Skelettmuskulatur, Hoden | $8,3 \times 10^4$ |
| CA14 | membran-assoziiert durch transmembranen Teil, C-terminales-Ende im Cytoplasma | 37,5 kDa | Speicheldrüse, eventuell Niere | |

Quellen: (Breton, 2001; Brown *et al.*, 1990; Fleming *et al.*, 1995; Ivanov *et al.*, 2001; Kivela *et al.*, 2005; Lehtonen *et al.*, 2004; Nagao *et al.*, 1994; Schwartz, 2002; Sly und Hu, 1995)

Aufgaben der Karboanhydrase (Sly und Hu, 1995):

1. Säure-Base-Homöostase

- H⁺-Sekretion
 - Parietal-Zellen des Magens
 - renale Tubuluszellen (Ansäuerung des Urins)
 - Osteoklasten (Ansäuerung des knochen-resorbierenden Kompartiments)
- HCO₃⁻-Sekretion
 - Pankreas (Alkalisierung des Pankreassaftes)
 - Ziliarkörper-Epithel (Alkalisierung des Kammerwassers)
 - Choroid-Plexus (Alkalisierung der Cerebrospinalflüssigkeit)
 - Speicheldrüsen-Zellen (Alkalisierung des Speichels)

- H^+ und HCO_3^- -Sekretion
 - Distales Colonepithel (Kopplung von H^+ und HCO_3^- -Sekretion mit Natrium- und Chlorid-Reabsorption)
- 2. Förderung des CO_2 -Austausches in Niere, Erythrozyten und Lunge
- 3. Vermutlich Unterstützung der Fettsäure- und Aminosäure-Synthese

Nachdem Aafjes (1967) das Vorkommen der Karboanhydrase in der Schleimhaut der Vormägen von Kühen nachgewiesen hatte, wurden 1989 von ASARI et al. (1989) im Pansenepithel die Isozyme CA1, CA2 und CA3 mit Ausnahme des Stratum corneum in allen Schichten gefunden.

CA1-3 wurden unter verschiedenen experimentellen Bedingungen auf eine Regulation untersucht.

Bei CA3 wird eine metabolische Regulation in Fettzellen von Ratten vermutet. In 3T3-Fettzelllinien sanken die Konzentrationen von CA3 bei Insulingabe und von CA2 und CA3 bei Kultivierung unter einem niedrigeren pH-Wert um 50-90% (Lynch et al., 1993).

CA3 im Skelettmuskel scheint die Zellen bei Überexpression in 3T3-Zellen vor der Bildung von freien Radikalen und vor einer erhöhten Apoptose-Rate zu bewahren. Dagegen zeigte CA2 bei Überexpression in den gleichen Zellen keine Schutzfunktion gegen Wasserstoffperoxid (Raisanen et al., 1999).

Bei experimenteller Colitis wurde festgestellt, dass die CA1-Level des proximalen Colon in der regenerativen Phase „up“-reguliert wurden, während sie in den ersten Tagen der Krankheit sanken (Renes et al., 2002).

Eine Forschergruppe um GEORGE W. SCHWARTZ untersucht die Expression der Isozyme CA2 und CA4 bei experimentell induzierter chronischer metabolischer Azidose (CMA) an der Niere von Ratten mit Hilfe von Northern und Southern blotting. Am renalen Cortex fanden sie eine deutliche Steigerung der mRNA-Menge von CA2 (Schwartz et al., 1993; Tsuruoka et al., 1998). Auch die CA4-mRNA-Level erfahren bei CMA eine deutliche „Up“-Regulation im Cortex und im Mark der Niere (Tsuruoka et al., 1998; Winkler et al., 1997).

Die Expression von CA2 wurde auch im Zellmodell untersucht: In IMCD-Zellen (inner medullary collecting duct Zellen) der Niere wurde bei einem Vergleich zwischen Inkubation bei pH 7 und bei pH 7,7 eine deutliche Steigerung sowohl der mRNA-Level (80%) von CA2 als auch des Proteins (Verdopplung) festgestellt (Schwartz et al., 1994). Außerdem wurden die CA2 mRNA-Level in Osteoklasten unter saurem pH-Wert (pH 6,75 und 6,5) 2,18 bis 2,63-fach erhöht (Biskobing und Fan, 2000).

1.5.2.6 Acetyl-CoA Synthetase (ACS)

Um die kurzkettige Fettsäure Acetat für die Zelle nutzbar zu machen, muss sie zunächst aktiviert werden. Dies geschieht durch eine Kopplung mit Koenzym A (CoA). Das

entstehende Acetyl-CoA kann entweder für die Fettsäure-Biosynthese oder für die Energiegewinnung im Zitratzyklus verwendet werden.

In Eukaryoten gibt es eine Acetyl-CoA Synthetase mit zwei Schritten (AMP-forming, ACS). Die Reaktion läuft über ein Acyl-AMP Zwischenprodukt.

Das Enzym bindet zuerst ATP, dann Acetat. Im ersten Schritt wird der Acyl-Rest unter Spaltung von ATP mit AMP gekoppelt, dabei wird Pyrophosphat frei. Im zweiten Schritt wird AMP durch CoA ersetzt. Wenn CoA an das Enzym bindet, dann wird AMP freigesetzt (Starai und Escalante-Semerena, 2004).

