

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Allgemeines

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Adaptation des Pansenepithels ist ein Prozess, der beim Milchrind in der so genannten *transition period* (Übergang von der Trockenstehphase zur Frühaktation) eine wichtige Rolle spielt. Hier muss eine deutliche Steigerung der Energieaufnahme und damit eine Adaptation des Vormagenepithels an eine veränderte Futterzusammensetzung erfolgen. 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 vorliegenden Arbeit wurde anhand eines Fütterungsversuches und mithilfe von mehreren Untersuchungsmethoden versucht, den zeitlichen Ablauf der Adaptation und die Veränderungen des Epithels während dieses Prozesses nachzuvollziehen. Sowohl die luminalen Bedingungen im Reticulorumen, die über eine Pansenfistel exploriert wurden, als auch die Untersuchung von Epithel-Stücken mit der Ussing-Kammer-Methode, die molekulare Untersuchung der Zellen und die Blutuntersuchung charakterisieren den physiologischen Vorgang der Adaptation. Durch Gruppenbildung mit verschiedenen langen Konzentrat-Zugabe-Perioden wurde über einen Zeitraum von 6 Wochen an 7 Messpunkten der zeitliche Verlauf der Adaptation näher charakterisiert. Als Kontrolle dienten ausschließlich energiearm gefütterte Tiere. Bei Konzentrat-Zugabe wurden zu Beginn kürzere Abstände (2, 4, 7 Tage) und später längere Abstände (2, 4, 6 Wochen) als Untersuchungszeitpunkte gewählt, da in früheren Versuchen festgestellt wurde, dass das Pansenepithel schon innerhalb der ersten Woche mit einer gesteigerten Na<sup>+</sup>-Resorption reagiert (Suplie, 2005).

## 4.2 Diskussion der Veränderungen im Blutbild

### 4.2.1 Übersicht

Im Blut der Versuchstiere wurden Veränderungen von IGF-1, Glucose im Serum, AST (Aspartat-Amino-Transferase), GLDH (Glutamat-Dehydrogenase), Erythrozytenindizes, Hämatokrit, Harnstoff, in der Leukozytendifferenzierung und in der Kaliumkonzentration gefunden, die sich nicht in dem von KRAFT & DÜRR (1999) angegebenen Normbereich befinden. Die Parameter zeigten außer der Glucose, dem IGF-1 und dem Harnstoff keine gerichteten, fütterungsabhängigen Veränderungen. Aus diesem Grund werden nur die fütterungsabhängigen Parameter diskutiert.

### 4.2.2 IGF-1

Der Insulin-growth-factor 1 (IGF-1) wird als eine mögliche Mediators substanz zwischen Fütterung und Epithelzellen-Proliferation angesehen. Für diese Hypothese fanden BALDWIN (1999) und SHEN et al. (2004b) an ruminalen Epithelzellen *in vitro* eine Bestätigung und auch *in vivo* wurde ein Zusammenhang zwischen der Fütterung von neonatalen Kälbern und der Dichte an IGF-1 Rezeptoren im Darm festgestellt (Hammon und Blum, 2002). Bei SHEN et al. (2004b) traten im Pansenepithel von Ziegen ebenfalls signifikant erhöhte Mengen an IGF-1 Rezeptor Protein auf, während die mRNA-Menge sowohl der Rezeptoren als auch des IGF-1 selber im Pansenepithel unverändert blieb. Unterschied zwischen der *in vivo*- und *in vitro*-Situation ist das Vorkommen von IGF-1 Bindungsproteinen im Blut, die die Wirkung des Botenstoffs modulieren (s. 1.6.1).

Besonders interessant erscheint die Tatsache, dass in anderen Epithelien (humane Leberzellen, humane renale Fibroblasten, arterielle glatte Muskulatur der Ratte) ein Zusammenhang zwischen IGF-1 und der Aktivität des Natrium-Protonen-Austauschers entdeckt wurde (Di Sario *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 1997; Standley *et al.*, 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurde wie in der Arbeit von SUPLIE (2005) innerhalb der ersten Woche ein signifikanter Anstieg des Natrium-Transportes *in vitro* nachgewiesen (s. 3.3.1). Dem gegenüber steht ein in der ersten Woche noch nicht signifikanter Anstieg der Konzentration von IGF-1 im Plasma (s. 3.1.2) und das Ausbleiben einer transkriptionellen Regulation des NHE1, 3 und NHERF 1 (s. 3.8.3.1). In der Abb. 61 sind die Natrium-Fluxe zusammen mit den IGF-1-Konzentrationen im Serum dargestellt. Die verwendeten Werte stammen zwar von unterschiedlichen Tieren, aber es ergibt sich ein annähernd gleicher Kurvenverlauf beider Parameter mit den Merkmalen eines raschen Anstiegs in den ersten 7 Tagen, eines Abfalls zum 14. Tag, eines weiteren langsamen Anstieges zum 28. Tag über das Niveau des 7. Tages hinaus und eines leichten Abfalles zum 42. Tag. Ein Zusammenhang zwischen NHE-Aktivität und IGF-1-Konzentration im Serum scheint also denkbar. Eine Korrelation der in der Abb. 61 verwendeten Mittelwerte ergibt ein  $R^2$  von 0,9.

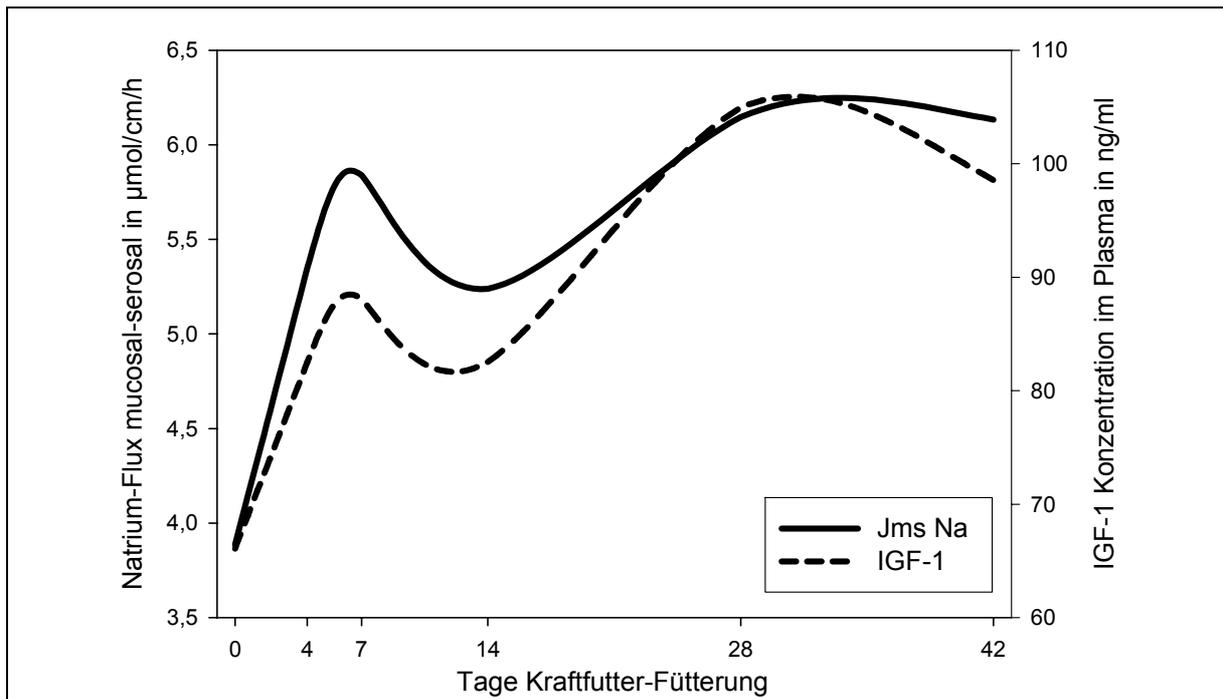


Abb. 61 Korrelation zwischen Natrium-Flux des Pansenepithels in der Ussing-Kammer ( $J_{ms}$  = Flux von mucosal nach serosal) und IGF-1-Konzentration (Insulin-like-growth factor) im Serum. Die Messungen fanden an den auf der x-Achse bezeichneten Tagen der Kraftfutter-Fütterung statt.

Die IGF-1 –Werte sind in verschiedenen Publikationen sowohl für Schafe als auch für Ziegen und Rinder trotz meist einheitlicher Bestimmungsmethode sehr unterschiedlich (s.Tab. 18), so dass es nahezu unmöglich ist, die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen mit anderen zu vergleichen.

