

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Tiere

##### 3.1.1 Tiergesundheit

Alle Versuchstiere befanden sich für die Dauer der Versuche in einem klinisch gesunden Zustand. Um diese Aussage über die Grenzen der diagnostischen Möglichkeiten, wie Kontrolle der Futteraufnahme, des Verhaltens, des Kot- und Harnabsatzes hinaus zu objektivieren, wurden von allen Tieren Blutproben genommen und auf eine Reihe von Parametern untersucht. Bei den Tieren für die Ussing-Kammer-Versuche (s. 2.2.1) wurde zum Zeitpunkt der Heufütterung in der Gruppe und am Tag vor der Schlachtung Blut entnommen. Die Blutuntersuchung der Tiere für die Untersuchung der Pansenflüssigkeit (s. 2.2.2) fand zunächst in der Heufütterungsperiode in Einzelaufstallung, ferner am 4. Tag der KF, am 7. Tag der KF und im Folgenden im wöchentlichen Abstand statt.

Es erfolgte eine Untersuchung folgender Parameter:

- Leukozyten, Gesamteiweiß, Leukozytendifferenzierung
- ASAT (GOT), GLDH, Bilirubin, Kreatinin, Harnstoff
- Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, Erythrozytenindices, Thrombozyten
- Kalium, Natrium, Chlorid
- Glucose im Serum

Die Werte der insgesamt 27 Tiere sind im Anhang in Tab. 10 zusammengefasst dargestellt. Dabei wurden die in der Literatur beschriebenen physiologischen Werte für verschiedene Parameter über- bzw. unterschritten. Eine Überschreitung oder Unterschreitung der Werte wird nur dann erwähnt, wenn mehr als ein Drittel der Werte über oder unter den Normwerten (physiologische Werte sind dem folgenden Buch entnommen: (Kraft und Dürr, 1999)) liegen. Bei Heufütterung trat eine Überschreitung der Normwerte bei Glucose im Serum, ASAT, Kalium, MCHC, Anzahl der stabkernigen neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten auf. Eine Unterschreitung der physiologischen Werte fand bei Harnstoff, MCV, MCH und geringfügig bei der Anzahl der Monozyten statt.

Bei Krafftutter-Fütterung (KF) liegen sämtliche Werte für Glucose oberhalb der physiologischen Grenze, die ASAT-Werte sind bis auf einen Wert und die GLDH-Werte zu 60% erhöht. Weitere Überschreitungen kommen bei Harnstoff, Kalium, Chlorid, MCHC (100%), stabkernigen neutrophilen Granulozyten und Anzahl der Lymphozyten vor. Für Harnstoff, Hämatokrit und Monozyten sind bei KF Unterschreitungen zu mehr als einem Drittel der Werte erkennbar.

Tab. 10 Ergebnisse der Blutuntersuchung.

	Einheit	Normwerte		Heufütterung					Krafftutterfütterung						
		min	max	N <sub>ges</sub>	N <	N >	min	max	MW	N <sub>ges</sub>	N <	N >	min	max	MW
<b>Glucose i. S.</b>	<i>mmol/l</i>	<b>2,2</b>	<b>3,3</b>	30	0	22	2,61	5,33	3,66	59	0	59	3,44	5,5	4,12
<b>ASAT (GOT)</b>	<i>ukat/l</i>	<	<b>1,25</b>	30	0	29	1,22	5,81	2,05	59	0	58	1,06	3,21	1,79
<b>GLDH</b>	<i>nkat/l</i>	<	<b>108</b>	30	0	7	0,05	1146	104	59	0	40	0,06	1064	230
<b>Bilirubin</b>	<i>umol/l</i>	<	<b>6,8</b>	30	0	0	1,54	2,39	1,91	59	0	0	0,86	2,39	1,67
<b>Kreatinin</b>	<i>umol/l</i>	<b>53</b>	<b>124</b>	30	1	1	49,6	127,4	95,95	59	1	0	10,8	110,6	62,05
<b>Harnstoff</b>	<i>mmol/l</i>	<b>3,3</b>	<b>5</b>	30	30	0	1,16	2,66	1,87	59	21	38	1,66	8,8	3,90
<b>Gesamteiweiß</b>	<i>g/l</i>	<b>55</b>	<b>75</b>	30	0	2	55,5	77,9	5,2	59	0	1	60	77,2	4,6
<b>Kalium</b>	<i>mmol/l</i>	<b>3,5</b>	<b>4,5</b>	30	0	29	4,4	5,8	147,0	59	0	31	4	5,5	147,8
<b>Natrium</b>	<i>mmol/l</i>	<b>140</b>	<b>160</b>	30	0	0	144	151	102,1	59	0	0	143	158	105,2
<b>Chlorid</b>	<i>mmol/l</i>	<b>100</b>	<b>106</b>	30	7	5	94	109	67,5	59	2	21	98	114	67,0
<b>Leukozyten</b>	<i>1000/ul</i>	<b>5</b>	<b>12</b>	30	2	1	4	12,2	8,6	59	3	6	4,1	15,7	8,1
<b>Erythrozyten</b>	<i>mill/ul</i>	<b>6,5</b>	<b>11,3</b>	30	0	7	8,92	13,6	10,7	59	1	9	6,31	12,5	9,9
<b>Hämoglobin</b>	<i>g/dl</i>	<b>8,7</b>	<b>12,8</b>	30	0	3	8,8	14,2	11,4	59	5	3	8,1	13,8	10,6
<b>Hämatokrit</b>	<i>%</i>	<b>30</b>	<b>38</b>	30	9	2	24,3	38,5	32,0	59	36	1	18,0	38,7	29,2
<b>MCV</b>	<i>fl</i>	<b>34</b>	<b>46</b>	30	30	0	26	33	29,8	59	59	0	26,7	32	29,4
<b>MCH</b>	<i>pg</i>	<b>13</b>	<b>14</b>	30	30	0	9,5	12	10,6	59	0	1	9,58	13,3	10,7
<b>MCHC</b>	<i>g/dl</i>	<b>29</b>	<b>34</b>	30	0	29	33,6	37,6	35,6	59	0	59	34,2	46,5	36,2
<b>Thrombozyten</b>	<i>1000/ul</i>	<b>280</b>	<b>650</b>	30	6	3	128	740	431	59	7	17	60	1256	505
<b>Segmentk. neutrophile Gr.</b>	<i>%</i>	<b>20</b>	<b>45</b>	30	7	0	8	35	23	59	9	0	15	45	26
<b>Stabkernige neutrophile Gr.</b>	<i>%</i>	<b>0</b>	<b>2</b>	30	0	13	0	6	3	59	0	20	0	14	2
<b>Eosinophile Granulozyten</b>	<i>%</i>	<b>1</b>	<b>10</b>	30	4	2	0	19	4	59	6	12	0	20	6
<b>Basophile Granulozyten</b>	<i>%</i>	<b>0</b>	<b>3</b>	30	0	0	0	0	0	59	0	0	0	2	0
<b>Lymphozyten</b>	<i>%</i>	<b>40</b>	<b>65</b>	30	0	19	42	85	68	59	0	28	42	78	63
<b>Monozyten</b>	<i>%</i>	<b>2</b>	<b>6</b>	30	11	1	0	8	2	59	20	2	0	9	2

N<sub>ges</sub> = Anzahl der Blutproben pro Fütterungsgruppe insgesamt, min = minimaler Wert, max = maximaler Wert, N < = Anzahl der Werte unter dem minimalen Normalwert, N > = Anzahl der Werte über dem maximalen Normalwert, MW = Mittelwert.

Eine Steigerung des Harnstoffgehaltes im Blut im Laufe der Futterumstellung war zu erwarten. Die größte Steigerung fand innerhalb der ersten Woche nach Krafftuttergabe statt. Ab dem 4. Tag der Krafftutter-Supplementierung ist eine signifikante Erhöhung des Harnstoffgehaltes im Serum gegenüber den Werten bei Heu-Fütterung zu erkennen ( $P < 0,005$ ). Abb. 2 zeigt den Verlauf in Abhängigkeit von der Fütterung.

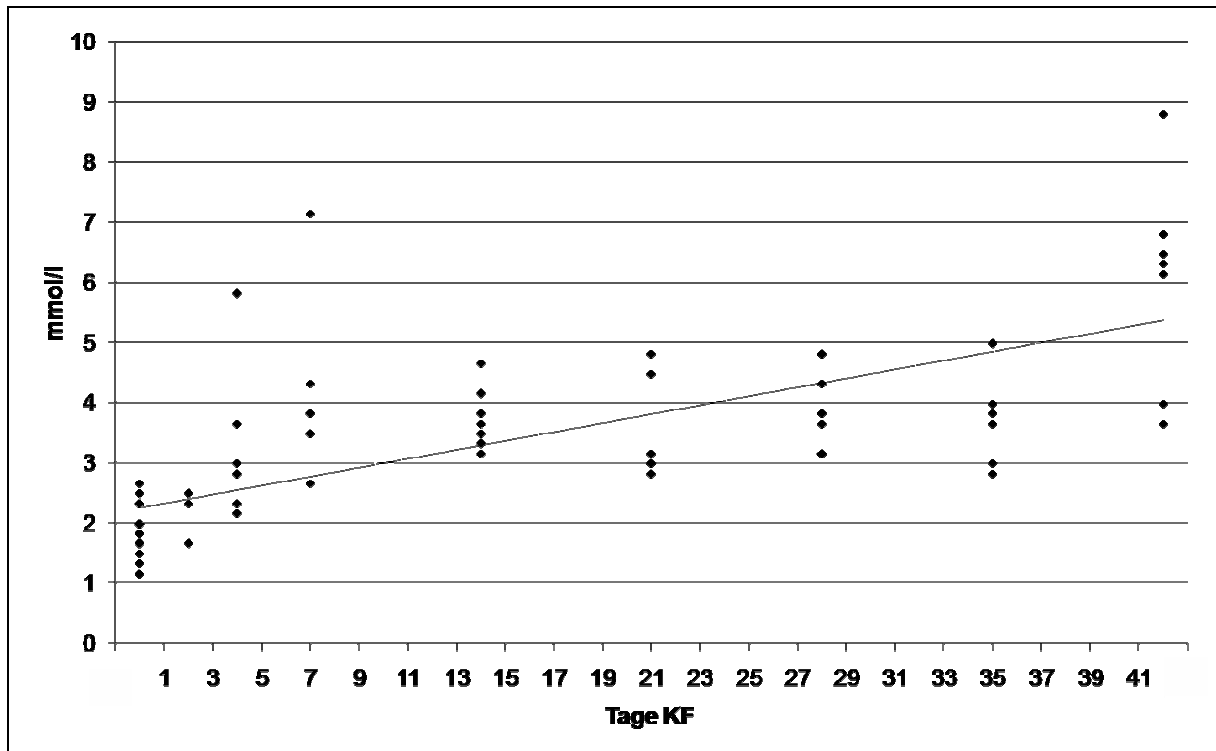


Abb. 2 Harnstoffgehalte im Blut der Einzeltiere. Die Regression folgt der Gleichung  $y = 0,74x + 2,251$ ,  $R^2 = 0,516$ .