Das Enzym besitzt bei einer Größe von 70 kDa eine große N-terminale Domäne (<500 AS) und eine kleine C-terminale Domäne (ungefähr 110 AS). Das aktive Zentrum befindet sich zwischen den Domänen. Je nachdem, was am aktiven Zentrum gebunden ist, verändert sich die C-terminale Domäne (Starai und Escalante-Semerena, 2004). STAMOUDIS & COOK konnten (1975) feststellen, dass die Acetyl-CoA Synthetase, die sie aus dem Gewebe von Kühen isolierten, ein Glycoprotein ist. Sie fanden Fucose, Glucose und N-Acetylneuraminsäure.

Eukaryoten haben zwei Isozyme der ACS, eine im Cytosol, für die Fettsäure-Biosynthese und andere anabole Prozesse und eine in den Mitochondrien, für die Energiegewinnung (ACS1 und ACS2, s. Tab. 6) (Starai und Escalante-Semerena, 2004).

Tab. 6 Übersicht über die Isozyme ACS1 und ACS2

| Isozym | Lokalisation | Vorkommen in der Maus | Quellen |
|--------|----------------------|---|-------------------------|
| ACS1 | Cytosol | Hohe mRNA-Level in Niere, Ovar, Hoden Niedrige Level in Leber, Gehirn, Herz Sehr gering in Lunge, Skelettmuskulatur | Loikkanen et al. (2002) |
| ACS2 | Mitochondrien-Matrix | Am höchsten in Herz, Skelettmuskulatur und Niere, weniger in Gehirn, Milz, Hoden, kommt nicht in der Leber vor | Fujino et al. (2001) |

Beim Rind beobachteten QURAISHI & COOK (1972) eine hohe Aktivität der ACS in Leber, Milchdrüse, Niere und Gehirn. Weniger Aktivität wurde in Herz, Lunge und Skelettmuskulatur gemessen. Eine Untersuchung der subzellulären Lokalisation ergab in Herz, Niere, Milchdrüse, Leber und Lunge folgende Verteilung: In Herz und Milchdrüse sind zwei Drittel des Enzyms im Zytoplasma und ein Drittel in Mitochondrien. In der Niere sind 50% im Zytoplasma und 50% in den Mitochondrien. In Lunge und Leber befindet sich der größte Teil in den Mitochondrien. Zwischen den beiden Isozymen wurde nicht unterschieden.

COOK et al. (1969) untersuchten die Substratspezifität der ACS in verschiedenen Geweben. In Herz, Milchdrüse, Niere und Hoden war das Enzym genauso aktiv für Propionat wie für Acetat. In der Leber war die Affinität für Butyrat und Propionat gleich, aber für Acetat am

niedrigsten. Im Pansenepithel nahm das Enzym Butyrat, Propionat und Acetat an, mit einer Affinität für Butyrat > Propionat > Acetat.

SCAIFE & TICHIVANGANA (1980) fanden im Pansen 2 short-chain Acyl-CoA Synthetasen. Eine ist in der Lage, Acetat, Propionat und Butyrat zu aktivieren, die andere akzeptiert nur Butyrat als Substrat. Die subzelluläre Lokalisation dieser beiden Acyl-CoA Synthetasen ist nicht bekannt.

1991 untersuchten HARMON et al. (1991) den Einfluss der Fütterung auf die Acyl-CoA Synthetase Aktivität im Pansenepithel von Kälbern. Sie fanden eine erhöhte Aktivität der Butyryl-CoA-Synthetase bei 90% Getreide-Fütterung im Vergleich zu 90% Heu-Fütterung für 140 Tage.

In der Leber des Rindes befindet sich nur eine geringe Menge an ACS, dagegen sind größere Mengen an Propionyl-, Butyryl- und Valeryl-CoA Synthetasen vertreten (Ricks und Cook, 1981).

Bei Ratte und Maus wurde die Regulation der beiden Isozyme der ACS in der Leber und in der Skelett- und Herzmuskulatur untersucht. Bei der Ratte steigt die Aktivität des Isozym 1 in der Leber, wenn mehr Acetat infolge von bakteriellem Metabolismus während der Verdauung anflutet (Starai und Escalante-Semerena, 2004). Außerdem erhöht sich dort die Aktivität bei kohlenhydratreicher Diät, die eine Synthese von Fettsäuren begünstigt (Barth *et al.*, 1972). Die Expression von ACS1 wird induziert, wenn der Sterol-Spiegel in den Zellen abfällt. Der Effekt der Sterole auf die Expression wird durch SRBEPs (sterol regulatory element-binding proteins) vermittelt (Ikeda *et al.*, 2001; Luong *et al.*, 2000)).

In der Skelett- und Herzmuskulatur von Mäusen wurden die mRNA-Level von ACS2 unter ketogenen Bedingungen (Fasten) deutlich gesteigert (6,5-fach/2-fach). Gleichzeitig gingen die mRNA-Level von ACS1 in der Skelettmuskulatur um 50% zurück (Fujino *et al.*, 2001).

Für die ACS ist auch ein posttranslationales Regulationssystem mit dem Namen Sir2 (sirtuin)-dependent protein acetylation/deacetylation system (SDPADS) in Eukaryoten bekannt (Smith *et al.*, 2000). Dieses System soll die Aktivität der ACS über eine Acetylierung oder Deacetylierung am Lysin-Rest Nr. 609 steuern. Dabei wird spekuliert, dass der NAD⁺-Level der Zelle eine Rolle spielt, da NAD⁺ für die Deacetylierung und damit für die Aktivierung des Enzyms benötigt wird (Sauve *et al.*, 2001; Starai *et al.*, 2002). Ein niedriges NAD⁺-Level signalisiert der Zelle ein niedriges Energieniveau und führt zu einer Abnahme der Aktivität der ACS (Starai und Escalante-Semerena, 2004).