Tab. 18 IGF-1-Konzentrationen aus verschiedenen Publikationen

IGF-1 Konzentration in ng/ml	Messmethode	Quelle der Messmethode	Alter	Fütterung	Tierart	Quelle
7- 35	1. Säure/Ethanol Cryoprecipitation 2. Doppel-Antikörper-RIA	1. BREIER et al. (1991) 2. GLUCKMANN et al. (1983)	4,6 ± 0,2 Jahre	6,4 MJ ME/d – 12,8 MJ ME/d	Mutterschafe	VINOLES et al. (2005)
20 - 320	1. Säure/Ethanol-Precipitation 2. kompetitives <sup>125</sup> I-RIA kit	1. 12,5% 2 mol/l HCl, 87,5% Ethanol 2. Nichols Insitute Diagnostics	Jung (k. w. A)	500 kJ/(kg <sup>0,75</sup> .d)- 1200 kJ/(kg <sup>0,75</sup> .d)	Ziegen (m)	SHEN et al. (2004b)
30 - 160	1. Säure/Ethanol cryoprecipitation 2. RIA	1. HODGKINSON (1991) 2. HUA et al. (1995)	2 Tage bis 24 Monate	Bei Fütterung und nach Fasten (k. w. A.)	Schafe (w)	OLDHAM et al. (1999)
100 - 200	1. Ethanol-Aceton-Essigsäure-Extraktion 2. RIA	1. ENRIGHT et al. (1989) 2. DRG diagnostics	Multipara	10,8 MJ ME/d	Mutterschafe	OSGERBY et al. (2003)
136,6 - 210,7	RIA	HOLLAND et al. (1988)	k. A.	Weizengras	Ochsen	PARK et al. (1994)
150 - 600	Western ligand blot V	SHARMA et al. (1994)	Primipara und Multipara	4 Gruppen (LL, MM, HH, MH)	Kühe und Färsen	VANDEHAAR et al. (1999)

k. A. = keine Angabe, k. w. A. = keine weiteren Angaben, w = weiblich, m = männlich, HCl = Salzsäure, RIA = radio-immuno-assay, LL = low energy, low protein (Energie- und Proteingehalt niedrig), MM = medium energy, medium protein (Energie- und Proteingehalt mittel), HH = high energy, high protein (Energie- und Proteingehalt hoch), MH = medium energy, high protein (Energiegehalt mittel, Proteingehalt hoch).

### 4.2.3 Glucose im Serum

Der Serum-Glucose-Wert reagiert als einziger der gemessenen Parameter direkt auf die Fütterung (s. Tab. 10). Es wurde erwartet, dass die Werte bei Heufütterung im Normbereich, und die Werte bei Konzentrat-Supplementierung über dem Normbereich liegen. Tatsächlich liegen aber schon 2/3 der Werte bei Heufütterung oberhalb des Normbereiches von 2,3 bis 3,3 mmol/l (s. Tab. 10). Dieser Normbereich ist allerdings für Vollblut angegeben und die Werte liegen im Serum immer bis zu 2 mmol/l höher (Kraft und Dürr, 1999).

Da die Blutentnahme um 15 Uhr 30, also 30 Minuten nach der zweiten Krafffuttergabe pro Tag erfolgte, ist mit einem erhöhten (postprandialen) Wert zu rechnen. Dementsprechend wurden die Erhöhungen der Glucose im Serum einem postprandialen Zustand zugeordnet und stellen somit eine physiologische Veränderung dar.

### 4.2.4 Harnstoff

Die Harnstoff-Werte der Versuchstiere liegen bei Heufütterung insgesamt und bei Krafffutter-Fütterung zu knapp 34 % unter dem bei KRAFT & DÜRR (1999) angegebenen Normbereich für Schafe (s. Tab. 10). Eine Erniedrigung des Harnstoffspiegels im Serum deutet auf eine proteinarme Ernährung oder Hungerzustände hin. Da die Energie in der angebotenen Futtermenge (17,42 MJME) in jedem Fall über den Erhaltungsbedarf (Bedarf eines 35 kg Schafes bei 150-200 g Lebendmassezunahme/Tag = 11 MJME, (Kamphues *et al.*, 2004)) der Tiere hinausgeht und die Tiere im Mittel 6,3 kg an Gewicht zunahmten, können Hungerzustände ausgeschlossen werden.

Bei Konzentratfutter-Supplementierung liegen 64 % der Harnstoffwerte über dem Normbereich (s. Tab. 10). Eine mögliche pathologische Erhöhung dieses Wertes kann eine prärenale, renale, oder postrenale Ursache haben. Bei all diesen Befunden wäre jedoch der Wert für Serum-Kreatinin ebenfalls erhöht, der bei den verwendeten Versuchstieren jedoch nur bei einer Messung bei einem Tier leicht erhöht vorlag (s. Tab. 10). Die Erhöhung der Harnstoff-Werte ist also in diesem Fall auf die proteinreiche Fütterung zurückzuführen.

## 4.3 Fütterung

In den Versuchen zur vorliegenden Arbeit wurde den Tieren bei Heufütterung einmal täglich 1,5 kg Heu und bei Krafffutterzugabe einmal täglich 1 kg Heu und zwei Mal täglich 390 g Krafffutter vorgelegt. Die Menge des Konzentrat-Futters wurde jedoch in den ersten Tagen der Futterumstellung langsam gesteigert (1. Tag zwei Mal 100 g, 2. Tag zwei Mal 200 g, 3. Tag zwei Mal 300 g, ab dem vierten Tag die volle Menge). Dieses langsame „Anfüttern“ wurde durchgeführt, um pathologische Reaktionen (Pansenazidose) zu verhindern. Darüber hinaus war in Voruntersuchungen der Experimente zur vorliegenden Arbeit festgestellt worden, dass die Akzeptanz der Tiere für das Krafffutter erst über einige Tage anwächst.

Dafür musste in Kauf genommen werden, dass die Energieaufnahme am ersten Tag nach der Umstellung unter der Energiemenge der Heufütterung allein lag und erst ab dem 2. Tag eine allmähliche Steigerung um ca. 2 MJ ME pro Tag auf 17,42 MJ ME erfolgte. Die Futtermenge an Rau- und Konzentratfutter wurde so berechnet, dass die Tiere ab dem 4. Tag KF 50 % der Energie mit dem Heu und 50 % der Energie aus Konzentratfutter aufnahmen.

## 4.4 Diskussion der Veränderungen der Pansenflüssigkeit

### 4.4.1 Fettsäuren/pH in der Pansenflüssigkeit

In den Messungen zur vorliegenden Arbeit wurden in der Pansenflüssigkeit Fettsäurekonzentrationen von 46 bis 122 mmol/l festgestellt (s. 3.4.5). Im Vergleich zu den Werten in der Publikation von BENNINK et al. (1978) mit 100 – 200 mmol/l liegt diese Konzentration niedriger. Wie in der Arbeit von PETERS et al. (1990) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Konzentrationen bei Raufutterreicher und konzentratsupplementierter Fütterung gefunden werden. Die einzelnen Fettsäuren ähneln in ihrem Verhältnis von ca. 5 : 1,5 : 1 (Acetat : Propionat : Butyrat) den Angaben von PETERS et al. (1990), auch wenn eine signifikante Abhängigkeit der Acetat-Konzentration von der Fütterung in der vorliegenden Arbeit nicht auftritt.

Der pH-Wert der Pansenflüssigkeit wird hauptsächlich von der Produktion der flüchtigen Fettsäuren bestimmt (s. 1.3.10). Bei einer hohen Fettsäure-Konzentration sinkt der pH-Wert, während er sich bei einer geringeren Menge an Fettsäuren neutralisiert. ALLEN (1997) beschreibt dieses Verhältnis im Pansen des Rindes durch die folgende Funktion:

$$\text{Gleichung 17} \quad \text{pH} = 6,56 - 0,0049 \times \text{VFA (mmol/l)}$$

VFA = volatile fatty acids, flüchtige Fettsäuren

In der vorliegenden Arbeit wurde die Beziehung zwischen Fettsäurekonzentration und pH-Wert der Pansenflüssigkeit unter den gegebenen Versuchsbedingungen grafisch dargestellt (s. Abb. 24) und mit der folgenden Gleichung zusammengefasst:

$$\text{Gleichung 18} \quad \text{pH} = 7,69 - 0,017 \times \text{VFA (mmol/l)}$$

TAMMINGA & VAN VUUREN (1988) veröffentlichten eine ähnliche Grafik (s. Abb. 62), in der die Beziehung zwischen den beiden Parametern bei Milchkühen mit der Gleichung 19 charakterisiert wurde.

$$\text{Gleichung 19} \quad \text{pH} = 7,73 - 0,014 \times \text{VFA (mmol/l)}$$

Die Gleichung 18 stimmt mit der Gleichung 19 annähernd überein, während die Gleichung 17 einen flacheren Verlauf der Geraden beschreibt. ALLEN (1997) entnahm die Werte seiner

Grafik verschiedenen Publikationen, wobei der ruminale pH-Wert seiner Gleichung dem Mittelwert aus allen Messungen eines Tages entspricht. Möglicherweise stellt dies die Erklärung für die Abweichung der Gleichungen dar.

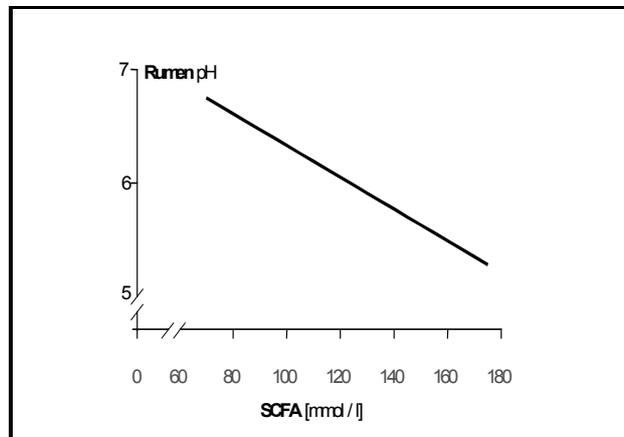


Abb. 62 Verhältnis zwischen ruminaler Fettsäurekonzentration (SCFA in mmol/l) und pH-Wert, entnommen aus Tamminga und van Vuuren 1988.