### 3.1.2 IGF-1 Spiegel im Serum

Für die IGF-1-Bestimmung wurden von den 6 Tieren im Pansenflüssigkeitsversuch zunächst in der Heufütterungsperiode in Einzelaufstallung, und zusätzlich am 4. Tag der KF, am 7. Tag der KF und im Folgenden im wöchentlichen Abstand bis zur 6. Woche Serum gewonnen. Die IGF-1-Konzentration im Blut der Tiere wurde mit einem ELISA-Test bestimmt. Ein ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ist ein standardisierter Reaktionsablauf zum Nachweis eines bestimmten Stoffes (Antigen) in einer flüssigen Phase durch die Bindung eines Antikörpers. Antikörper oder Antigen werden zuvor mit einem Enzym markiert. Die durch das Enzym katalysierte Reaktion dient als Nachweis für das Vorhandensein des Antigens. Aus den Untersuchungen wird ersichtlich, dass die IGF-1-Konzentration bei den meisten Tieren im Verlauf des Versuchs tendenziell ansteigt (siehe Abb. 3, Abb. 4). Dabei ist die mittlere Differenz der Werte ( $n = 6$ ) an den Tagen 28 und 35 der Krafftutter-Supplementierung gegenüber der Kontrollgruppe auf der Stufe 0,05 signifikant.

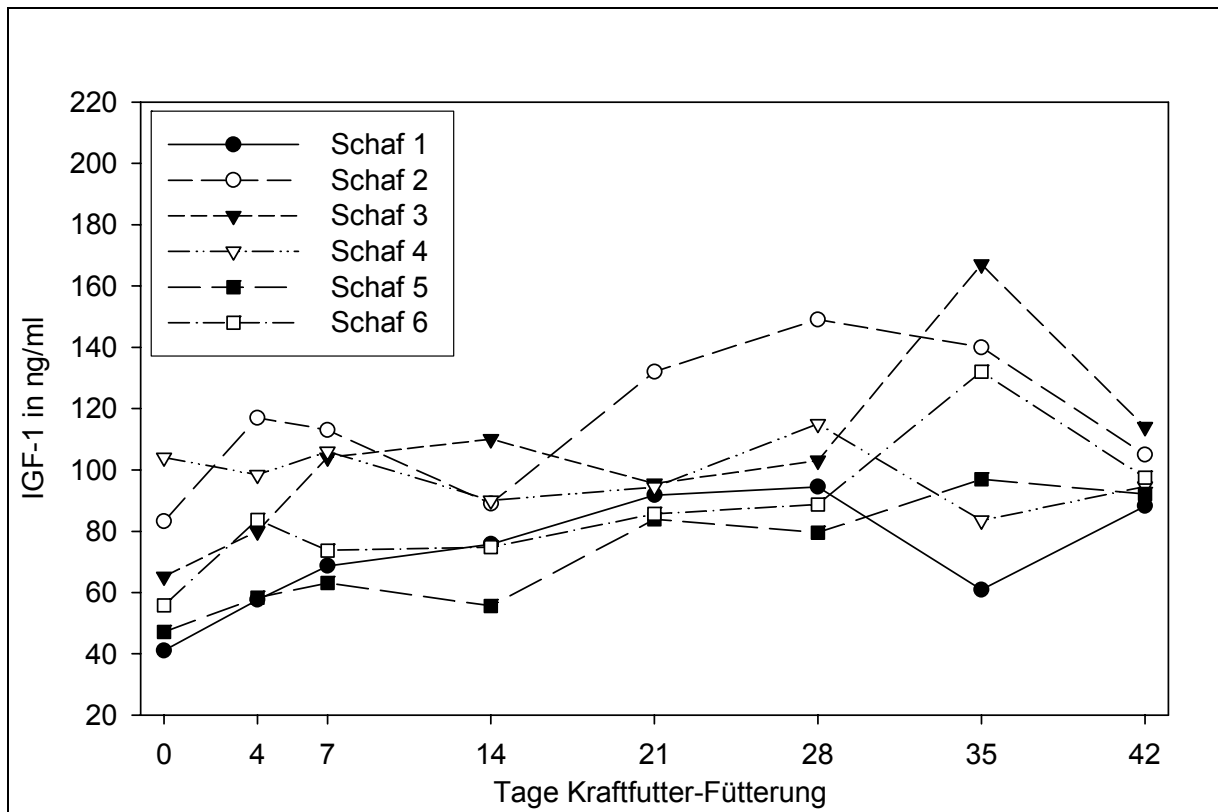


Abb. 3 IGF-1-Einzelwerte im Serum von 6 Tieren in Abhängigkeit von der Fütterung.

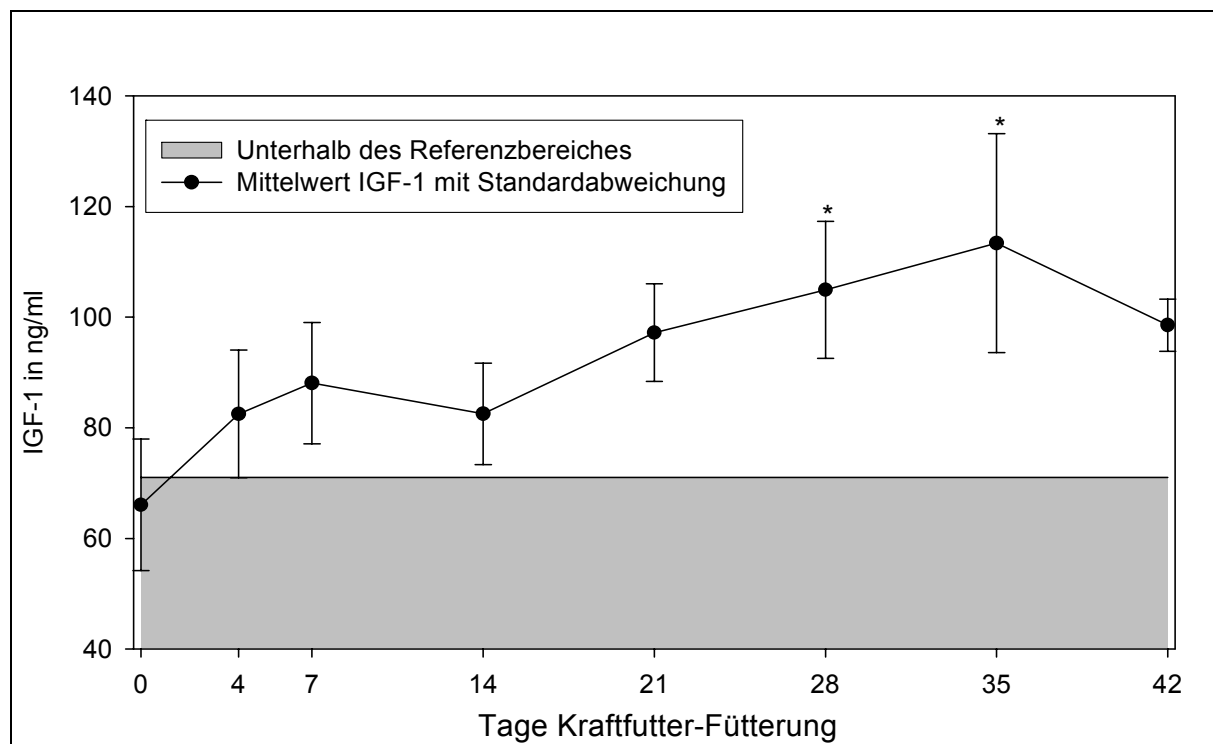


Abb. 4 Mittelwerte der IGF-1-Konzentration im Serum; \* = P < 0,05 gegenüber der Kontrollgruppe (0 Tage Kraffutter-Fütterung)

### 3.1.3 Fütterung

Nachdem die Tiere über mindestens 8 Wochen an energiearme Fütterung gewöhnt wurden (s. 2.2) und etwa 1-1,5 kg Heu pro Tier und Tag aufnahmen, erfolgte bei Einzelaufstallung eine genaue Kontrolle der Heuaufnahme und später der Konzentratfutteraufnahme durch Zurückwiegen der ungefressenen Anteile. Die Tiere bekamen in Einzelhaltung zunächst 2 Wochen Heu (1,5 kg) vorgelegt. Anschließend wurden 1 kg Heu und zusätzlich Konzentratfutter verfüttert, dabei stieg die Konzentratfuttermenge innerhalb der ersten 4 Tage an (1. Tag 200 g, 2. Tag 400 g, 3. Tag 600g, 4. Tag 780 g) und blieb dann ab dem vierten Tag bis zum 42. Tag gleich (780 g). Diese Menge wurde auf zwei Portionen verteilt, die den Schafen jeweils morgens (7:00 Uhr) und nachmittags (14:30) gegeben wurden. Wie in Abb. 6 und Abb. 5 zu erkennen, blieb kaum Futter in den Trögen und Raufen der Tiere übrig.