1.5.2.7 Monocarboxylat-Transporter (MCT)

Die bisher entdeckten 14 Isoformen des MCT gehören zur SLC16-Genfamilie (Halestrap und Meredith, 2004) (s. Tab. 7).

Die MCT sind meist aus 12 transmembranären α -helikalen Domänen (TM) aufgebaut (Halestrap und Price, 1999). Zwischen TM 6 und 7 befindet sich eine große Schleife (Loop)

mit einer wenig konservierten Sequenz, die Größe der Schleife variiert zwischen 29 Aminosäuren in MCT 4 und 105 Aminosäuren in MCT5. Die Schleife und das N- und C-terminale Ende ragen ins Zytoplasma.

Es kommen verschiedenen Formen des Transportmechanismus vor. Am weitesten verbreitet ist der Protonen-Monocarboxylat-Symport. In der Niere kommt jedoch auch ein Natrium-Monocarboxylat-Symport (Poole und Halestrap, 1993) und im Colon ein Anionen-Austausch-Mechanismus vor (Ritzhaupt *et al.*, 1998b).

Tab. 7 Übersicht über die SLC16-Familie (MCT)

| Gen Name (Human) | Protein Name | Vorherige Namen | Größe | Bevorzugtes Substrat | Austausch-(A)/Symport-(S)Ionen | Gewebe-Verteilung in Maus/Mensch |
|------------------|--------------|-----------------|-----------|--|--|---|
| SLC16A1 | MCT1 | | 39-45 kDa | Lactat, Pyruvat, Ketonkörper, Kurzkettige Fettsäuren | S mit Protonen, A mit Monocarboxylaten | Ubiquitär |
| SLC16A2 | MCT8 | XPCT, MCT7 | 60-67 kDa | T3, T4 (unveröffentlicht) | Erleichterter Transport | Leber, Herz, Gehirn, Thymus, Darm, Ovar, Prostata, Pankreas, Plazenta |
| SLC16A3 | MCT4 | MCT3 | 53 kDa | Lactat, Pyruvat, Ketonkörper | S mit Protonen | Skelettmuskulatur, Chondrozyten, Leukozyten, Hoden, Lunge, Plazenta, Herz |
| SLC16A4 | MCT5 | MCT4 | 53 kDa | | | Gehirn, Muskel, Leber, Niere, Lunge, Ovar, Plazenta, Herz |
| SLC16A5 | MCT6 | MCT5 | | | | Niere, Muskel, Gehirn, Herz, Pankreas, Prostata, Lunge, Plazenta |
| SLC16A6 | MCT7 | MCT6 | | | | Gehirn, Pankreas, Muskel |
| SLC16A7 | MCT2 | | 40-53 kDa | Lactat, Pyruvat, Ketonkörper | S mit Protonen | Niere, Gehirn, Leber, Spermien, Skelettmuskulatur, Herz |
| SLC16A8 | MCT3 | REMP | | Lactat | S mit Protonen (pH-abhängig) | Basolateral in Retina-Pigment Epithel, Choroid-Plexus |

| Gen Name (Human) | Protein Name | Vorherige Namen | Größe | Bevorzugtes Substrat | Austausch-(A) /Symport-(S)lonen | Gewebe-Verteilung in Maus/Mensch |
|------------------|--------------|-----------------|-------|--|---------------------------------|--|
| SLC16A9 | MCT9 | YKW1/ oxIT-2 | | | | Endometrium, Hoden, Ovar, Gehirn, Niere, Nebenniere, Retina, Milchdrüse |
| SLC16A10 | TAT1 | | | Aromatic amino acids (W, Y, F, L-DOPA) | Erleichterter Transport | Niere, Darm (basolateral), Muskel, Plazenta, Herz |
| SLC16A11 | MCT11 | | | | | Haut, Lunge, Ovar, Lunge, pancreas, Retina-Pigment Epithel, Choroid-Plexus, Milchdrüse |
| SLC16A12 | MCT12 | | | | | Niere |
| SLC16A13 | MCT13 | | | | | Milchdrüse, Stammzellen des Knochenmark |
| SLC16A14 | MCT14 | | | | | Gehirn, Herz, Ovar, Lunge, Pankreas, Retinal-Pigment Epithel, Choroid-Plexus, Milchdrüse |

Quelle: (Halestrap und Meredith, 2004)

Im Gastro-Intestinal-Trakt des Menschen liegt MCT1 auf der apikalen Membran und nimmt auf der Länge des Darmes zu, MCT4 und 5 liegen basolateral und kommen vor allem im Colon vor (Gill *et al.*, 1986).

Beim Rentier wurden im Pansen die Isoformen MCT1 und MCT4 nachgewiesen (Koho *et al.*, 2005). Bei Kälbern wurde mRNA von MCT1 in den Vormägen, im Cäcum und im proximalen und distalen Colon gefunden (Kirat *et al.*, 2005). Bei Ziegen wurde MCT1 in allen Bereichen des Gastrointestinaltraktes mittels Western Blot Analyse quantifiziert (Kirat *et al.*, 2006). Dabei ergab sich eine Reihenfolge von Pansen > Netzmagen > Blättermagen > Blinddarm > proximales Colon > distales Colon > Labmagen > Dünndarm. MÜLLER *et al.* (2002) untersuchten das Pansenepithel des Schafes mit Hilfe von spezifischen Antikörpern für MCT1 und konnten feststellen, dass sowohl die kultivierten Pansenepithelzellen als auch die Zellen des Stratum basale der Pansenschleimhaut eine positive Reaktion zeigten. Sie kamen zu dem Schluss, dass die Aufgabe für MCT1 darin liegt, im Pansenepithel den Abtransport

von Lactat und Ketonkörpern zusammen mit Protonen zu realisieren. KIRAT et al. (2006) konnten in funktionellen Studien am Pansenepithel von Ziegen nachweisen, dass MCT1 auch für den Transport von SCFA (Acetat und Propionat) verantwortlich ist.