Für die Neutralisation der  $H^+$  im Pansen dienen verschiedene Prozesse: Allen (1997) stellte fest, dass 53% der Protonen mit flüchtigen Fettsäuren absorbiert und über 28% durch das Kohlensäure-Puffer-System mit Bicarbonat zu  $H_2O$  und  $CO_2$  umgewandelt werden. Etwa 9% werden durch Hydrogenphosphat gepuffert und über 7% fließen mit flüchtigen Fettsäuren und  $NH_4^+$  in Richtung des Blättermagens.

Ein niedriger ruminaler pH-Wert hat beim Wiederkäuer zur Folge, dass der Appetit, die Motilität des Pansens, die Mikrobenmenge im Pansen und die Faser-Verdaulichkeit sinken (Allen, 1997). Bei sehr niedrigen pH-Werten kann eine Pansenazidose mit Ruminitis, ruminalem Ulkus und Leber-Abszessen die Folge sein (Bostedt und Dedié, 1996; Slyter, 1976).

Im Gegensatz zu den Angaben aus der Literatur (s. 1.3.10) wird der niedrigste pH-Wert in den Experimenten der vorliegenden Arbeit schon 2 Stunden nach der Fütterung erreicht (s. 3.4.1).

Unterhalb eines pH-Wertes von 5,5 wird von einer Pansenazidose gesprochen (Dirksen, 1985; Dirksen, 1986). Dieser Wert wird in den Versuchen zur vorliegenden Arbeit nur von Schaf 29 am 14. Tag der Krafftutter-Zugabe zum Zeitpunkt von 2 Stunden nach der Fütterung unterschritten (pH 5,42). Die Tiere sind also nicht einer Pansenazidose ausgesetzt.

Einen deutlichen Hinweis auf eine adaptative Leistung des Pansens stellt die Tatsache dar, dass der niedrigste pH-Wert der Pansenflüssigkeit ab dem 7. Tag der energiereichen Fütterung pro Tag um ca. 0,01 pH-Einheiten steigt (s. 3.4.1, Abb. 16)

Eine Senkung des pH-Wertes der Pansenflüssigkeit hat eine erhöhte Resorption von flüchtigen Fettsäuren zur Folge, da diese mit einem pK-Wert von ca. 4,8 bei niedrigerem pH-

Wert zu einem größeren Anteil in undissoziierter Form vorliegen und besser lipidlöslich sind (Gäbel, 1988). Der pH-Wert beeinflusst über den soeben beschriebenen Effekt auch die Aufnahme von  $\text{Na}^+$ , denn bei vermehrter Absorption von Fettsäuren stehen mehr Protonen im Zellinneren zur Verfügung, die den NHE antreiben (s. 1.4.8.1). In den Ussing-Kammer-Experimenten zur vorliegenden Arbeit wurde ein Anstieg der  $\text{Na}^+$ -Absorption in der ersten Woche der Konzentratfütter-Supplementierung festgestellt (s. 3.3.1), der nicht durch eine Zunahme der Fettsäure-Aufnahme und damit einem höheren pH-Wert im Zellinneren zu erklären ist, denn die Absorption der Fettsäure Acetat wurde *in vitro* nicht gesteigert (s. 3.3.2).

#### 4.4.2 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Konzentration in der Pansenflüssigkeit

Die Summe von  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$  in der Pansenflüssigkeit ist annähernd konstant (Scott, 1967; Stacy und Warner, 1966). Bei hoher  $\text{Na}^+$ -Konzentration ist die  $\text{K}^+$ -Konzentration niedrig und bei niedriger  $\text{Na}^+$ -Konzentration ist dementsprechend die  $\text{K}^+$ -Konzentration höher. Als Regulationsmechanismus für dieses Phänomen war bekannt, dass eine erhöhte  $\text{K}^+$ -Zufuhr bei kalium-reicher Fütterung eine Steigerung der  $\text{Na}^+$ -Absorption bewirkt (Scott, 1967; Stacy und Warner, 1966). Hohe  $\text{K}^+$ -Konzentrationen im Pansenum depolarisieren die apikale Membran der Epithelzelle. Diese Depolarisation induziert eine Veränderung bzw. Erhöhung der PD-abhängigen Kationen-Leitfähigkeit, was wiederum eine Steigerung des elektrogenen Natrium-Transportes zur Folge hat (Lang und Martens, 1999; Leonhard-Marek *et al.*, 2005). Ein konstantes Verhältnis der beiden Ionen zueinander wurde auch in der vorliegenden Arbeit gefunden (s. Abb. 26), wobei innerhalb der 3 Messpunkte (vor der Fütterung, 2 und 8 Stunden danach) 2 Stunden nach der Fütterung die höchsten  $\text{K}^+$ -Werte auftraten, die offensichtlich durch den oben genannten Mechanismus eine Erniedrigung der  $\text{Na}^+$ -Konzentration bewirkten (s. Abb. 25). Mit der Verdünnung durch den Speichel und durch Absorption durch das Pansenepithel (Bailey, 1961; Bennink *et al.*, 1978) sinkt anschließend der  $\text{K}^+$ -Spiegel wieder ab.

$\text{Na}^+$  ist in den Messungen der vorliegenden Arbeit mit einer Konzentration von 74 bis 127 mmol/l vertreten, was den Angaben aus der Literatur entspricht (s. 1.3.2), die gemessene  $\text{K}^+$ -Konzentration liegt mit 16-48 mmol/l niedriger als von BENNINK *et al.* (1978) (30 bis 80 mmol/l) beschrieben.

Eine annähernd konstant bleibende Summe der  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$  in der Pansenflüssigkeit ist auch in der vorliegenden Arbeit gefunden worden (s. Abb. 26).

### **4.4.3 Stickstoffverbindungen**

#### **4.4.3.1 Ammonium-Ionen-Konzentration in der Pansenflüssigkeit**

In den Experimenten zur vorliegenden Arbeit wurden  $\text{NH}_4^+$ -Konzentrationen von 1 bis 30 mmol/l gemessen. Dieser Konzentrationsbereich entspricht weitestgehend den in der Literatur angegebenen Werten (s. 1.3.9). Maximale Konzentrationen lagen mit Ausnahme des 28. Tages der konzentratreichen Fütterung 2 bis 3 Stunden nach der Fütterung vor, während bei WOHLT & BLAISDELL (1976) die höchsten Werte 30 bis 90 Minuten nach Fütterung auftraten. Auch bei Heufütterung erfolgte im Gegensatz zu den Ergebnissen von LEEDLE et al. (1982) ein Anstieg der Ammonium-Ionen-Konzentration.

#### **4.4.3.2 Korrelation der Ammonium-Ionen-Konzentration in der Pansenflüssigkeit mit der Harnstoffkonzentration im Blut**

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl die  $\text{NH}_4^+$ -Konzentration in der Pansenflüssigkeit als auch die Harnstoffkonzentration im Blut bestimmt. Diese beiden Parameter stehen über das leicht durch die Pansenwand diffundierende Ammoniak-Molekül in Beziehung zueinander. Das  $\text{NH}_3$  im Blut gelangt über den Pfortaderkreislauf zur Leber und wird dort durch die Harnstoff-Synthese entgiftet (Engelhardt und Breves, 2005). Mit der  $\text{NH}_4^+$ -Konzentration im Pansen steigt also der Harnstoffspiegel im Blut an (s. Abb. 63). Der Harnstoff verlässt den Körper über den Urin oder wird durch den ruminohepatischen Kreislauf über Pansenwand und Speichel ins Pansenlumen sezerniert und dort durch die mikrobielle Urease wieder zu  $\text{NH}_4^+$  und  $\text{CO}_2$  aufgespalten (Engelhardt und Breves, 2005).