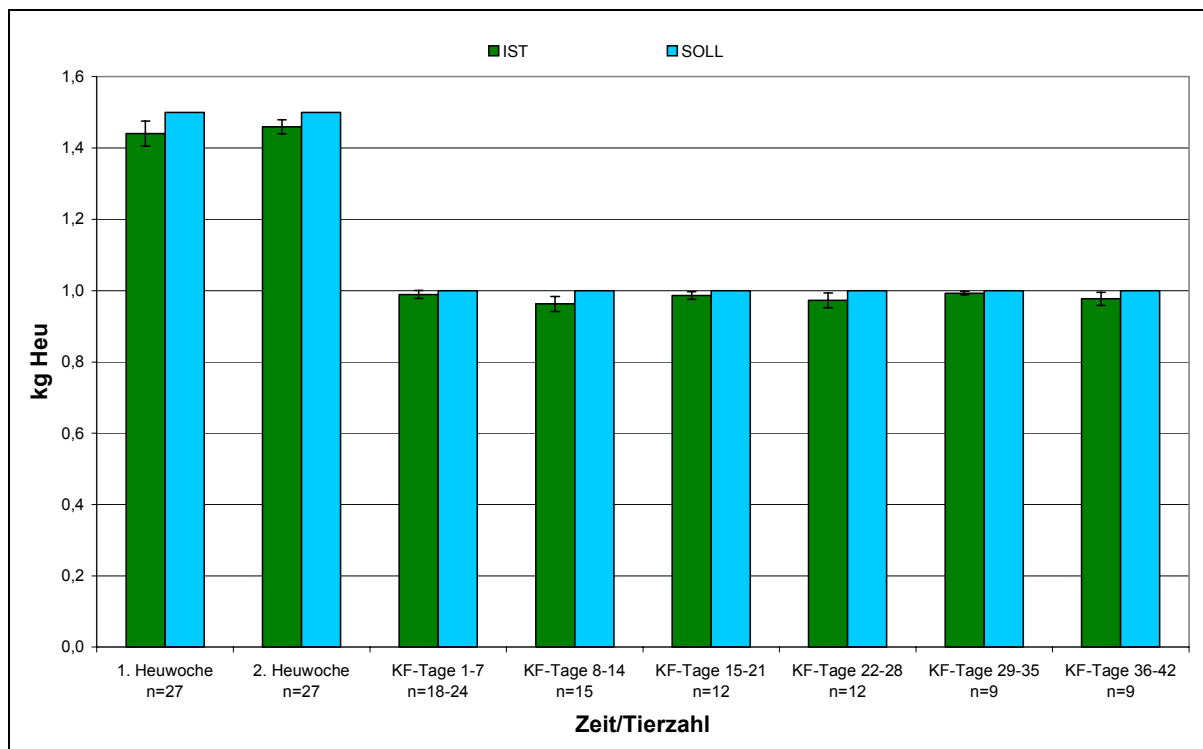


Abb. 5 Heuaufnahme. Die Werte sind als gepaarte Säulen dargestellt, wobei die linke Säule den tatsächlichen, gemessenen Wert (Ist-Wert) und die rechte Säule den Soll-Wert repräsentiert. Die Säulen der Ist-Werte sind mit der entsprechenden Standardabweichung versehen. Die Angabe (n) unter den jeweiligen Tagen der KF steht für die Tierzahl, bei der die Werte in dieser Zeit erhoben wurden. Da die Tiere nach Ablauf der KF gruppenweise geschlachtet wurden (siehe 2.2), nimmt die Tierzahl entsprechend ab.

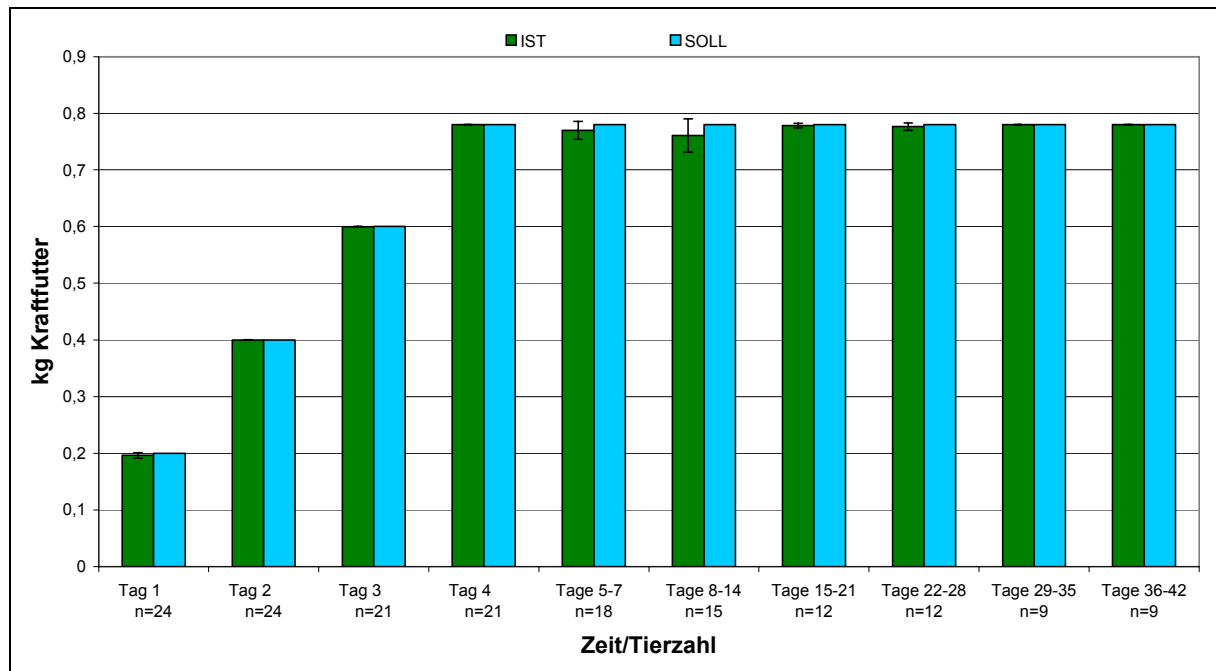


Abb. 6 Aufnahme des Kraffutters. Die Werte sind als gepaarte Säulen dargestellt, wobei die linke Säule den tatsächlichen, gemessenen Wert (Ist-Wert) und die rechte Säule den Soll-Wert repräsentiert. Die Säulen der Ist-Werte sind mit der entsprechenden Standardabweichung versehen. Während die ersten vier Tage der KF durch je eine gepaarte Säule dargestellt sind, werden die Tage 5-7, die Tage 8-14, die Tage 15-21, die Tage 22-28, die Tage 29-35 und die Tage 36-42 durch je ein Säulen-Paar repräsentiert. Die Angabe unter den jeweiligen Tagen der KF steht für die Tierzahl, bei der die Werte in dieser Zeit erhoben wurden. Da die Tiere nach Ablauf der KF gruppenweise geschlachtet wurden (s. 2.2.1), nimmt die Tierzahl auf Dauer ab.

Durch die Zugabe von Konzentratfütterung war es möglich, den Energiegehalt des täglich aufgenommenen Futters von 13,02 MJ ME während der Heufütterung in Einzelhaltung auf 17,42 MJ ME während der Konzentratfütterung zu steigern (s. Abb. 7). Aufgrund des „Anfütterns“ (langsame Steigerung der Kraffutterzugabe von 200 g/d (1. Tag) auf 780 g/d (4.-42. Tag)) wurde die Aufnahme dieser Energiemenge jedoch erst nach 4 Tagen KF erreicht. So wurde gewährleistet, dass die Tiere das Kraffutter im vollen Umfang aufnahmen.

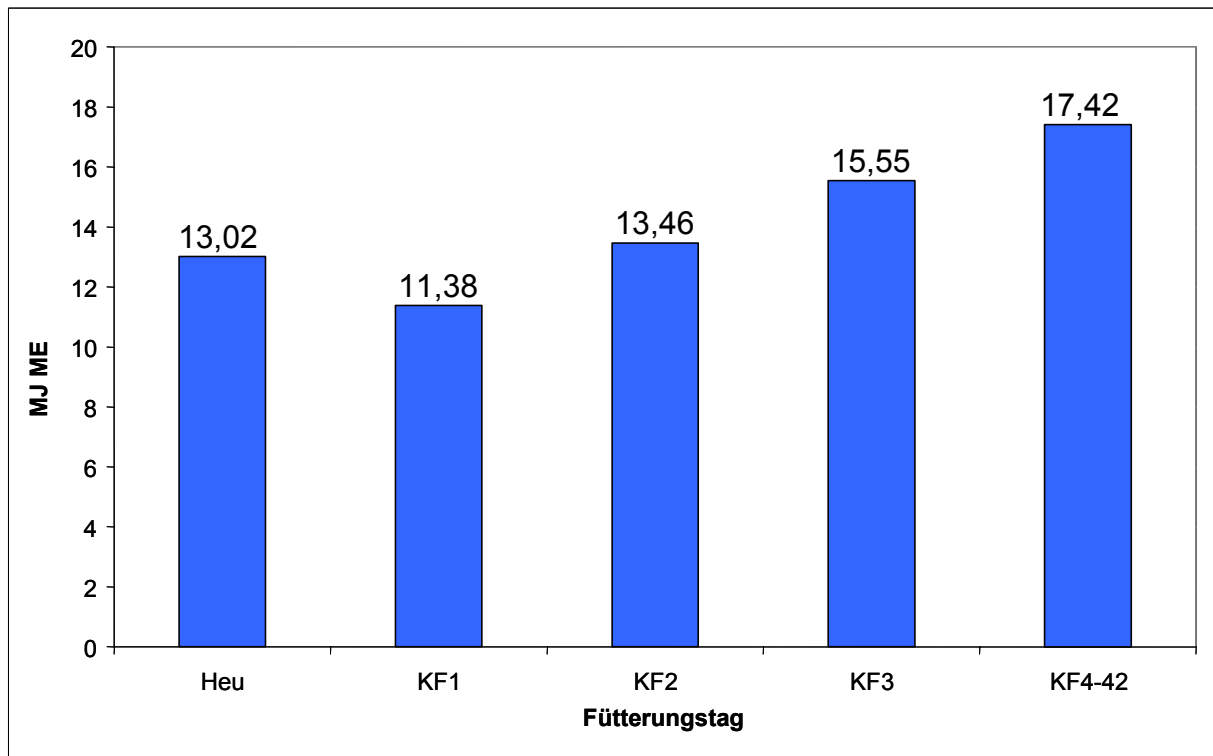


Abb. 7 Steigerung der Energiemenge in den ersten vier Tagen der KF (Kraffutter-Fütterung). Vom 4. – 42. Tag der KF war die aufgenommene Energiemenge praktisch konstant (s. auch Abb. 5 und Abb. 6)