Die Affinität der Transporter zu ihrem Substrat sinkt in der Reihenfolge MCT2 > MCT1 > MCT4 (Broer *et al.*, 1997; Dimmer *et al.*, 2000).

Eine transkriptionelle Regulation von MCT1 wurde in GIT, Gehirn und Muskulatur unter verschiedenen experimentellen Voraussetzungen beobachtet:

Bei kultivierten humanen Colon-Epithelzellen (AA/C1) erzeugte die Inkubation in Butyrat-haltigen Medien (2 mM) für 48 Stunden eine „Up“-Regulation (5,2-fache mRNA-Menge) von MCT1, während Propionat und Acetat keine Wirkung besaßen (Cuff *et al.*, 2002). Außerdem erfolgte eine 5-fache Steigerung der Geschwindigkeit der Butyrat-Aufnahme (Cuff *et al.*, 2002).

Die mRNA-Menge von freilebenden Rentieren wurde mit der von in Gefangenschaft gehaltenen Rentieren verglichen. Die Menge an MCT1 im Pansenepithel war bei freilebenden Rentieren größer (Koho *et al.*, 2005). KOHO et al. (2005) erklären die Befunde mit der Aufnahme von Flechten bei freilebenden Rentieren, die eine große Menge an leicht zu fermentierenden Kohlenhydraten im Pansen freisetzen.

Die Expression von MCT1 und CD147 (s.u.) im Pansenepithel von Rentier-Kälbern war altersabhängig zwischen dem 2. und 10. Lebenstag (Koho *et al.*, 2005).

Intensives Training steigert die maximale Rate des Lactat-Transportes in Sarcolemma-Vesikel um 30-100% (McDermott und Bonen, 1993). Dies wurde von einer Zunahme der MCT1 Expression begleitet, während MCT4 nicht „up“-reguliert wurde (Baker *et al.*, 1998). Bei denervierter Muskulatur ist dagegen eine deutliche „Down“-Regulation zu beobachten (Wilson *et al.*, 1998).

Bei Ratten führte eine ketogene Fütterung für bis zu 6 Wochen zu einer „Up“-Regulation (bis zu 8-fach) von MCT1 im Gehirn (Leino *et al.*, 2001).

Allerdings wird auch eine translationale Regulation vermutet. Dabei kommen im Muskel eine erhöhte Lactat-Konzentration oder Hypoxie als Signale in Frage, diese könnten durch den hypoxia-inducible factor 1, cAMP oder den Erythropoietin-Hypoxie-Enhancer vermittelt werden (Halestrap und Price, 1999).

Für die Isoformen 1, 2 und 5 sind Eigenschaften bekannt, die für eine translationale Regulation bedeutsam sein könnten:

MCT1 besitzt eine lange 3'-UTR (untranslated region) mit 1,6 Kilobasen, die sich als Schleife zurückbiegen und Interaktion mit der UTR eingehen könnte. Das Binden eines Regulations-Faktors/Binding-Proteins, der/das die Translation verhindert, ist ebenfalls möglich (Miyamoto *et al.*, 1996).

Bei MCT2 wird ein alternatives Splicen in den 5'-oder 3'-UTR vermutet, verschiedene Promoter könnten genutzt werden (Jackson *et al.*, 1997).

Die 5'-UTR von MCT5 enthält 5 sich kurz überlappende Ableserahmen (Minicistrons), die einen inhibitorischen Effekt auf die translationale Effizienz ausüben können (Halestrap und Price, 1999).

Für MCT1 und MCT4 ist eine Regulation durch Assoziation mit dem Protein CD147 wahrscheinlich (andere verwendete Namen: OX 47, Basignin, CE9, Neuroendothelin, M6, EMMPRIN). Dieses transmembranäre Glycoprotein (Enerson und Drewes, 2003; Halestrap und Price, 1999) wurde mit MCT1 zusammen in Herzzellen nachgewiesen. Die Interaktion mit MCT1 findet über einen Argininrest in der TM 8 des MCT und einem Glutaminsäure-Rest im transmembranären Segment von CD147 statt (Enerson und Drewes, 2003). CD147 könnte Einfluss auf die katalytische Aktivität des Transporters besitzen oder die Translokation zur Membran regulieren (Halestrap und Price, 1999).

1.5.2.8 Natrium-Kalium-ATPase (NaKA)

Die Natrium-K-ATPase katalysiert den Transport von 3 Natrium-Ionen aus der Zelle heraus und 2 Kalium-Ionen in die Zelle hinein unter Spaltung von ATP zu ADP und P (Sen und Post, 1964). Sie ist ein Mitglied der Familie der P-Typ-ATPasen (Lopina, 2001). Andere Mitglieder sind z.B. die mucosale H-K-ATPase des Magens und die Ca-ATPase der Plasmamembran und des Sarcoplasmatischen Reticulums (Lopina, 2001).