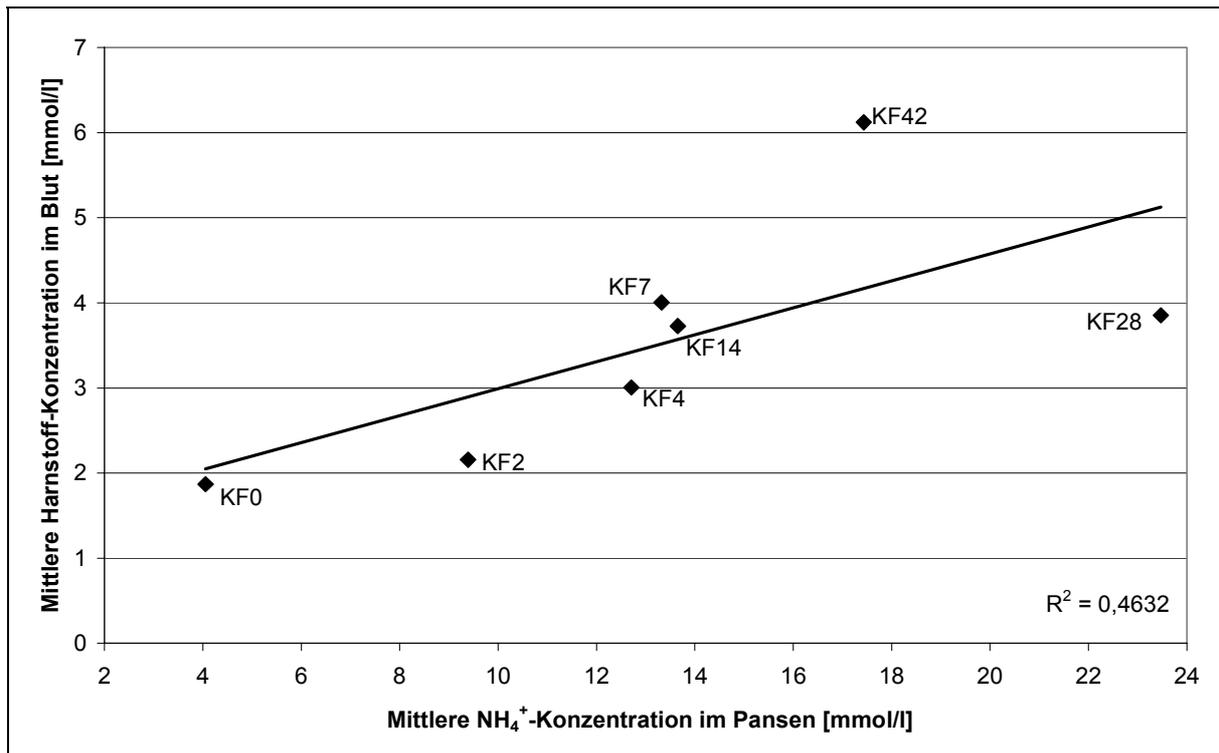


Abb. 63 Korrelation zwischen  $\text{NH}_4^+$ -Konzentration in der Pansenflüssigkeit (Mittelwert der Messungen über 9 Stunden bei  $n = 6$ ) und Harnstoff-Konzentration im Blut (Mittelwert einer Messung um 15:30 Uhr,  $n = 6$ ); die  $\text{NH}_4^+$ -Konzentration ist als Gerade und die Harnstoffkonzentration für die jeweilige Fütterungsgruppe als Einzelpunkt dargestellt; KF = Konzentratfütterungstag

#### 4.4.4 Osmolalität der Pansenflüssigkeit

Bei den Untersuchungen der Osmolalität ergaben sich in den Versuchen zur vorliegenden Arbeit osmotische Drücke von 256 bis 446 mosmol/l. Niedrige Osmolalität trat allgemein direkt vor der Fütterung auf, während hohe Osmolalitäten bei Heufütterung 5 Stunden nach der Fütterung und bei Kraffutter-Zufütterung typischerweise eine Stunde nach Fütterung erreicht wurden (s. 3.4.3). Die Werte vor der Fütterung entsprechen den Angaben von BENNINK et al. (1978) mit Mittelwerten zwischen 280 und 340 mosmol/kg. Anders als in den Experimenten zur vorliegenden Arbeit trat bei BENNINK et al. (1978) eine maximale Osmolalität 2-4 h nach der Fütterung auf. Bei BENNINK et al. (1978) wurde auch eine Abhängigkeit der mittleren Osmolalität vom aufgenommenen Futtermittel festgestellt, die sowohl von PETERS et al., (1990), als auch in den Versuchen der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden konnte. Entgegen der Werte von PETERS et al. (1990) wurde ein unterschiedlicher Verlauf der Osmolalität bei Heufütterung und Konzentratfütterung-Supplementierung beobachtet (s. 3.4.3).

Zwischen dem osmotischen Druck der Pansenflüssigkeit und der Wasserresorption bzw. -sekretion besteht ein linearer Zusammenhang (Lopez *et al.*, 1994). Bei einem osmotischen Druck von über 340 mosmol/l tritt eine Wassersekretion und unter 340 mosmol/l eine Resorption auf (Dobson *et al.*, 1970; Lopez *et al.*, 1994). Unter den 378 Werten, die in der

vorliegenden Arbeit bestimmt wurden, befinden sich 207 über 340 mosmol, während 171 kleiner oder gleich 340 mosmol sind. Die genaue Verteilung der Werte innerhalb der Fütterungsgruppen sind in Tab. 19 zu entnehmen. Es besteht allgemein, durch ein Überwiegen der Werte  $\geq 341$  mosmol, eine Tendenz zur Wassersekretion in den Pansen, besonders bei Heu-Fütterung und 7-tägiger Krafffutter-Fütterung. Am 14. und 28. Tag der Futterumstellung ist das Verhältnis zwischen Resorption und Sekretion ausgewogen. Nur am 2. Tag der Konzentrat-Supplementierung ist das Verhältnis umgekehrt und eine Wasserresorption aus dem Pansen ist wahrscheinlicher.

Tab. 19 Verteilung der Osmolalitätswerte über und unter 340 mosmol; KF = Krafffutter-Fütterungstage

Fütterung	Werte $\geq 341$	Werte $< 341$	Verhältnis
Heu	32	22	1,5 : 1
2 KF	20	34	0,6 : 1
4 KF	31	23	1,3 : 1
7 KF	39	15	2,6 : 1
14 KF	27	27	1 : 1
28 KF	27	27	1 : 1
42 KF	31	23	1,3 : 1
KF gesamt	175	149	1,2 : 1

#### 4.4.5 Volumen der Pansenflüssigkeit

Der osmotische Druck hat auch einen Einfluss auf den Abfluss in Richtung Psalter, der in einem positiven linearen Verhältnis ausgedrückt werden kann (Lopez *et al.*, 1994):

**Gleichung 20** 
$$F [ml/h] = 1,24 \times OP [mosmol/kg] - 36,5$$

F = Liquid outflow rate (Turnover, Flüssigkeitsbewegung Richtung Psalter)

OP = Osmotic pressure (Osmotischer Druck der Pansenflüssigkeit)

Die positive Beziehung bedeutet, dass hypertone Bedingungen im Pansen und die konsekutive Wassersekretion in den Pansen den Abfluss der Flüssigkeit in Richtung Psalter erhöhen, während hypotone Bedingungen durch Wasserresorption den Abfluss verringern. In der vorliegenden Arbeit wurde über den Volumenmarker Chromium-EDTA das Volumen des Pansens und die Flüssigkeitsbewegung in Richtung Psalter bestimmt (s. 3.4.4).

Der Abfluss in den Psalter nach den Berechnungen aus 2.6.3.3 beträgt 0,56 bis 0,9 l/h. Nach der oben genannten Gleichung 20 kann mit den Osmolalitätswerten aus der Pansenflüssigkeit ebenfalls der Abfluss berechnet werden. Dazu wurden die Osmolalitätswerte aller Messungen (von 6 Tieren und 9-stündiger Messung) eines Tages in einem Mittelwert zusammengefasst und in die Gleichung 20 eingesetzt. Dabei ergaben sich

Werte von 0,38 bis 0,42 l/h, die sich also deutlich von denen unterscheiden, die aus dem Abfall des Volumenmarkers Chromium-EDTA errechnet wurden.

Bei dem Vergleich der Ergebnisse aus beiden Berechnungen müssen verschiedene Überlegungen mit einbezogen werden: In der Arbeit von Lopez et al. (1994) wurde der osmotische Druck der künstlichen Pansenflüssigkeit durch kontinuierliche Messung und Ausgleich mit NaCl konstant gehalten, während bei den Experimenten zur vorliegenden Arbeit keine konstante Osmolalität vorlag (s. 3.4.3). Durch den konstanten osmotischen Druck bleibt auch die Wasserbewegung durch das Epithel konstant, was durch die Schwankungen dieses Parameters in der vorliegenden Arbeit verhindert wurde.

Zusätzlich wird bei der Berechnung des Abflusses aus dem Abfall des Volumenmarkers von einem konstanten Pansenvolumen ausgegangen, das bedeutet, dass Wasserresorption und Wassersekretion durch das Epithel etwa gleich groß sind. In den Experimenten von Lopez et al. war jedoch das Pansenvolumen nur bei einem osmotischen Druck von 341 mosmol/kg konstant (s. 4.4.4). In den Experimenten zur vorliegenden Arbeit zeigten sich deutliche Schwankungen der Osmolalität und ein Überwiegen der Wassersekretion in den Pansen (s. 4.4.4), die nach Lopez et al. (1994) eine Änderungen des Pansenvolumens und eine Erhöhung des Abflusses in den Psalter bewirken.

Beide Berechnungsmethoden können also nur einen annähernden Wert für den Abfluss in den Psalter wiedergeben, der wirkliche Abfluss liegt wahrscheinlich zwischen den ermittelten Werten aus beiden Berechnungen.

PETERS et al. (1990) beobachteten bei Kühen einen Anstieg des Volumens bei konzentrat-reicher Fütterung gegenüber raufutterreicher Fütterung, der in den Experimenten zur vorliegenden Arbeit nicht bestätigt wurde (s. Tab. 15).