### 3.2 Zellmodell

Die folgende Abbildung zeigt ein vereinfachtes Bild von der Pansenepithelzelle<sup>3</sup> mit den wesentlichen Transportprozessen und biochemischen Reaktionen an der apikalen und basolateralen Membran und im Zytosol.

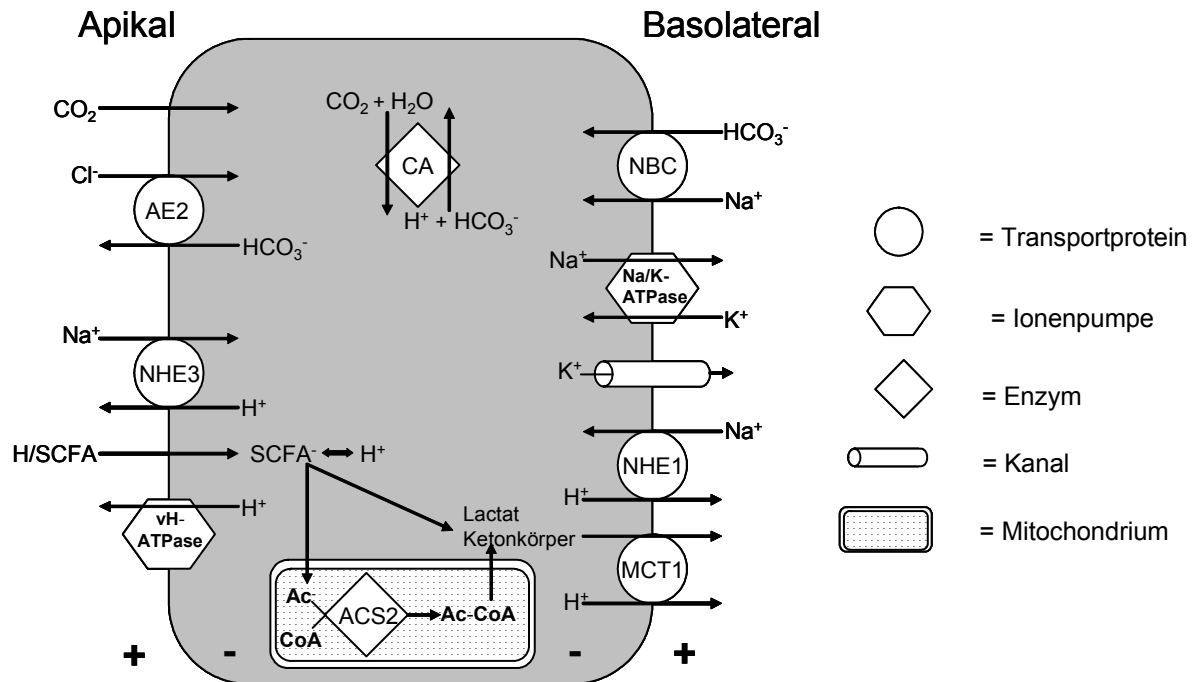


Abb. 8 Zellmodell des Pansenepithels mit den wichtigsten Carriern, Enzymen und Ionenpumpen. AE2 = Anionen-Austauscher 2; NHE1 und 3 = Natrium-Protonenaustauscher 1 und 3; vHATPase = vakuoläre Protonen-ATPase; ACS2 = Acetyl-CoA-Synthetase 2; CA = Carboanhydrase; NBC = Natrium-Bicarbonat-Cotransporter; Na/K-ATPase = Natrium-Kalium-ATPase; MCT1 = Monocarboxylat-Transporter 1; SCFA = short-chain fatty acids.

### 3.3 Ergebnisse der Ussing-Kammer-Versuche

#### 3.3.1 Transportraten für Natrium

Der Transport der Natriumionen (Natrium-Fluxrate) von serosal nach mucosal bleibt bei einem Gesamtmittelwert von 1,68  $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$  für alle Fütterungsgruppen gleich, wobei der niedrigste Wert mit 1,64  $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$  (Gruppe 3; 4 Tage Kraffutterfütterung (KF)) nur 4 Hundertstel darunter und der höchste Wert bei 1,85  $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$  (Gruppe 6; 28 Tage KF) liegt.

<sup>3</sup> Das Schema mit den Transportmechanismen vereinfacht das mehrschichtige Pansenepithel. Transportphysiologisch ist aber die Annahme eines intrazellulären Kompartments der verschiedenen Zellchichten gerechtfertigt, weil diese Schichten durch zahlreiche „gap junctions“ verbunden sind, die die Diffusion der Ionen von der luminalen zur basolateralen Seite des Epithels erlauben.



Dagegen ist der Natriumtransport von mucosal nach serosal schon nach 4 Tagen KF (Gruppe 3;  $5,35 \mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$ ) gegenüber der Kontrollgruppe mit Heufütterung (Gruppe 1;  $3,89 \mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$ ) erhöht. Die Fluxrate steigt zum 7. Tag KF (Gruppe 4) noch weiter an und erreicht bei Gruppe 6 (28 Tage KF) einen Maximalwert ( $6,15 \mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$ ).

Der Nettotransport wird mit Hilfe der Paarung von Epithelien rechnerisch ermittelt (s. 2.4.3.1, Gleichung 3). Er hat seinen niedrigsten Wert bei der Kontrollgruppe mit  $2,17 \mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$  und seinen höchsten Wert bei Gruppe 7 (42 Tage KF). Der Großteil der Erhöhung findet innerhalb der ersten Woche (bis Gruppe 4) statt.

Tab. 11 gibt einen Überblick über die ermittelten Fluxraten für Natrium.

Tab. 11 Natrium-Transport-Raten Heu-gefütterter Schafe (Gruppe 1) und Konzentrat gefütterter Schafe (Gruppe 2-7, zusätzlich zum Heu). \*P < 0,01 in Bezug auf die Epithelienanzahl.

Gruppe	Tierzahl	Epithelienzahl	$J_{ms} \text{ Na}$	$J_{sm} \text{ Na}$	$J_{net} \text{ Na}$
1	3	29	$3,89 \pm 0,11$	$1,72 \pm 0,04$	$2,17 \pm 0,12$
2	3	30	$4,13^* \pm 0,10$	$1,33 \pm 0,05$	$2,79^* \pm 0,09$
3	3	29	$5,35^* \pm 0,09$	$1,64 \pm 0,05$	$3,71^* \pm 0,08$
4	3	30	$5,84^* \pm 0,12$	$1,80 \pm 0,05$	$4,04^* \pm 0,10$
5	3	30	$5,24^* \pm 0,13$	$1,65 \pm 0,04$	$3,59^* \pm 0,12$
6	3	28	$6,15^* \pm 0,18$	$1,85 \pm 0,05$	$4,30^* \pm 0,17$
7	4	38	$6,13^* \pm 0,17$	$1,77 \pm 0,07$	$4,36^* \pm 0,15$

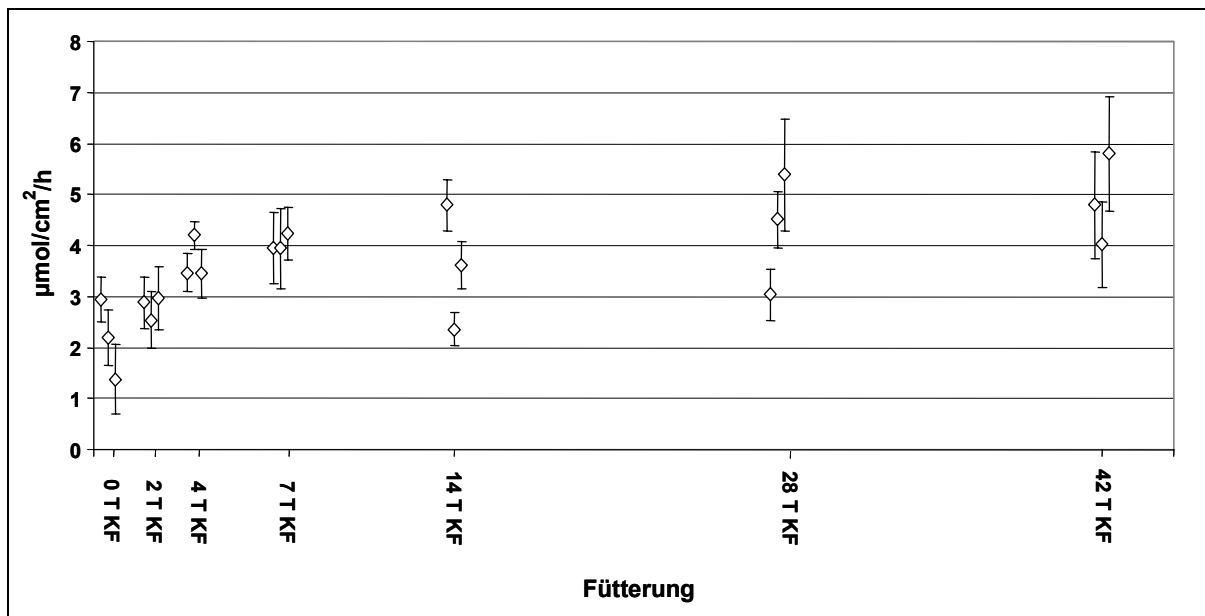


Abb. 9 Natrium-Netto-Fluxe in den 7 Fütterungsgruppen mit jeweils 3 Tieren. Die Werte sind für jedes einzelne Tier als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt.