Die NaKA besteht aus zwei Polypeptid-Ketten: Die katalytische α -Untereinheit und die β -Untereinheit, ein Glycoprotein, das nicht direkt an der Katalyse beteiligt ist (Lopina, 2001). Die α -Untereinheit (UE) und die β -UE besitzen eine Molekularmasse von 110 kD bzw. 55 kD. Die α -UE formt in der Doppellipidschicht der Zellmembran 10 transmembranäre α -helikale Segmente (TM), das N- und C-terminale Ende liegen im Zytoplasma (Fambrough *et al.*, 1994). Die TM der α -UE liegen eng beieinander und bilden wahrscheinlich eine Art Kanal (Lopina, 2001).

Die Polypeptide-Kette der β -UE besitzt nur eine TM (Kirley, 1989), das kurze N-terminale Ende ragt ins Zytoplasma. Dagegen ist das C-terminale Ende lang, mit drei Sulfhydryl-Gruppen und drei N-Glycosylierungs-Stellen versehen und extrazellulär lokalisiert. Die N-Glycosylierungs-Stellen sind von verzweigten Kohlenhydraten besetzt, die etwa ein Drittel der Molekularmasse der β -UE ausmachen.

Die beiden UE interagieren über die TM der β -UE mit den TM 9-10 der α -UE (Sarvazyan *et al.*, 1995).

In der Niere wurde in den 70-igern ein weiteres Peptid (7,4 kD) gefunden (Forbush *et al.*, 1978), das als γ -UE bezeichnet wird. Die γ -UE reguliert bei Assoziation an α - und β -UE die Sensitivität der NaKA für die Kationen, die transportiert werden (Arystarkhova *et al.*, 1999).

Die Dichte der NaKA-Moleküle auf der Plasmamembran variiert in den Geweben (Lopina, 2001) entsprechend ihren Aufgaben.

In allen Zellen ist die NaKA daran beteiligt, das das Ruhe-Membranpotential aufrecht zu halten und hilft dadurch, das Zellvolumen zu regulieren.

Der Natrium-Gradient, der durch ihre Arbeit geschaffen wird, wird außerdem in vielen Zellen für die Aktivität von Ionen-Transport-Systemen genutzt (z.B. Na⁺/K⁺/Cl⁻-Cotransporter, Na⁺/Ca⁺⁺- und Na⁺-H⁺-Austauscher und Na⁺-Kanäle).

4 Isoformen der α-UE (Blanco *et al.*, 1999; Schneider *et al.*, 1985; Shamraj und Lingrel, 1994; Shull *et al.*, 1986; Sverdlov *et al.*, 1987) und 3 Isoformen der β-UE (Besirli *et al.*, 1997; Gloor *et al.*, 1990; Malik *et al.*, 1996; Martin-Vasallo *et al.*, 1989) sind bisher in Wirbeltieren entdeckt worden. Diese können in verschiedenen Kombinationen in den Geweben vorkommen (s. Tab. 8). Die daraus entstehenden Isozyme besitzen verschiedene kinetische Eigenschaften.

Tab. 8 Übersicht über das Vorkommen der verschiedenen Isoform-Kombinationen bei der Ratte

| Gewebe/Zelltyp | Isozym-Kombination | Physiologische Funktion |
|--------------------------|--|---|
| Niere (Tubuluszellen) | α1β1 | Treibende Kraft für Na ⁺ -Absorption in der Niere |
| Herz (Myozyten) | α1β1, α1β2, α1β3, α2β1, α2β2, α2β3, α3β2, α3β3 | Erregbarkeit. Die α-UE ist Ziel für Digitalis-Glykoside, Regulation des Natrium-Ca-Austausches |
| Darm | α1β1 | Na ⁺ -Absorption |
| Lunge (Alveolar-Epithel) | α1β1, α2β1, α1β3, α2β3 | Vektorialer Natrium-Transport und Lungenflüssigkeit-Reabsorption (Nach der Geburt und Stimulation mit Catecholaminen) |
| Leber (Hepatozyten) | α1β1, α1β3 | Galle-Produktion. Teil des mitogenen Programms, dass die Leber-Regeneration initiiert |
| Gehirn (Neuronen) | α1β1, α1β2, α1β3, α3β1, α3β2 | Generieren des Membranpotentials und elektrochemischer Gradienten für neuronale Erregbarkeit |
| Gehirn (Gliazellen) | α1β1, α1β2, α1β3, α2β1, α2β2 | K ⁺ -Wiederaufnahme nach Depolarisation |
| Auge (Ziliarepithel) | α1β1, α1β2, α2β1, α2β2, α3β1, α3β2 | Ionen-Transport, Bildung von Liquor cerebrospinalis, Regulation von Natrium-abhängigen Transport-Systemen |
| Knorpel (Chondrozyten) | α1β1, α1β2, α1β3, α2β1, α2β2, α2β3, α3β2, α3β3 | Aufrechterhaltung eines niedrigen intrazellulären Na ⁺ -K ⁺ -Verhältnisses |
| Knochen (Osteoblasten) | α1β1, α1β2 | Erhaltung von intrazellulärem K ⁺ - und Ca ²⁺ während der Knochenbildung |

| Gewebe/Zelltyp | Isozym-Kombination | Physiologische Funktion |
|---------------------------|--|--|
| Knochen (Osteoklasten) | $\alpha 1\beta 1$ | Polarisation, die für Säure-Sekretion und Protonen-Extrusion während der Knochenresorption notwendig ist |
| Vaskuläre Endothel-Zellen | $\alpha 1\beta 1, \alpha 1\beta 2, \alpha 3\beta 1, \alpha 3\beta 2$ | Regulation des vaskulären Tonus und Vasokonstriktion |
| Skelettmuskulatur | $\alpha 1\beta 1, \alpha 1\beta 2, \alpha 1\beta 3, \alpha 2\beta 1, \alpha 2\beta 2, \alpha 2\beta 3$ | K^+ -Aufnahme |
| Glatte Muskulatur | $\alpha 1\beta 1, \alpha 2\beta 1$ | Aufrechterhaltung von intrazellulärem Na^+ |
| Hoden | $\alpha 1\beta 1, \alpha 1\beta 2, \alpha 1\beta 3, \alpha 4\beta 3$ | Regulation der luminalen K^+ -Konzentration |
| Prostata (Epithelzellen) | $\alpha 1\beta 1, \alpha 1\beta 2$ | Regulation der luminalen Na^+ - und K^+ -Konzentrationen |