Dagegen konnte eine Abhängigkeit der Turnoverrate von der Fütterung wie in den Versuchen von PETERS et al. (1990) (mit 11,6 %/h bei raufutterreicher Fütterung zu 7,6 %/h bei konzentratreicher Fütterung) auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden (s. Ergebn. Tab. 6), der Turnover lag hier bei raufutterreicher Fütterung bei 15,7 %/h und bei konzentratfütterreicher Fütterung bei 12,9 %/h (s. Tab. 15, 3.4.4).

## 4.5 Probennahme bei der Schlachtung

Die Gewebeproben für die Ussing-Kammer-Versuche und die molekularen Versuche konnten nicht von der gleichen Stelle genommen werden. Der Zottenbesatz des ventralen Sackes ist erfahrungsgemäß gering und ändert sich auch bei unterschiedlicher Fütterung wenig (Gäbel *et al.*, 1987a). Das Gewebe dieses Bereiches hat sich in vorherigen Untersuchungen als ideal für die Ussing-Kammer-Versuche erwiesen, da hier der Widerstand des Epithels geringer ist als bei stärkerem Zottenbesatz und die Fläche auch bei unterschiedlicher Fütterung gleich bleibt. Dieser Aspekt ist für die Berechnung der Fluxraten

von großer Bedeutung (s. 2.4.3.1). Für die molekularen Versuche mussten jedoch möglichst viele Zotten von einer kleinen Fläche gewonnen werden, um stärkere Abweichungen in den Ergebnissen zu vermeiden und um möglichst wenig Bindegewebe, aber viel Epithel zu gewinnen. Dafür erschien der Zottenbesatz des seitlichen vorderen Pansenpfeilers geeignet. Hier findet eine stärkere Veränderung der Zottengröße statt (Gäbel *et al.*, 1987a).

Einen weiteren kritischen Punkt des Versuchsdesigns stellt die Verwendung von unterschiedlichen Tieren für die Pansenflüssigkeits-Untersuchungen und die Untersuchungen in der Ussing-Kammer und der Molekularbiologie dar. Die Trennung der Gruppen erfolgte aus tierschutzrelevanten Gründen. Durch die Wahl von Tieren, die in etwa gleich alt, gleich schwer, vom gleichen Schafhalter und von gleicher Rasse waren, wurde versucht, die biologische Streuung so weit wie möglich zu minimieren.

## 4.6 Diskussion der Ussing-Kammer-Versuche

### 4.6.1 Probennahme

Die Untersuchungen des Pansenepithels in der Ussing-Kammer wurden durch die Entnahme am gleichen Ort standardisiert. Das Epithel des ventralen Pansensackes verändert sich in seinem Zottenbesatz nur geringfügig während der Futterumstellung. Die Messung des Trockengewichtes der Proben, die in der Dissertation von SUPLIE (2005) durchgeführt wurde, musste nicht wiederholt werden, da keine Unterschiede in den Versuchsgruppen festgestellt wurden.

### 4.6.2 Natrium-Transport

Innerhalb der ersten Woche nach Futterumstellung wurden bei den Versuchsgruppen 2-4 (2 Tage, 4 Tage und 7 Tage Konzentratgabe) eine deutliche Steigerung der  $\text{Na}^+$ -Resorption gegenüber der Kontrollgruppe von  $J_{\text{ms}}$  3,89  $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$  auf  $J_{\text{ms}}$  5,84  $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$  festgestellt (s. 3.3.1).

In der Literatur sind verschiedene Erklärungsansätze für diätabhängig veränderte  $\text{Na}^+$ -Resorptionsraten beschrieben.

WARNER und STACY (1965) führten die gesteigerten  $\text{Na}^+$ -Transportraten auf die bei energiereichen Diäten entstehende hohe Konzentration an kurzkettigen Fettsäuren und dem daraus resultierenden Anstieg des intraruminalen osmotischen Drucks zurück. Laut SCHWEIGEL *et al.* (2005) hat jedoch die Hyperosmolarität eine hemmende Wirkung auf den  $\text{Na}^+$ -Transport, da die passive Permeabilität gesteigert und der NHE durch das Absinken des intrazellulären pH-Wertes gehemmt wird. 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 Natrium Richtung Pansenlumen durch die erhöhte passive Permeabilität.

Bei Erhöhung der Konzentration von kurzkettigen Fettsäuren diffundieren vermehrt undissoziierte SCFA ins Zellinnere, dort kommt es durch den niedrigen pK-Wert zur Abgabe des Protons (Dissoziation). Die hierbei freiwerdenden  $H^+$  werden anschließend, um den intrazellulären pH-Wert konstant zu halten, über den NHE3 in das Pansenlumen abgegeben; andererseits wird im Austausch Natrium in die Zelle aufgenommen (Gäbel *et al.*, 1991b; Petersen *et al.*, 1981; Sehested *et al.*, 1996; Uppal *et al.*, 2003a; Uppal *et al.*, 2003b).

SCFA steigern also das Angebot an Protonen und damit an Substrat für den NHE3.

Einen weiteren potentiellen Protonenlieferanten stellt  $NH_4^+$  dar, das über einen  $K^+$ -Kanal die apikale Membran der Zelle passieren und im Zellinneren Protonen freigegeben kann (Abdoun *et al.*, 2003; Abdoun *et al.*, 2005).

Bei der Beurteilung dieser Erklärungsansätze muss allerdings berücksichtigt werden, dass die Beobachtungen in der vorliegenden Arbeit *in vitro* gemacht wurden. Veränderungen des luminalen Milieus können also nicht für die gesteigerte  $Na^+$ -Resorption verantwortlich sein, da bei allen Versuchsgruppen eine Standard-Lösung verwendet wurde. Daher sind die erzielten Ergebnisse nur als eine Veränderung des Epithels selbst zu interpretieren.

#### 4.6.3 Acetat-Transport

In den Ussing-Kammer-Versuchen konnte festgestellt werden, dass sich die Transportraten für Acetat in keiner der Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe steigerte (s. 3.3.2). Die *in vitro* ermittelten Ergebnisse des Fütterungsversuches entsprechen nicht den in der Literatur beschriebenen Effekten *in vivo* nach einer Umstellung auf energiereiches Futter. DIRKSEN *et al.* (1984) entdeckten bei einem Resorptionsversuch am gewaschenen Pansen, dass das Pansengewebe von Kühen nach Heufütterung ad libitum eine deutlich geringere Resorptionskapazität für SCFA aufwies als nach energiereicher Fütterung mit Krafffutter, Grascops und Heu (s. Abb. 64).

Dabei muss Folgendes berücksichtigt werden: Der Unterschied zwischen der Situation *in vivo* und *in vitro* besteht darin, dass in der Ussing-Kammer durch die Kammerbegrenzung und die Wahl eines mit relativ wenigen Zotten besetzten Epithelstückes immer eine annähernd gleiche Fläche für die Bestimmung der Resorptionraten genutzt wird. In dem Versuch am gewaschenen Pansen ist allerdings damit zu rechnen, dass sich die Oberfläche des Pansens, die mit der eingegebenen Puffer-Lösung in Berührung kommt, nach 20 Wochen energiereicher Fütterung annähernd verdoppelt hat.

Eine deutliche Steigerung in der Resorptionsfähigkeit des Epithels wird also *in vivo* wahrscheinlich vor allem durch den Faktor Fläche erreicht.

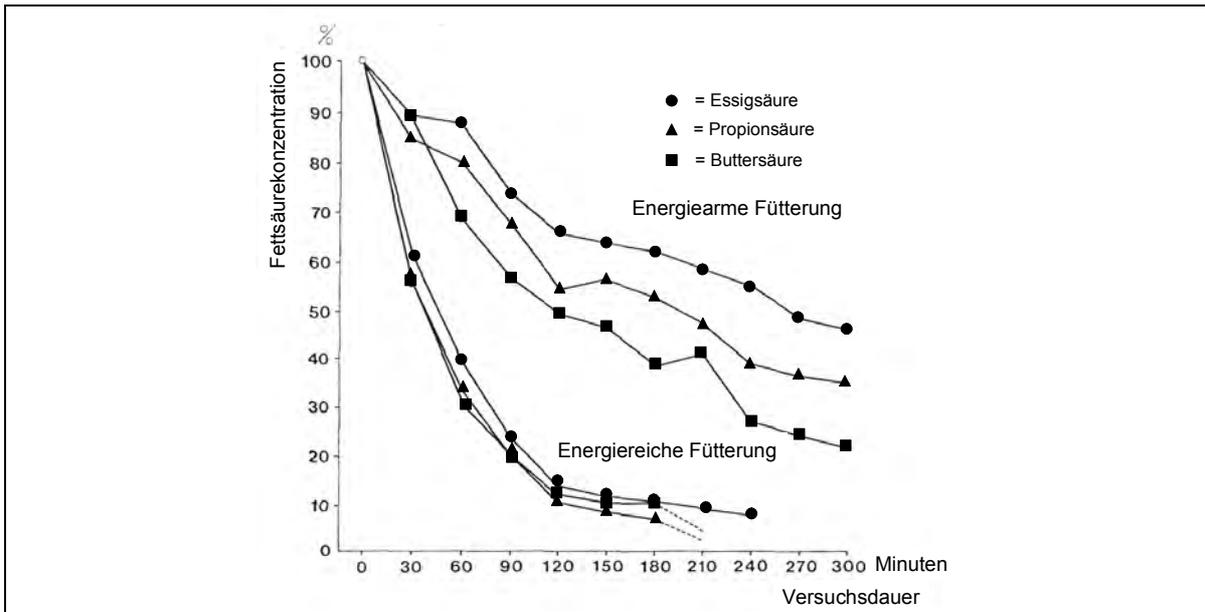


Abb. 64 Abnahme der Fettsäurekonzentration in einem Zeitraum von 5 Stunden nach Eingabe einer Fettsäure-haltigen Lösung in den gewaschenen Pansen nach Adaptation an energiearme und energiereiche Fütterung bei einer Kuh. Abbildung nach DIRKSEN et al. (1984).