### 3.3.2 Transportraten für Acetat

Bei den Ionenbewegungen für Acetat (Fluxrate) muss beachtet werden, dass nur die Bewegung von mucosal nach serosal ( $J_{ms}$ ) eine Rolle spielt, da im Tier auf der Blutseite (serosal) nur sehr geringe Mengen an Acetat vorhanden sind und daher eine Bewegung von serosal nach mucosal im Organismus ausgeschlossen werden kann.

Im Gegensatz zu den Transportraten für Natrium erhöht sich der Acetat-Flux von mucosal nach serosal ( $J_{ms}$  Acetat) im Laufe der Zeit nicht, sondern es ist eher ein gegenteiliger Effekt zu beobachten.  $J_{ms}$  Acetat beträgt bei Heufütterung  $2,26 \mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$ , sinkt bis zum 7. Tag der KF auf  $1,67 \mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$  ab, steigt anschließend wieder an und erreicht zur 6. Woche wieder einen Wert von  $2,11 \mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$ . Der Gesamtmittelwert beträgt  $1,95 \mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$ .

Die Gesamtdaten des Acetat-Transportes sind in Tab. 12 zusammengestellt.

Tab. 12 Acetat-Transport-Raten Heu-gefütterter Schafe (Gruppe 1) und Konzentrat-gefütterter Schafe (Gruppe 2-7, zusätzlich zum Heu). \*P < 0,01 in Bezug auf die Epithelienanzahl.

Gruppe	Tierzahl	Epithelien- zahl	$J_{ms}$ Ac	$J_{sm}$ Ac	$J_{net}$ Ac
1	3	29	$2,26 \pm 0,04$	$3,20 \pm 0,06$	$-0,95 \pm 0,06$
2	3	30	$2,02^* \pm 0,04$	$3,11 \pm 0,04$	$-1,09 \pm 0,05$
3	3	29	$1,77^* \pm 0,05$	$2,88 \pm 0,05$	$-1,10 \pm 0,06$
4	3	30	$1,67^* \pm 0,03$	$2,66 \pm 0,06$	$-0,99 \pm 0,06$
5	3	30	$1,88^* \pm 0,03$	$3,07 \pm 0,04$	$-1,18 \pm 0,05$
6	3	28	$2,00^* \pm 0,04$	$3,05 \pm 0,06$	$-1,05 \pm 0,06$
7	4	38	$2,11 \pm 0,03$	$3,14 \pm 0,05$	$-1,03 \pm 0,05$

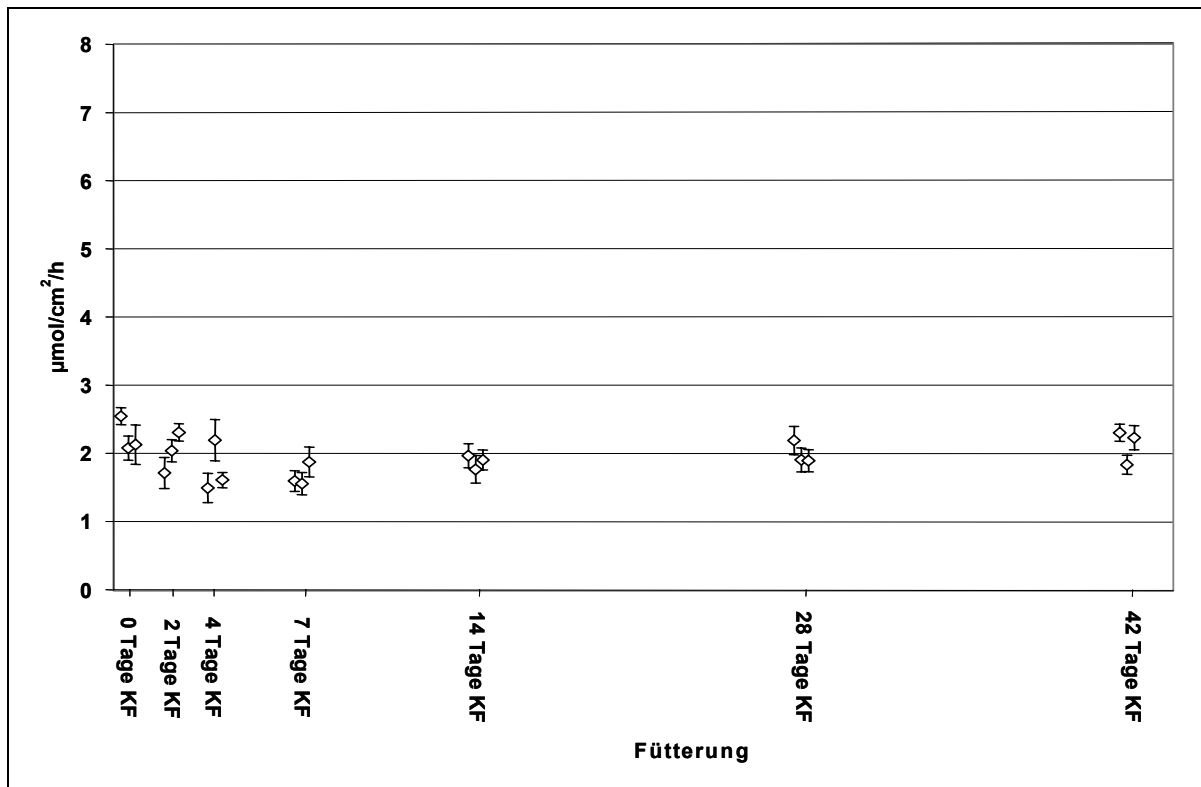


Abb. 10  $J_{ms}$  für Acetat in den 7 Fütterungsgruppen mit je 3 Tieren. Die Werte für die Einzeltiere sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt.

Der Unterschied im  $J_{ms}$  zwischen Natrium und Acetat wird in einer graphischen Darstellung (siehe Abb. 11) gezeigt. Während  $J_{ms}$  Acetat bei einem Wert um  $2 \mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$  bleibt, ist eine deutliche Steigerung des  $J_{ms}$  Natrium innerhalb der ersten 7 Tage KF zu erkennen.

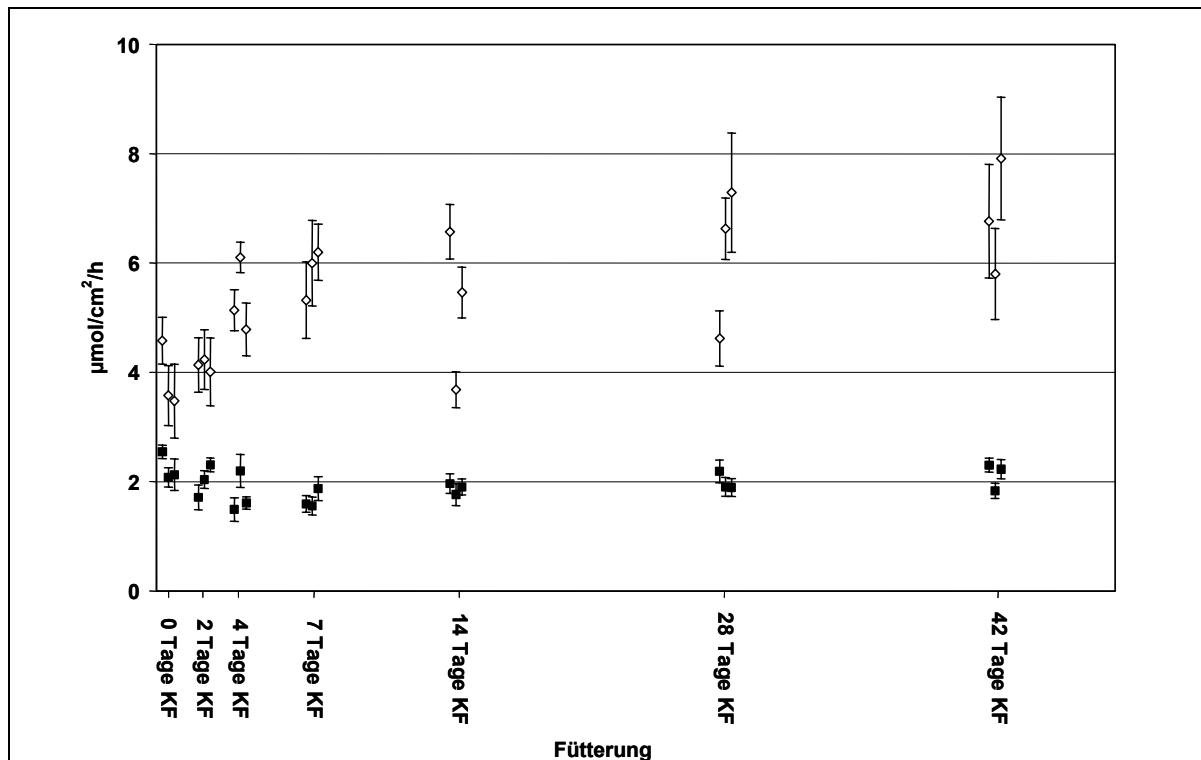


Abb. 11  $J_{ms}$  für Natrium und Acetat. Die Rauten entsprechen Natrium-Fluxen, die schwarzen Quadrate Acetat-Fluxen. Die Werte für jedes einzelne Tier sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt.