Quelle: (Mobasheri *et al.*, 2000)

HANSEN (1998) fand im Pansenepithel und Niere des Rindes über spezifische Antikörper nur die $\alpha 1$ -UE, während in bovinem Gehirn und auch $\alpha 2$ und $\alpha 3$ vorkamen. Über die im Pansenepithel vorkommende β -UE ist bislang nichts bekannt.

Für die NaKA ist eine schnelle Regulation über Phosphorylierung der α -UE bekannt. 4 Formen von Proteinkinasen sind dafür zuständig: 1. Die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA), 2. die cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG), 3. die Ca-Phospholipid-abhängige Proteinkinase (PKC) und 4. die Tyrosin-Kinase. Dabei kann eine Phosphorylierung sowohl eine Zunahme als auch eine Hemmung der Aktivität bedeuten, je nachdem, welche Isozyme phosphoryliert werden (Lopina, 2001). Die Hemmung der Aktivität wird bei PKC und PKG durch eine Endocytose der phosphorylierten Moleküle hervorgerufen, während die Aktivitätssteigerung durch Einbetten von neuen NaKA-Molekülen in die Zellmembran ausgelöst wird (Bertorello *et al.*, 2003; Efendiev *et al.*, 2000).

Die β -UE vermittelt dagegen die Aktivierung der NaKA durch extrazelluläres Kalium (Jaisser *et al.*, 1992).

Weitere regulierende endogene Proteine an der α -UE sind Ankyrin, Melittin und Digitalis-ähnliche Faktoren (Lopina, 2001).

LEDERER *et al.* (2003) stellten fest, dass bei der Regulation der NaKA in der Niere durch PTH (Parathyreoid-Hormon) NHERF1 für die Phosphorylierung der NaKA benötigt wird. PTH wirkt dabei wahrscheinlich über cAMP-Freisetzung und PKA hemmend auf die NaKA.

MCDONOUGH & FARLEY (1993) vermuteten aufgrund der verschiedenen Translabilität der mRNA von α - und β -UE, dass die β -UE der NaKA im Gegensatz zur α -UE im Überschuss gebildet und der überschüssige Anteil rasch wieder degradiert wird. Diese Vermutung konnte von LESCALE-MATYS *et al.* (1993) für LLC-PK₁/Cl₄-Zellen (Schweine-Nieren-Zelllinie) bestätigt werden. Es wurde nach Stimulation der Zellen ein 3-facher Überschuss von β -UE gegenüber α -UE gemessen, von dem fast 50% innerhalb der ersten Stunde degradiert wurde.

Da die NaKA Natrium aus der Zelle heraus und Kalium in die Zelle hinein transportiert, läge es nahe, dass bei hoher intrazellulärer Natrium-Konzentration und/oder niedriger intrazellulärer Kalium-Konzentration die NaKA „up“-reguliert wird. Experimente, bei denen ein solcher Versuchsansatz gewählt wurde, hatten unterschiedliche Ergebnisse:

Unter Einfluss von Ouabain (1 mmol/l) steigerten sich in Nieren-Epithelzellen von Ratten die Natrium-Konzentration und nachfolgend auch die mRNA-Level der α 1-UE und der β 1-UE nach 3 Stunden um das 2,3- bzw. 2,4-fache des Kontrolllevels mit einem Maximum nach 12 Stunden (Muto *et al.*, 2000). BOWEN (1987) fand bei K-Verarmung von MDCK-Zellen (Madin-Darby Canine Kidney cells) ebenfalls eine „Up“-Regulation von α - und β -UE-mRNA. Bei LLC-PK₁/Cl₄-Zellen (renale Zelllinie) wurde eine stärkere „Up“-Regulation der β -UE (3,5-fach) als der α -UE (1,91-fach) beobachtet, wenn die Zellen für 24 h einem K-armen Medium ausgesetzt waren (Tang und McDonough, 1992). 2 Jahre zuvor, in der Publikation von LESCALE-MATYS *et al.* (1990), fand unter ähnlichen Versuchsbedingungen keine „Up“-Regulation der α -UE statt.

MERINO *et al.* (2000) konnten ebenfalls keine „Up“- oder „Down“-Regulation der α 1-UE NaKA-Expression in der Niere von Ratten feststellen, wenn sie den Gehalt an NaCl im Futter variierten. Dabei wurde ein Untersuchungszeitraum von 12 h bis zu 7 Tagen beleuchtet.

1.6 Regulation der Adaptation, mögliche Stimulationsfaktoren

Zwischen den Veränderungen in der Zusammensetzung der Pansenflüssigkeit (siehe 1.3) und den morphologischen und funktionellen Veränderungen des Pansenepithels (siehe 1.2.4 und 1.4.8) fehlt ein entscheidendes Bindeglied.