## 4.7 Diskussion der molekularbiologischen Ergebnisse

Seit BROWNLEE (1956) eine Abhängigkeit der Struktur und Transportfunktion des Pansenepithels der Wiederkäuer von der Fütterung postulierte, folgten zahlreiche Untersuchungen der adaptativen Eigenschaften des Pansenepithels auf morphologischer und auf funktioneller Ebene. Aufgrund methodischer Beschränkungen war jedoch eine Untersuchung auf molekularbiologischer Ebene bislang kaum möglich. Bevor die Transkriptionsratenveränderungen von Transportproteinen im Pansen während der Adaptation an eine Futterumstellung bestimmt werden konnten, mussten die für die entsprechenden Proteine kodierende mRNA-Moleküle im Pansen nachgewiesen werden (s. 2.5). In der Dissertation von SUPLIE (2005) wurden die Transportproteine NHE1, NHE3, AE2, vHATPase und NBC im Pansenepithel nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit wurde die mRNA weiterer Transportproteine sowie die mRNA verschiedener Enzyme im Pansen detektiert (s. 3.5). Damit waren der Beweis der Transkription der entsprechenden Gene und der deutliche Hinweis auf die Expression der entsprechenden Proteine erbracht. Trotzdem muss die Möglichkeit berücksichtigt werden, dass der Transkription eines Gens nicht zwangsläufig die Translation folgt und die Transkriptionsrate nicht zwangsläufig mit der Translationsrate korreliert.

Da der zeitliche Verlauf der Adaptation des Pansenepithels an 7 zeitlichen Messpunkten untersucht werden sollte, die Gesamtanzahl der Tiere aber aus tierschutzrelevanten und Kostengründen begrenzt war, standen pro Versuchsgruppe 3 Tiere zur Verfügung (s. 2.1). Es musste damit gerechnet werden, dass bei Untersuchung des frisch entnommenen Pansengewebes biologische, tierindividuelle Schwankungen in der Genexpression auftreten würden. Die geringe N-Zahl (3) lässt daher nur eine deskriptive Auswertung der Ergebnisse zu. Aus diesem Grund wurden die qPCR-Experimente in Form eines „Screeningversuches“ konzeptioniert. Ziel der Versuche war es, Transportproteine aufzufinden, die im Rahmen des Adaptationsprozesses des Pansenepithels von Wiederkäuern quantitativen Schwankungen der relativen Transkriptionsrate unterliegen.

### 4.7.1 Übersicht

Für die Erstellung von Genexpressionsprofilen einzelner Gene (s. 2.5.4) stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung, darunter Northern Blot und quantitative Polymerasekettenreaktion (Bustin, 2000; Sambrook und Fritsch, 1989). Von diesen hat sich in den vergangenen Jahren die qRT-PCR als vorherrschendes Verfahren herauskristallisiert. So liefert eine Datenbanksuche in der NIH National Library of Medicine (Pubmed) für Jahr 2005 knapp 2000 Treffer für den Begriff „Northern Blot“, während der Begriff „quantitative PCR“ fast 4000 Treffer erzielt. Daher wurde die qRT-PCR in der vorliegenden Arbeit zur Erstellung von Genexpressionsprofilen gewählt.

#### 4.7.2 RNA-Isolierung und RNA-Qualitätskontrolle

RNA wird schnell durch weit verbreitet auftretende RNAsen abgebaut und ist daher eine besonders labile Molekülklasse (Hamasaki *et al.*, 2001). Für die Arbeit mit RNA sind daher besondere Vorsichtsmaßnahmen und Kontrollschritte notwendig (Schroeder *et al.*, 2006).

In der vorliegenden Arbeit erstreckten sich die genannten Vorsichtsmaßnahmen auf die Gewinnung und Lagerung von Gewebeproben (s. 2.5.2.1) und auf die RNA-Isolierung (s. 2.5.2.2). Bei der Probengewinnung und -lagerung wurde ein RNA-Stabilisationsmedium nach den Vorgaben des Herstellers eingesetzt (s. 2.5.2.1). Obwohl kontrovers diskutiert, bietet dieses Produkt nach Meinung einiger Autoren die Möglichkeit der sicheren und praktikablen Lagerung von Proben, aus welchen in der Folge RNA isoliert werden soll (Chowdary *et al.*, 2006; Micke *et al.*, 2006; Mutter *et al.*, 2004). Die RNA-Isolierung erfolgte unter RNase-freien Bedingungen mit Einsatz von Puffern, welche chaotrope Salze enthalten (Lysispuffer, s. 2.5.2.2). Chaotrope Salze (in diesem Fall Guanidin-Isothiozyanat-Anteile) sind in der Lage, Wasserstoff-Brücken aufzubrechen und hydrophobe Interaktionen zu stören, wodurch Proteine (auch RNAsen) denaturiert und damit inaktiviert werden. Diese Form der RNA-Isolierung gewährleistet nach Einschätzung vieler Autoren den Schutz der Proben-RNA vor Degradation (Bastard *et al.*, 2002; Bonham und Danielpour, 1996; Noonberg *et al.*, 1995; Sambrook und Fritsch, 1989).

Die oben erwähnten Kontrollschritte zur Feststellung der RNA-Integrität erfolgten in der vorliegenden Arbeit durch kapillarelektrophoretische Analyse (s. 2.5.2.4) der Proben-RNA. Da bei diesem Verfahren hauptsächlich die ribosomale RNA (rRNA) als Indikator für die Integrität der mRNA genutzt wird (s. Abb. 65, Abb. 66), bleibt die Zuverlässigkeit dieses Verfahrens Gegenstand kontroverser Diskussion (Schroeder *et al.*, 2006). Trotzdem sind einige Autoren der Meinung, dass die kapillarelektrophoretisch gemessene RNA-Integrität einen geeigneten Indikator für die Bewertung von Proben-RNA darstellt (Bastard *et al.*, 2002; Fleige und Pfaffl, 2006; Micke *et al.*, 2006; Schroeder *et al.*, 2006).

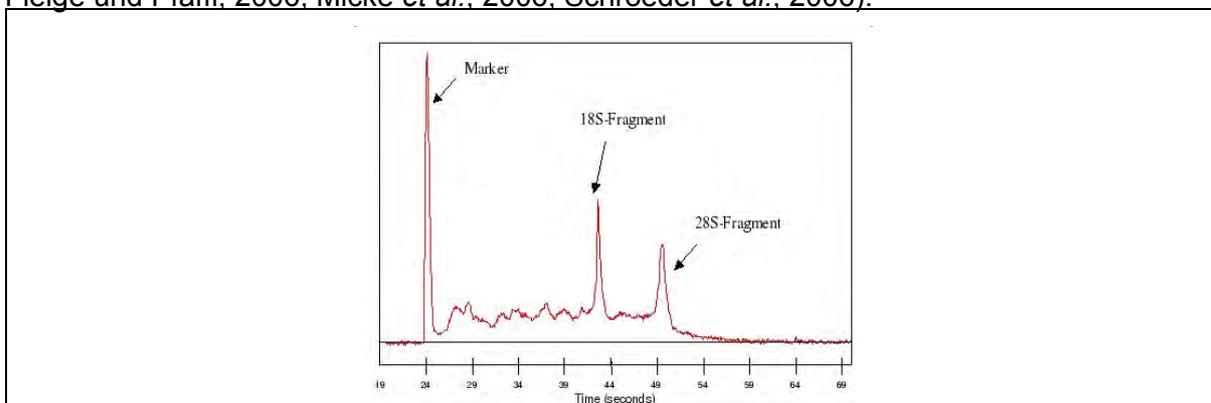


Abb. 65 Die ribosomale RNA, die den größten Anteil unter den Ribonukleinsäuren ausmacht, dient bei der Kapillarelektrophorese als Indikator. Die beiden Untereinheiten 18 s und 28 s mit der Größe von ca. 1800 und ca. 4900 Nukleotiden stellen sich im Elektropherogramm als 2 Spitzen dar. Abbildung nach SCHROEDER *et al.* (2006)