### 3.3.3 Elektrophysiologische Parameter

Bei den im Rahmen der Versuche in der Ussing-Kammer gemessenen elektrophysiologischen Parametern (s. 2.4.2) ergibt sich kein erkennbarer Unterschied zwischen den Fütterungsgruppen. Abb. 12 zeigt die Werte der Leitfähigkeit und des Kurzschlussstroms für die zur Bestimmung der Transportraten von Natrium und Acetat untersuchten Epithelien.

Tab. 13 Werte für Leitfähigkeit und Kurzschlussstrom aller Epithelien. Gruppe 1 erhielt nur Heu, während die Heufütterung bei Gruppe 2 – Gruppe 7 für 2, 4, 7, 14, 28 oder 42 Tage mit Konzentratfutter supplementiert wurde.

Gruppe	Tierzahl	Epithelienzahl	Leitfähigkeit $G_T$	Kurzschlussstrom $I_{sc}$
1	3	29	$2,74 \pm 0,41$	$0,87 \pm 0,08$
2	3	30	$2,41 \pm 0,23$	$0,85 \pm 0,13$
3	3	29	$2,62 \pm 0,26$	$1,14 \pm 0,10$
4	3	30	$2,74 \pm 0,31$	$1,32 \pm 0,11$
5	3	30	$2,78 \pm 0,24$	$1,16 \pm 0,19$
6	3	28	$2,71 \pm 0,42$	$1,42 \pm 0,21$
7	4	38	$3,02 \pm 0,38$	$1,17 \pm 0,19$

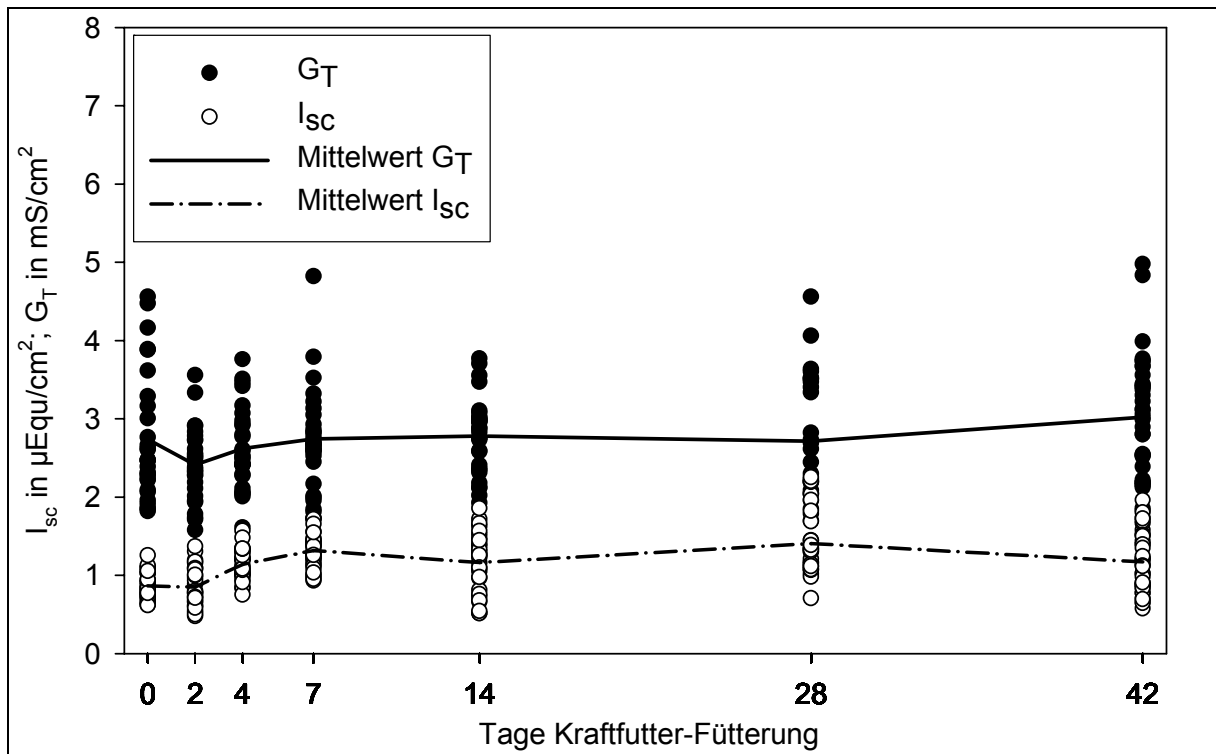


Abb. 12 Leitfähigkeit und Kurzschlussstrom für alle 7 Fütterungsgruppen (Heu = 0; 2, 4, 7, 14, 28, 42 Tage Kraftfutterfütterung). Die weißen (ungefüllten) Punkte stellen die Werte für den Kurzschlussstrom, die schwarzen (gefüllten) Punkte die Werte für die Gewebeleitfähigkeit dar. Die schwarze Linie repräsentiert den Mittelwert der  $G_T$ , die teilweise gestrichelte Linie den Mittelwert des  $I_{sc}$ .

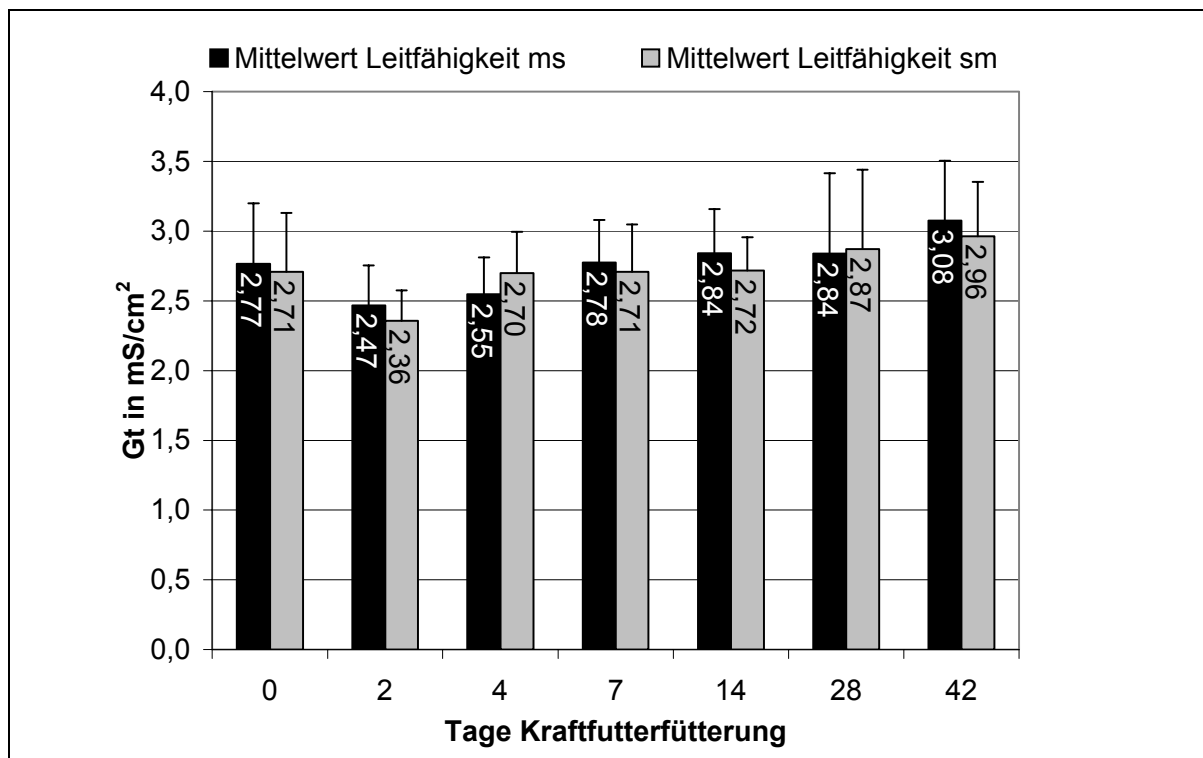


Abb. 13 Gepaarte Leitfähigkeitswerte insgesamt pro Fütterungsgruppe (0 = Heufütterung; 2, 4, 7, 14, 28, 42 Tage Konzentratfütterung).

Für die Ermittlung des Nettofluxes wurden die Epithelien gepaart. Die Auswahl erfolgte anhand der  $G_T$ -Werte (s. 2.4.2).

In Abb. 13 sind die Mittelwerte der  $G_T$  pro Fütterungsgruppe von mucosal nach serosal (ms) und von serosal nach mucosal (sm) als Säulenpaare dargestellt. Der Fehlerindikator zeigt die Standardabweichung an. Die Differenz zwischen den einzelnen Säulenpaaren liegt unter 0,15 mS.

### **3.4 Ergebnisse der Pansenflüssigkeitsuntersuchung**

6 Schafe wurden mit einer Pansenfistel ausgestattet, die es ermöglichte, zu jeder Zeit Pansenflüssigkeit zu entnehmen. Die Pansenflüssigkeit der 6 Tiere wurde zu den Zeitpunkten untersucht, an denen bei 21 Schafen Ussing-Kammer-Versuche durchgeführt wurden (siehe 3.3), d.h. bei Heufütterung (14. Tag der Einzelhaltung) und bei Krafffutterzugabe am Tag 2, 4, 7, 14, 28 und 42. An diesen Tagen wurde 1 Stunde vor der Fütterung durch die Pansenfistel ein Volumenmarker (Cr-EDTA) in den Pansen eingegeben und direkt vor der Fütterung und 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 und 8 Stunden danach Pansensaft entnommen (s. 2.6).