Die Steigerung der Genexpression wird durch Transkriptionsfaktoren bewirkt, die Hemmung oder Aktivierung von Enzymen durch intrazelluläre Botenstoffe wie zum Beispiel cAMP. Die Substanzen, die in der Zelle diese entscheidenden Prozesse in die Wege leiten, können durch Bindung eines Liganden an einen membranären Rezeptor freigesetzt/gebildet werden. Welche Substanzen kommen als Überbringer für die Veränderungen in der Futterzusammensetzung in Frage? Es gibt nicht viele Stoffe, denen in diesem Zusammenhang Bedeutung beigemessen wird. Die morphologischen Veränderungen deuten darauf hin, dass ein Wachstumshormon beteiligt sein könnte. Insulin-like growth factor 1 bietet sich als Überbringer-Stoff an, der durch seine Bindung an die Zelle eine adaptative Reaktion hervorruft.

Eine andere Alternative ist die direkte Wirkung eines Metaboliten, der bei Futteränderung per passiven oder aktiven Transport in die Zelle gelangt und dort Transportproteine oder Enzyme in ihrer Aktivität beeinflusst oder ihre vermehrte/verminderte Transkription initiiert. Dieser Metabolit könnte Natrium-Butyrat sein, denn diese Fettsäure scheint bei der Adaptation eine größere Rolle zu spielen als die anderen flüchtigen Fettsäuren.

1.6.1 Insulin-like growth factor-1 (IGF-1)

Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) ist ein aus 70 Aminosäuren bestehendes Polypeptid, das hundertprozentige Homologie bei Mensch, Schwein und Rind aufweist (Tavakkol *et al.*, 1988). Strukturell ähnelt es dem Proinsulin. Hauptursprung des zirkulierenden IGF-1 ist die Leber, aber auch andere Gewebe sind in der Lage, IGF-1 zu produzieren (Breier und Sauerwein, 1995). In anderen Geweben ist ein Modell fest etabliert, in dem IGF-1 autokrin oder parakrin zelldifferenzierend und proliferativ wirkt (Breier und Sauerwein, 1995).

Die Expression und Sekretion von IGF-1 erfolgt nach Interaktion des hypophysären Wachstumshormons (GH) an dem Wachstumshormon-Rezeptor (GHR) (Breier und Sauerwein, 1995). Die IGF-1 Konzentration ist direkt abhängig von der Dichte der GH-Rezeptoren, diese ist wiederum abhängig vom Ernährungsstatus des Tieres. Die GH-Rezeptoren sind unterschiedlich sensitiv und haben eine unterschiedliche Affinität zu GH. Aufgrund ihrer kurzen Halbwertszeit von 45 Minuten (Baxter, 1985) besitzen sie einen hohen dynamischen Status.

Im Blut ist IGF-1 an eines der 6 Insulin-like growth factor-binding-proteins (IGFBP) gebunden, wobei der Großteil an IGFBP-3 bindet, das einen ternären Komplex mit der non-IGF-binding-acid-unit (ALS) bildet (Breier und Sauerwein, 1995). IGFBP-2 ist in der Lage, aus dem Blutgefäßsystem zu migrieren und so IGF-1 direkt in die Zielorgane zu transportieren.

Beim Menschen wird IGF-1 nach Dünndarmresektionen zur Steigerung des Wachstums bzw. Adaptation der bleibenden Darmanteile eingesetzt, nachdem bei Ratten eine positive Reaktion nach Entfernung von bis zu 90% des Dünndarmes nachgewiesen werden konnte (Mantell *et al.*, 1995; Weale *et al.*, 2005; Ziegler *et al.*, 1996).

Die Ergebnisse von BALDWIN (1999) und SHEN *et al.* (2004b) unterstützen die Annahme einer Beteiligung von IGF-1 an der Adaptation des Pansenepithels in Abhängigkeit von energiereichen Diäten. Während ihrer Versuche haben SHEN *et al.* (2004b) neben gesteigertem Zottenwachstum und der Zunahme der resorptiven Oberfläche eine Steigerung des Natrium-Nettofluxes sowie einen erhöhten IGF-1-Gehalt im Plasma beobachtet. Bei einem weiteren Versuch mit kastrierten Bullen wurden die unterschiedlichen Fütterungen (energiearm und energiereich) zusätzlich mit einer kurzzeitigen (3,5 Stunden, Beginn 1 Stunde nach Fütterung) intraruminalen Infusion von Butyrat gekoppelt (Shen *et al.* 2005). Dabei trat zwar eine deutliche Abhängigkeit der Zottengröße und Proliferationsrate von der Fütterung auf, eine Erhöhung des IGF-1-Levels im Plasma bei energiereicher Fütterung blieb jedoch aus. Dagegen reagierte der IGF-1-Spiegel im Plasma auf die Butyrat-Infusion mit einer Senkung, während sich weder die mRNA-Level von IGF-1 und IGF-Typ1-Rezeptor noch die Bindungskapazität des IGF-1-Rezeptors veränderte.

1.6.2 Natrium-Butyrat

Während KAUFFOLD et al. (1977b) eine Stimulation des Zottenwachstums nach Infusion von Natrium-Butyrat beobachtete und SAKATA & TAMATE (1978) eine Stimulation der Teilung von Stammzellen der ruminalen Mucosa feststellen konnten, hemmte Natrium-Butyrat die Proliferation von kultivierten ruminalen Epithelzellen in Experimenten von BALDWIN (1999) und GALFI et al. (1993; 1991).