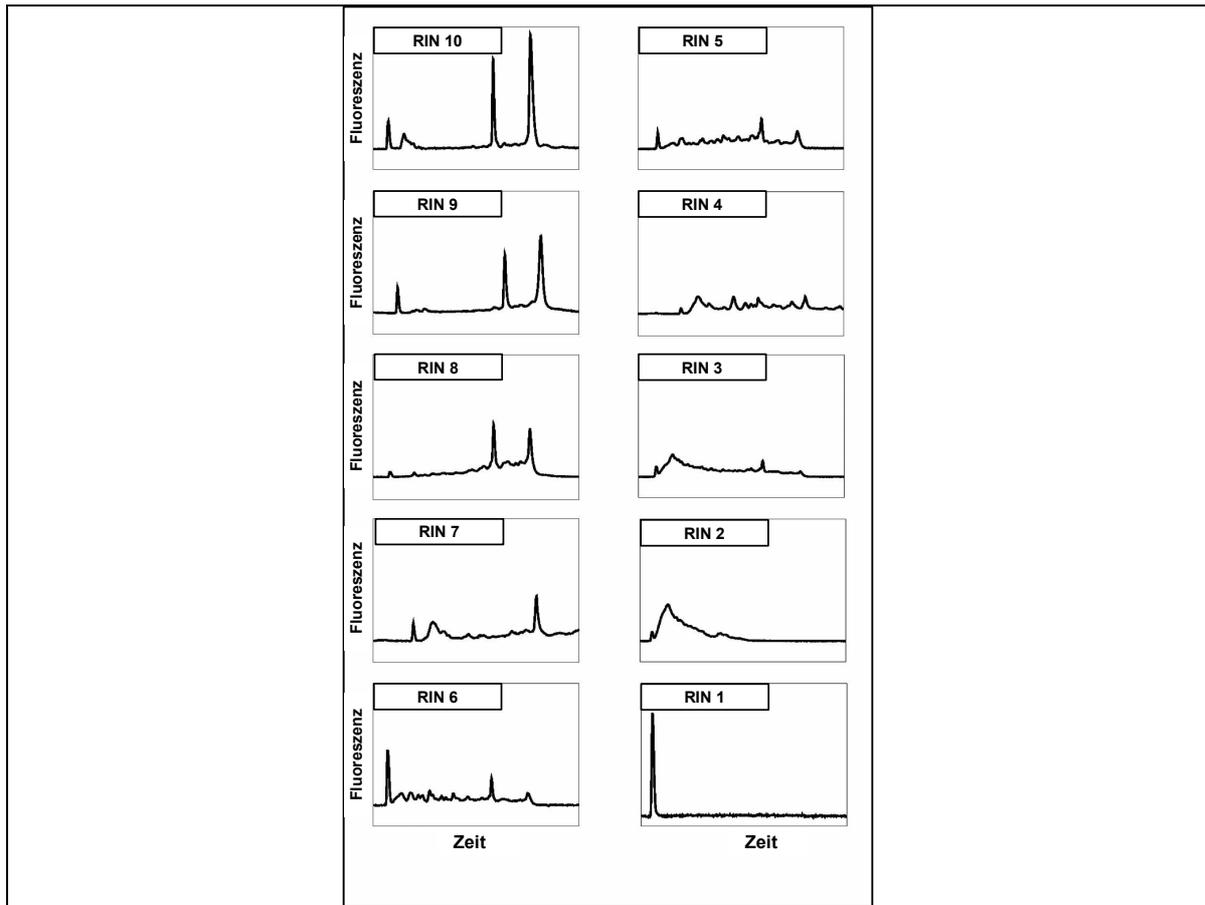


Abb. 66 Elektropherogramme, die die einzelnen RNA-integrity numbers repräsentieren. Abbildung nach SCHROEDER et al. (2006).

#### 4.7.3 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Zur Erstellung von Genexpressionsprofilen durch qPCR ist die reverse Transkription der Proben-RNA in cDNA notwendig (s. 2.5.3). Um biologisch präzise Daten zu erhalten, ist es für diesen Schritt notwendig, dass eine proportionale Abbildung der Kopienzahlen der in der Probe enthaltenen RNA-Sequenzen stattfindet (Bustin, 2002). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit ein kommerziell erhältliches System verwendet (s. 2.5.3), für welches die Proportionalität dieser Abbildung experimentell nachgewiesen war (Ginzinger, 2002).

#### 4.7.4 Referenzgen ( $\beta$ -Aktin)

Referenzgene, die auch als House-Keeping-Gene bezeichnet werden, zeigen ubiquitäre Expression und lassen sich nicht durch experimentelle Faktoren hinsichtlich ihrer Transkription beeinflussen. Sie werden als Standard bei der relativen Quantifizierung verwendet (s. 2.5.4.2). Da nicht zu erwarten ist, dass Gene existieren, die in keinsten Weise einer Regulation unterliegen, birgt jede Wahl eines Referenzgens eine Fehlergefahr. Für die vorliegende Arbeit wurde  $\beta$ -Aktin als Referenzgen gewählt, da dieses wissenschaftlich anerkannt ist (Bustin, 2000; Bustin, 2002; Bustin und Nolan, 2004). Dieses Gen ist außerdem in vielen Untersuchungen erfolgreich als Referenzgen eingesetzt worden (Kreuzer *et al.*,

1999). Weiterhin lagen keine Hinweise vor, die vermuten ließen, dass  $\beta$ -Aktin versuchsbedingten Regulationen unterliegt. Es wurde sichergestellt, dass die gemessenen  $C_T$ -Werte für  $\beta$ -Aktin in allen untersuchten Proben nicht um mehr als  $\pm 2$  vom mittleren  $C_T$ -Wert für  $\beta$ -Aktin (19,7) abweichen.

Eine endgültige Beurteilung kann jedoch erst mit Blick auf die FC-Werte von  $\beta$ -Aktin in jeder einzelnen relativen Quantifizierung gemacht werden. Dafür werden im Ergebnisteil (s. 3.8.3) die  $\beta$ -Aktin-Werte in einer Abbildung gezeigt bei der die einzelnen Punkte die jeweiligen cDNA-Proben repräsentieren. Die Werte der Testgruppen zeigen die Transkriptionsraten des Kontrollgens bezogen auf den Median der Basisgruppe. Eine Abweichung mehrerer Werte vom Median der Basisproben zeigt eine systematische Abweichung der Transkriptionsrate des Kontrollgens in der Testgruppe von der Transkriptionsrate dieses Gens in der Basisgruppe. Das bedeutet, dass entweder der Versuchsfaktor Fütterung einen Einfluss auf die Transkriptionsrate des Referenzgenes hat, oder dass ein weiterer, nicht bekannter Faktor die Transkription des Referenzgenes verändert. Eine systematische Abweichung des Referenzgenes tritt vor allem bei 6-wöchiger Konzentratfutter-Supplementierung auf. Hier kommen bei allen untersuchten Proben ausser bei der Bestimmung von vHB niedrige FC-Werte des Referenzgenes von 0,27 – 0,86 vor. 29 der 53 in die Berechnungen einfließenden FC-Werte sind unter 0,5, entsprechen also einer Abnahme der mRNA-Menge des Referenzgenes.

Bei der Bestimmung von vHB wurden andere cDNA-Proben verwendet, die eher eine Zunahme der mRNA-Kopienzahl des Referenzgenes zeigen, 3 von 4 FC-Werten liegen hier über einem Fold change von 2 (2,64 – 3,94).

Die FC-Werte für  $\beta$ -Aktin in den anderen Fütterungsgruppen, sowie auch in der Kontrollgruppe (Heufütterung) sind mit wenigen Ausnahmen in einem Bereich von 0,5 bis 2 anzutreffen. Eine größere N-Zahl in den Gruppen wäre nötig, um die gefundenen Abweichungen zu verifizieren.

Durch die systematische Abweichung des Referenzgenes in der letzten Fütterungsgruppe sind die Ergebnisse der Zielgene, die die genannte Fütterungsgruppe repräsentieren, nicht mehr eindeutig zu beurteilen. Eine Änderung der mRNA-Kopienzahl des Referenzgenes zieht als erstes bei der Berechnung des  $\delta C_T$ -Wertes eine falsche Erhöhung oder Erniedrigung des  $\delta C_T$ -Wertes mit sich. Andererseits kann der Faktor, der das Kontrollgen beeinflusst hat, auch das Zielgen beeinflussen. In diesem Fall lägen die FC-Werte des Zielgenes auch niedriger als ohne Beeinflussung. Also ist weder eine Zu- noch eine Abnahme in der relativen mRNA-Kopienzahl des Zielgenes sicher als eine solche einzuschätzen.

Da in der vorliegenden Arbeit ausschließlich  $\beta$ -Aktin als Referenzgen Verwendung fand, und bei der Bewertung der Ergebnisse Unsicherheiten auftreten, wird es für nachfolgende

Untersuchungen sinnvoll sein, objektiv gewählte Kombinationen aus mehreren Referenzgenen einzusetzen (Vandesompele *et al.*, 2002).

#### 4.7.5 Bestimmung der relativen Expression

Die relative Expressionsrate des zu untersuchenden Gens (gene of interest, GOI) wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der  $\delta\delta C_T$ -Methode zur relativen Quantifizierung (s.2.5.4) untersucht (Livak und Schmittgen, 2001). Auf eine Verwendung einer abgewandelten, um die qPCR-Effizienz korrigierten Version dieser Berechnungsmethode wurde verzichtet, da für alle eingesetzten qPCR-Untersuchungsmethoden bekannt war, dass die Effizienz über 90 % beträgt (Pfaffl, 2001).