#### **3.4.1 Bestimmung des pH-Wertes**

Um den Einfluss der Fütterung auf den pH-Wert der Pansenflüssigkeit zu erfassen, wurden zum Zeitpunkt der Heufütterung und an den Tagen 2, 4, 7, 14, 28 und 42 der Krafffutter-Fütterung (KF) in einem Zeitraum von neun Stunden der pH-Wert gemessen. Die Entnahme der Pansenflüssigkeit erfolgte direkt vor der Fütterung und 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 und 8 Stunden danach. Der pH-Wert wurde sofort nach der Gewinnung bei 6 Schafen (ca. 10 Minuten) bestimmt (s. 2.6.3.1).

In Abb. 14 sind die Ergebnisse der pH-Wert-Messungen grafisch dargestellt. Die Ausgangswerte vor der Fütterung (Stunde 0) liegen zwischen pH 6,8 und 7,1 und nahezu alle Verlaufskurven haben ihren niedrigsten Wert (pH 5,8 bis 6,4) im Zeitraum 2-3 Stunden nach der Fütterung. Anschließend steigen die Werte an, erreichen aber 8 Stunden nach der Fütterung nicht ihr Ausgangsniveau, sondern bleiben bei pH 6,0 bis 6,5.

Die Verlaufskurve bei Heufütterung liegt ganz oben, beginnt aber beim niedrigsten Wert zur Stunde 0. Die Werte am 2. Tag der Krafffuttergabe liegen 1, 2, 3, 4 und 5 Stunden nach der Fütterung direkt unter denen bei Heufütterung, 6, 7 und 8 Stunden nach Fütterung darüber. Der fast parallele Verlauf (Tag 2) mit den Werten der Heufütterung ist darauf zurückzuführen, dass am 2. Tag noch nicht die gesamte Krafffuttermenge verabreicht wurde (s. Abb. 7). Bei KF 7 und 14 werden die niedrigsten Wert insgesamt (ca. pH 5,8) erreicht. Die Verlaufskurven für KF 4, 7 und 14 haben die niedrigsten Werte. Die Verlaufskurven für 28 und 42 Tage KF

liegen im mittleren Bereich und erreichen 8 Stunden nach der Fütterung etwa den gleichen Wert wie bei Heufütterung.

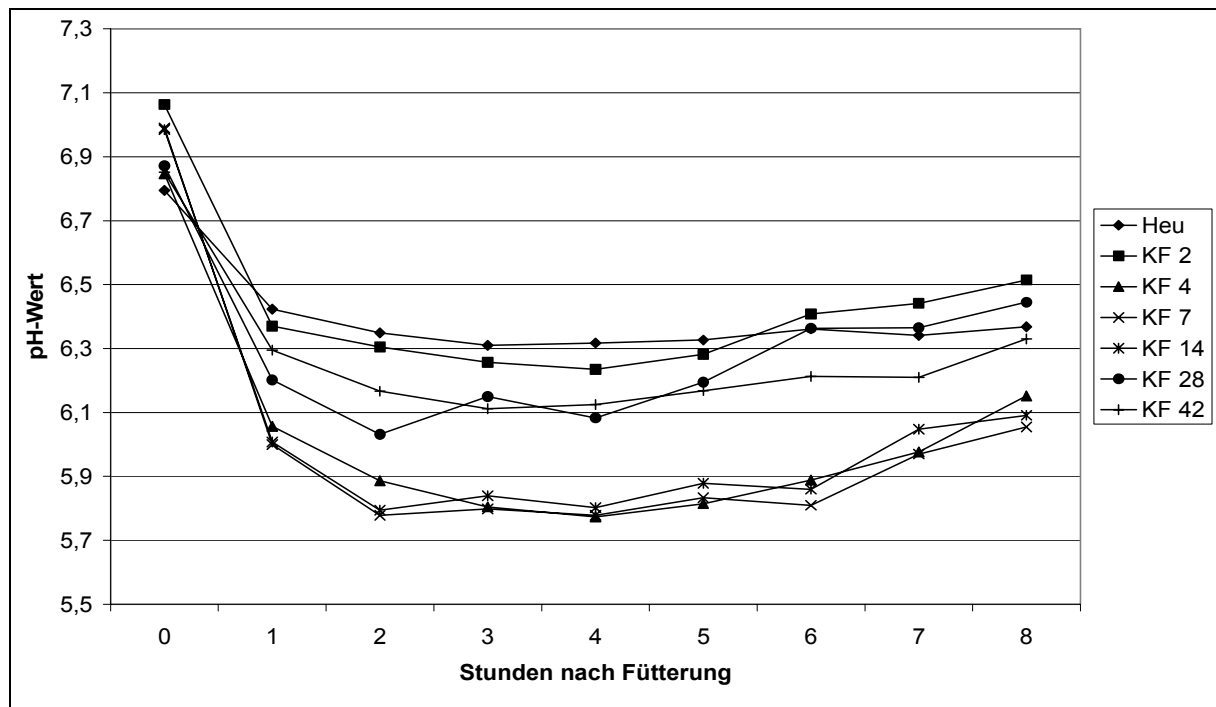


Abb. 14 Mittelwerte des pH-Wertes der Pansenflüssigkeit bei 6 Schafen zum Zeitpunkt der Heufütterung und nach 2, 4, 7, 14, 28 und 42 Tagen der KF. Auf der x-Achse sind die Stunden nach der Fütterung aufgetragen (KF = Konzentratfütterungstag).

In Abb. 15 sind die Ergebnisse der pH-Wert-Untersuchungen mit Standardfehlerbalken versehen nacheinander auf der x-Achse zu finden und die Stunden nach der Fütterung sind an dem jeweiligen Tag nacheinander aufgetragen. Durch diese Darstellung der Werte kann ein Verlauf über die Gesamtzeit deutlicher wahrgenommen werden. Der Trend sinkt zunächst bis 2 Wochen KF ab, steigt dann aber bis zum 42. Tag an.

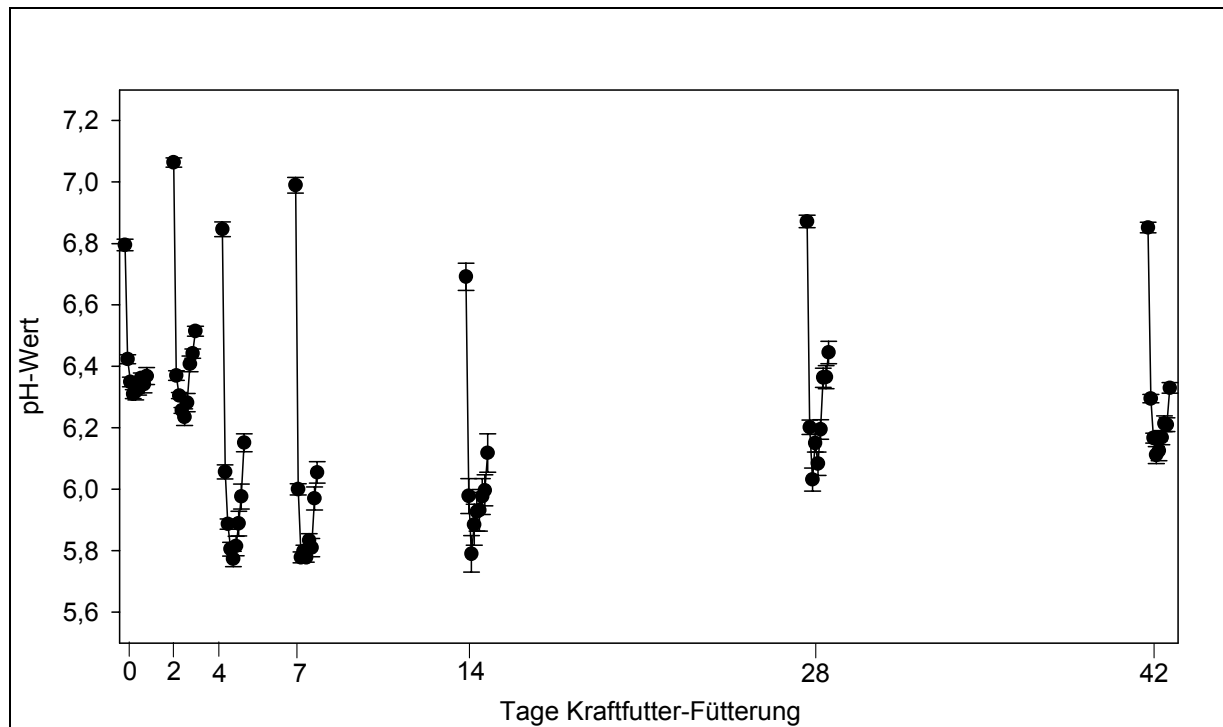


Abb. 15 pH-Werte der Pansenflüssigkeit am 14. Tag der Heufütterung in Einzelhaltung und am Tag 2, 4, 7, 14, 28 und 42 der Kraffuttergabe bei 6 Schafen. Die Messung erfolgte direkt vor der Fütterung und 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 und 8 Stunden danach. Die Werte sind mit Standardfehlerbalken versehen.

Im Diagramm des Gesamtverlaufes ist sichtbar, dass der niedrigste pH-Wert insgesamt zur 2. bzw. 3. Stunde nach der Fütterung am 4. bzw. 7. Tag KF auftritt. Wenn die pH-Werte zur 2. Stunde jeder Fütterungsperiode von allen 6 Tieren aufgetragen werden (s. Abb. 16), kann eine Regressionsgerade, die durch die Punkte gelegt wird, Aufschluss darüber geben, um wie viele pH-Wert-Einheiten der niedrigste pH-Wert pro Tag trotz der Verfütterung von Konzentratfutter ansteigt. Für die einzelnen Tiere ist die Steigung in Tab. 14 dargestellt. Wie am Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) zu erkennen ist, streuen die Werte mehr oder weniger stark (starke Streuung bei Schaf 2 und 6, mittlere Streuung bei Schaf 4 und 5, geringe Streuung bei Schaf 1 und 3).