Die gen-regulative Wirkung von Natrium-Butyrat wurde erst später entdeckt: KIELA et al. wiesen 2001 eine Stimulation der Gen-Expression von NHE3 bei Caco-2-Zellen nach, die allerdings von der Aktivität der Proteinkinase A abhing. Eine positive Hemmung durch Actinomycin D ließ auf eine transkriptionelle Aktivierung schließen (Kiela et al., 2001).

Bei einer Colon-Zelllinie des Menschen konnte von CUFF et al. (2002) eine direkte Induktion der mRNA von MCT1 festgestellt werden. Butyrat kann als Histon-Deacetylase Inhibitor wirken und so Promotoren bestimmter Gene stimulieren (Kiela et al., 2001; Sowa und Sakai, 2000).

1.7 Zusammenfassung der Literatur im Hinblick auf die eigene Fragestellung

Untersuchung der Absorbtiionsleistung des Pansenepithels bei Heu- und Konzentrat-Fütterung

- Der Nachweis einer Steigerung des Natrium-Transportes bei energiereich gefütterten Tieren wurde *in vitro* schon geführt, die Untersuchung der Adaptation des Fettsäure-Transportes wurde aber in diesem Zusammenhang nur *in vivo* durchgeführt, so dass eine Kopplung der Untersuchung von Natrium- und Acetat-Transport sich anbietet.

Untersuchung der Veränderungen in der Pansenflüssigkeit bei Heu- und Konzentratfütterung

- Die Parameter pH-Wert, Osmolalität, NH_4^+ , Natrium- und Kalium-Gehalt, Volumen und Fettsäure-Konzentration variieren je nach Fütterung, Entnahmezeitpunkt und Entnahmeort. Für eine genaue Aussage über die Bedingungen, die im Pansensaft durch die im Versuch verwendete spezielle Fütterung entstehen, müssen die oben genannten Parameter bestimmt werden.

Untersuchung der relativen mRNA-Kopienzahl am Pansenepithel

- Für die Transportproteine AE2, MCT1, NBC, NHE1, und NHE3, die Enzyme CA und ACS2, die Ionenpumpen NaKA und vH-ATPase, und das PDZ-Protein NHERF1 sind in anderen Geweben transkriptionelle Regulationsmechanismen bekannt (s. Tab. 9).

Eine Veränderung der relativen mRNA-Kopienzahl im Pansenepithel in Abhängigkeit von der Fütterung erscheint für diese Gene möglich.

Tab. 9 Transkriptionelle Regulation laut Literatur (Up = Steigerung der mRNA-Menge, Down = Verringerung der mRNA-Menge)

| Gen | Regulation | Gewebe | Bedingung/Einfluss |
|----------------|------------|--|---------------------------------|
| NHE3 | Up | Ileum | MSBR |
| NHE3 | Up | Colon | SCFA ↑ |
| NHE2, NHE3 | Up | Colon | MSBR |
| NHE3 | Up | Caco2-Zellen | Na-Butyrat |
| NHE2, NHE3 | Up | Darm | Azidose |
| NHE2, NHE3 | Down | Darm | Interferon Gamma |
| NHE3 | Down | Caco2-Zellen | Proteinkinase C alpha |
| NHE1 | Up | Proximale Tubuluszellen | Aktivierung der Proteinkinase C |
| NHERF1 | Up | OK-Zellen | Inkubation mit Serum |
| NBC1 | Down | mIMCD-Zellen | Azidose |
| NBC3 | Up | mIMCD-Zellen | Azidose |
| AE1 | Up | Niere | Azidose |
| AE1 | Down | Niere | Alkalose |
| AE1 | Down | Colon | Na-Mangel |
| AE1 | Up | Colon | Aldosteron |
| AE2 | Down | Niere | Thyroxin |
| AE2 | Down | Niere | Azidose |
| AE2 | Up | Niere | Alkalose |
| AE2 | Down | Dünndarm | Entwöhnung von Muttermilch |
| AE3 | Down | Herz | Postnatal |
| VHATPase A, B2 | Up | Monozyten, THP1-Zellen | Differenzierung |
| VH-ATPase C | Up | Pflanzen | Salz |
| CA3 | Down | 3T3-Fettzelllinien | Insulin |
| CA2, CA3 | Down | 3T3-Fettzelllinien | Niedriger pH-Wert |
| CA1 | Down | Colon | Beginn der Colitis |
| CA1 | Up | Colon | Regenerative Phase der Colitis |
| CA2, CA4 | Up | Niere | Azidose (CMA) |
| CA2 | Up | mIMCD-Zellen | pH-Wert-Senkung um 0,7 |
| CA2 | Up | Osteoklasten | pH-Wert-Senkung um 0,25 |
| ACS1 | Up | Leber | Sterole |
| ACS2 | Up | Herz-, Skelettmuskulatur | Fasten (Ketogenese) |
| ACS1 | Down | Herz-, Skelettmuskulatur | Fasten (Ketogenese) |
| MCT1 | Up | Colon-Epithelzellen | Butyrat |
| MCT1 | Up | Pansenepithel | Leichtverdauliche Kohlenhydrate |
| MCT1 | Up | Sarcolemma-Vesikel | Muskeltraining |
| MCT1 | Up | Gehirn | Fasten (Ketogenese) |
| NaKA α1, β1 | Up | Nieren-Epithelzellen | Ouabain, Natrium ↑ |
| NaKA α, β | Up | MDCK-Zellen | K ↓ |
| NaKA β | Up | LLC-PK ₁ /Cl ₄ -Zellen | K ↓ |

Die Quellen sind in den jeweiligen Abschnitten über die einzelnen Proteine zu finden

(s. 1.5.2).