#### 4.7.6 Veränderungen des mRNA-Levels

Bei Futterumstellung auf energiereiches, kohlenhydratreiches Futter muss die Pansenepithelzelle u.a. auf eine erhöhte Anflutung von Fettsäuren und Protonen und eine höhere Lactat- und Ketonkörperbildung reagieren. Die Vermutung lag nahe, dass die Reaktion der Zelle in einer erhöhten oder erniedrigten Genexpression bestimmter Transportproteine und Enzyme bestehen könnte, die für die pH-Regulation der Zelle, den Stoffwechsel oder den Ionen- und SCFA-Transport zuständig sind. Auf mRNA-Ebene wurde in den molekularbiologischen Experimenten für keines der untersuchten Gene eine eindeutige Zu- oder Abnahme der relativen Kopienzahl gefunden.

Es besteht im Besonderen eine Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der Ussing-Kammer-Versuche und der molekularbiologischen Versuche: Der  $\text{Na}^+$ -Transport steigt innerhalb der ersten Woche der Konzentrat-Supplementierung deutlich an (s. 3.3.1), jedoch ist keine Veränderung der relativen mRNA-Menge des  $\text{Na}^+$ -befördernden NHE3 zu beobachten (s. Abb. 38, Abb. 42). Eine weitere Möglichkeit zur erhöhten  $\text{Na}^+$ -Aufnahme in die Zelle ist eine Verringerung der NHERF1-Moleküle, doch auch hier wurde auf mRNA-Ebene keine Veränderung entdeckt (s. Abb. 40).

Diese Ergebnisse lassen unterschiedliche Schlüsse zu:

- Durch eine Verschiebung der prozentualen Anteile der unterschiedlichen Zelltypen des Pansenepithels, die bei der morphologischen Adaptation stattfindet, wird die tatsächliche Änderung auf mRNA-Ebene in bestimmten Zelltypen nicht erkannt. Das bedeutet, dass die relative mRNA-Kopienzahl gleich bleibt, während womöglich die mRNA-Kopienzahl bei bestimmten Zelltypen deutlich zu- oder abnimmt. In der vorliegenden Arbeit sollte dieser Effekt minimiert werden, indem der Bindegewebige Anteil klein gehalten wurde, da für die RNA-Gewinnung nur die Zotten abgetrennt wurden.
- Die mRNA-Kopienzahl der Transportproteine und Enzyme verändert sich nicht, sondern es treten andere Regulationsphänomene („short-term-regulation“) auf:

- Eine translationale Regulation wie für MCT oder vHATPase beschrieben (MCT: (Halestrap und Price, 1999; Jackson *et al.*, 1997; Miyamoto *et al.*, 1996), vHATPase: (Merzendorfer *et al.*, 1997; Puopolo *et al.*, 1992)).
- Eine Aktivierung und Hemmung durch Proteinkinasen (bei vHATPase, (Nanda *et al.*, 1992)).
- Eine Acetylierung/Deacetylierung eines Aminosäurerestes (bei ACS, (Starai *et al.*, 2002)).
- Einfluss anderer Enzyme/Proteine (z. B. CD 147 bei MCT1, (Enerson und Drewes, 2003; Halestrap und Price, 1999)).
- Das sogenannte *vesicle trafficking*, bei dem die fertigen Moleküle in Vesikel-Membranen vorhanden sind und bei Bedarf mit der Zellmembran fusionieren. Dieser in anderen Systemen beobachtete Prozess verursacht eine funktionelle Anpassung durch regulierte intrazelluläre Proteintranslokationsphänomene (Zachos *et al.*, 2005).
- Die Versuche betrachten nicht den richtigen Zeitpunkt. Falls die Änderungen in der mRNA-Kopienzahl nicht in einem Zeitraum von Tagen, sondern innerhalb von Stunden geschieht, ist es möglich, dass an sich auftretende Transkriptionsveränderungen nicht beobachtet werden konnten. Die mRNA der zusätzlich hergestellten Transportproteine und Enzyme könnte schon wieder abgebaut worden sein. Als Ergänzung der Untersuchung der mRNA-Kopienzahl sollte also eine Untersuchung der Proteine gemacht werden.
- Das Pansenepithel könnte in bestimmten Bereichen stärker funktionell verschieden sein, als bisher vermutet. Das würde bedeuten, dass z.B. das Epithel des ventralen Sackes für die vermehrte Na<sup>+</sup>-Aufnahme zuständig wäre und dort eine Zunahme der relativen mRNA-Menge von NHE3 stattfände, während sich in den Zellen am vorderen Pansenpfeiler die Na<sup>+</sup>-aufnehmenden Moleküle nicht in ihrer Genexpression veränderten. Eine solche Verteilung der Aufgaben ist im Pansenepithel jedoch bisher nicht bekannt.
- Die Anzahl der zusätzlichen mRNA-Moleküle ist so niedrig, dass sie mit der geringen N-Zahl der Versuche (3 Tiere) und der biologischen Streuung nicht eindeutig entdeckt werden konnte.
- Bei den untersuchten Genen mit einem Aufbau aus mehreren Untereinheiten (vH-ATPase, NaKA) wurden nicht die Untereinheiten untersucht, die in ihrer relativen mRNA-Kopienzahl deutlich gesteigert werden.
- Durch die Verwendung nur eines Referenzgens werden die C<sub>T</sub>-Werte nicht optimal normalisiert, so dass Tendenzen zu einer Änderung in der relativen mRNA-

Kopienzahl nicht erkannt werden. Es wäre nötig, mehrere Referenzgene zur Erstellung des  $\delta C_T$ -Wertes zu verwenden (s. o.).

## 4.8 Schlussfolgerungen

Bei den Untersuchungen der Adaptation des Pansenepithels im zeitlichen Verlauf durch verschiedene Versuchsmethoden (Untersuchung der Pansenflüssigkeit, des Blutes, der Regulation auf molekularer und funktioneller Ebene) wurden nach einer Umstellung des Futters von energiearm und raufaserreich auf energiereich und konzentratreich die folgenden Veränderungen entdeckt:

In der Pansenflüssigkeit der untersuchten Tiere besteht für die Parameter pH-Wert, Ammonium-Ionen-Konzentration und Turnover eine deutliche Abhängigkeit von der Fütterung, während bei den Parametern Osmolalität,  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Gehalt und Fettsäurekonzentration keine Abhängigkeit gefunden wurde (s. 3.4).

Der niedrigste pH-Wert der Pansenflüssigkeit an den untersuchten Tagen sinkt bis zum 4. Tage der Konzentrat-Supplementierung ab und steigt anschließend bis zum 42. Tag um 0,01 pH-Einheiten pro Tag an (s. Abb. 16).

Im Blut der Versuchstiere reagierten die Parameter Harnstoff (s. 4.4.3), IGF-1 (s. 3.1.2) und Glucose im Serum (s. 4.2.3) auf die Futterumstellung, während die anderen Parameter nicht durch die Änderung des Futters beeinflusst wurden.

Auf funktioneller Ebene wurde am isolierten Pansenepithel bei gleichzeitiger Messung von  $\text{Na}^+$ - und Acetat-Fluxen ein Anstieg der  $\text{Na}^+$ -Transportraten innerhalb der ersten Woche nach Futterumstellung bei tendenziell sogar abfallenden Acetat-Transportraten festgestellt (s. 3.3).

Der  $\text{Na}^+$ -Transport scheint mit der IGF-1-Konzentration im Plasma zu korrelieren (s. Abb. 61).

Auf molekularer Ebene (qPCR) konnte keine Veränderung der relativen mRNA-Kopienzahl bei den untersuchten Genen (NHE1, NHE3, NHERF1, MCT1, AE2, Na-K-ATPase, vH-ATPase, CA1, CA2, ACS2) aufgefunden werden (s. 3.8.3).

Es besteht im Besonderen eine Diskrepanz zwischen der deutlichen Steigerung der  $\text{Na}^+$ -Transportraten innerhalb der ersten Woche und dem Ausbleiben einer Änderung in der relativen mRNA-Kopienzahl der Gene NHE3 und NHERF1. Es ist anzunehmen, dass dennoch eine Steigerung der Aktivität des NHE3, oder die vermehrte Integration des

Transportproteines in die Zellmembran durch gesteigerte Produktion bzw. Fusion durch vesicle trafficking, erfolgt. Unter Umständen ist der IGF-1 selbst an der Aktivitätssteigerung des NHE3 beteiligt.

Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit sind die  $\text{Na}^+$ -Transportraten, zumindest von den untersuchten Parametern am Pansenepithel selbst, die einzige Größe, die schnell auf die nachgewiesenermaßen veränderten luminalen Bedingungen wie pH-Wert und  $\text{NH}_4^+$ -Konzentration reagiert. Die morphologische Änderung des Epithels dauert wesentlich länger (ca. 4-6 Wochen; (Dirksen *et al.*, 1992b)) aber die Einzelzelle reagiert schon innerhalb einer Woche: Sie schützt sich mit der erhöhten Aktivität des NHE3 vor Übersäuerung durch die luminal Abgabe von Protonen, wodurch gleichzeitig die Aufnahme von Natrium erhöht wird. Die schnelle Adaptation des NHE ist als erster protektiver Mechanismus bei erhöhter Fermentation anzusehen. Die Möglichkeit der vermehrten SCFA -Absorption (= Senkung des pH-Wertes) erfordert Wochen und ist offensichtlich abhängig von der Zunahme der Absorptionsfläche.