Tab. 14 Steigung der Regressionsgeraden und  $R^2$  für die Einzeltiere

Tier	Steigung des pH-Wertes pro Tag	Bestimmtheitsmaß $R^2$
Schaf 1	+0,0063	0,8422
Schaf 2	+0,0051	0,325
Schaf 3	+0,0094	0,8129
Schaf 4	+0,0096	0,732
Schaf 5	+0,0135	0,7578
Schaf 6	+0,0135	0,5057
<b>Gesamt</b>	<b>+0,0096</b>	<b>0,4199</b>

Insgesamt steigt der pH-Wert pro Tag um ca. 0,01 pH-Einheiten bei einem Bestimmtheitsmaß von 0,42.



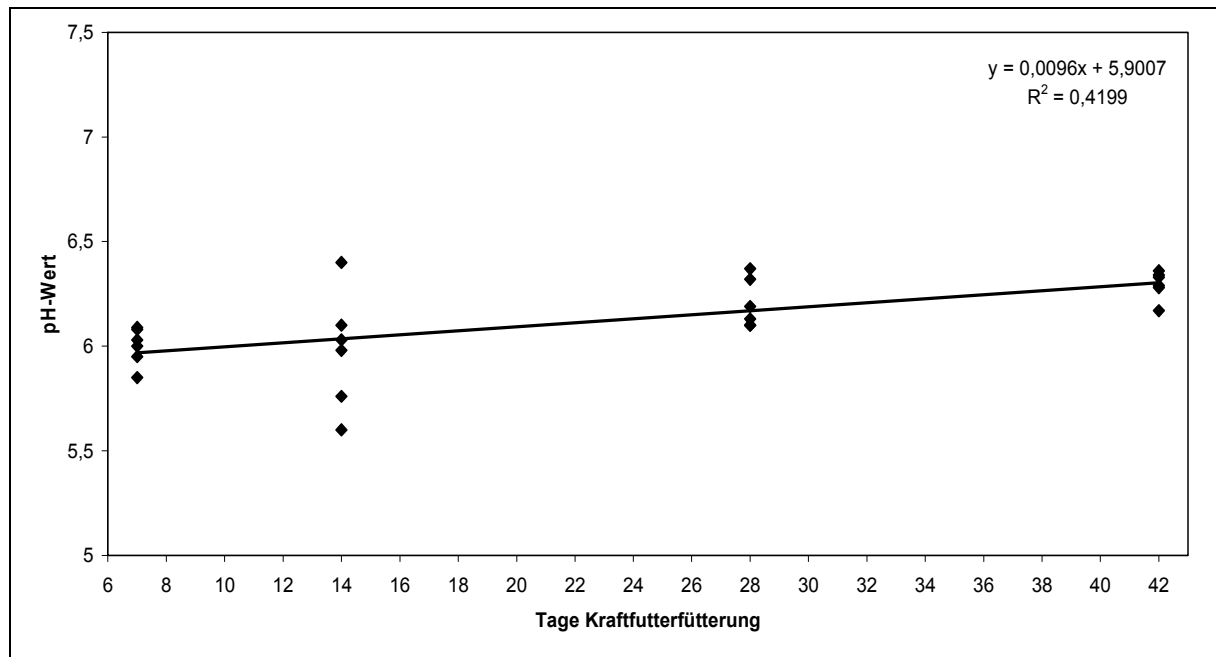


Abb. 16 pH-Wert 2 Stunden nach Fütterung des 7., 14., 28. und 42. KF-Tages. Aus der Funktion der Regressionsgeraden geht hervor, dass pro Tag eine Steigerung des niedrigsten pH-Wertes um 0,01 pH stattfindet.

### 3.4.2 Bestimmung des Ammonium-Gehaltes

Um den Einfluss der Fütterung auf den Ammonium-Gehalt der Pansenflüssigkeit zu erfassen, wurden zum Zeitpunkt der Heufütterung und an den Tagen 2, 4, 7, 14, 28, und 42 der Kraftfutter-Fütterung (KF) in einem Zeitraum von neun Stunden der Ammonium-Gehalt mithilfe einer Ammoniak-Sonde gemessen. Dafür wurde der Pansensaft stark alkalisiert, so dass das darin gelöste  $\text{NH}_4^+$  in gasförmiges  $\text{NH}_3$  überging. Nach einer Verrechnung mit dem pH-Wert konnte auf diese Weise der vorherige Ammonium-Gehalt bestimmt werden. Die Entnahme der Pansenflüssigkeit erfolgte direkt vor der Fütterung und 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 und 8 Stunden danach. Die Ammonium-Konzentration wurde ca. 15 Minuten nach der Gewinnung bei 6 Schafen bestimmt (s. 2.6.3.1).

In Abb. 17 ist der Verlauf der Ammonium-Konzentration in den 8 Stunden nach der Fütterung zu sehen. Dabei fällt auf, dass an sämtlichen KF-Tagen eine deutlich höhere Ausgangskonzentration als bei Heufütterung vorliegt. Im weiteren Verlauf steigt der Ammonium-Gehalt bei allen Fütterungsgruppen bis zur 2 Stunde merkbar an, um bei nahezu allen Fütterungsbedingungen bis zur 8. Stunde wieder abzufallen und die Werte sinken teilweise (KF 2, KF 4, KF 7, KF 42) unter das Ausgangsniveau. Ein abweichender Verlauf ist beim 14. und 28. Tag der Konzentratfütterung zu sehen. In der Kurve für den 14. Tag KF findet ein Einbruch der Werte bei der 4. und 5. Stunde statt. Dabei sinkt der Ammonium-Gehalt zur 4. Stunde über 10 mmol/l im Vergleich zur 3. Stunde nach Fütterung ab und wird zur 5. Stunde noch etwas geringer (unter 10 mmol/l). Anschließend steigen die Werte zur 6. Stunde wieder deutlich an.

Bei KF 28 findet anstelle einer sinkenden Tendenz nach der 3 Stunde ein weiterer Anstieg bis zur 6. Stunde nach der Fütterung statt. Der Endwert nach 8 Stunden liegt bei ca. 25 mmol/l und übertrifft damit den Ausgangswert von ca. 7,5 mmol/l beträchtlich.

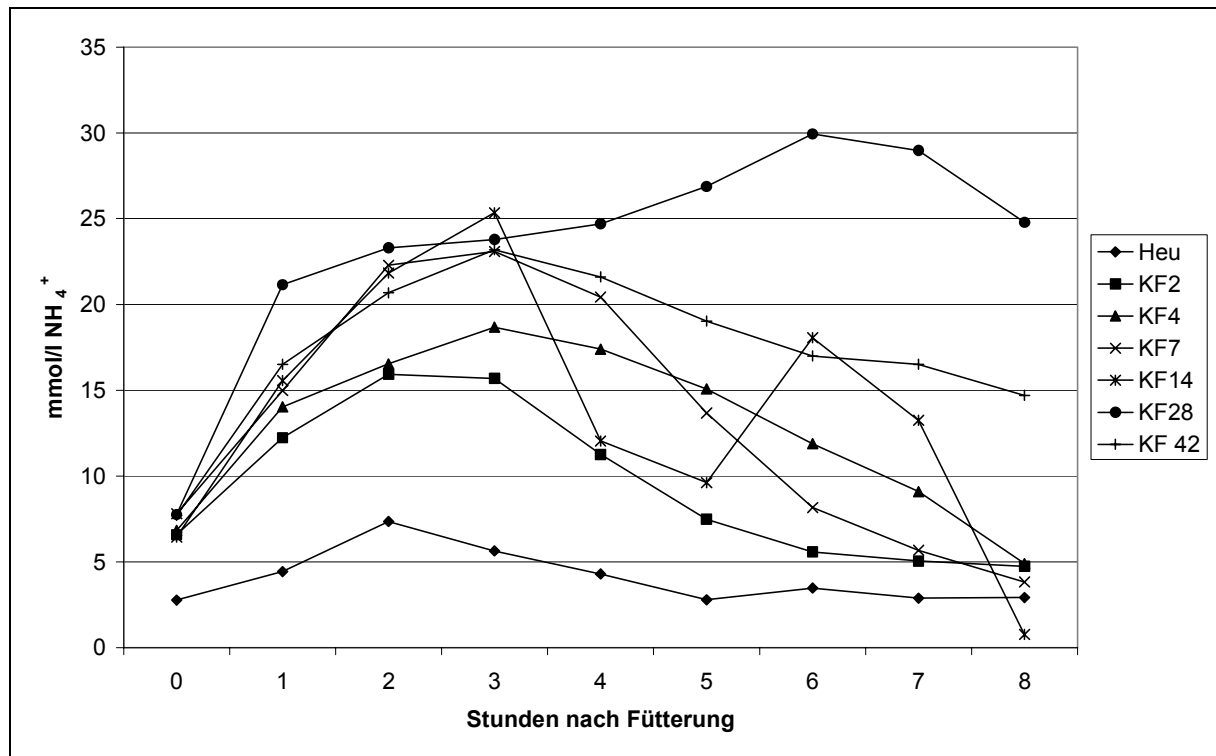


Abb. 17 Verlauf der Ammonium-Gehalte (Mittelwerte aus  $n = 6$ ; mmol/l) in der Pansenflüssigkeit in den 8 Stunden nach der Fütterung für die einzelnen Fütterungsgruppen; KF = Konzentratfütterungstag.

Korrespondierend zur Darstellung des pH-Wertes ist auch die Ammonium-Konzentration im Gesamtverlauf aufgetragen. In Abb. 18 ist die steigende Tendenz der Ammonium-Konzentration im Verlauf der Fütterungsumstellung zu sehen. Die höchsten Werte treten am 28. Tag der KF auf. Am 42. Tag ist eine deutlich kleinere Amplitude zu erkennen und hier ähnelt der Kurvenverlauf dem des 7. Tages der KF, wobei die Erholung der Werte am 42. Tag weniger rasch stattfindet und auch 8 Stunden nach der Fütterung noch 15 mmol/l Ammonium vorkommen.

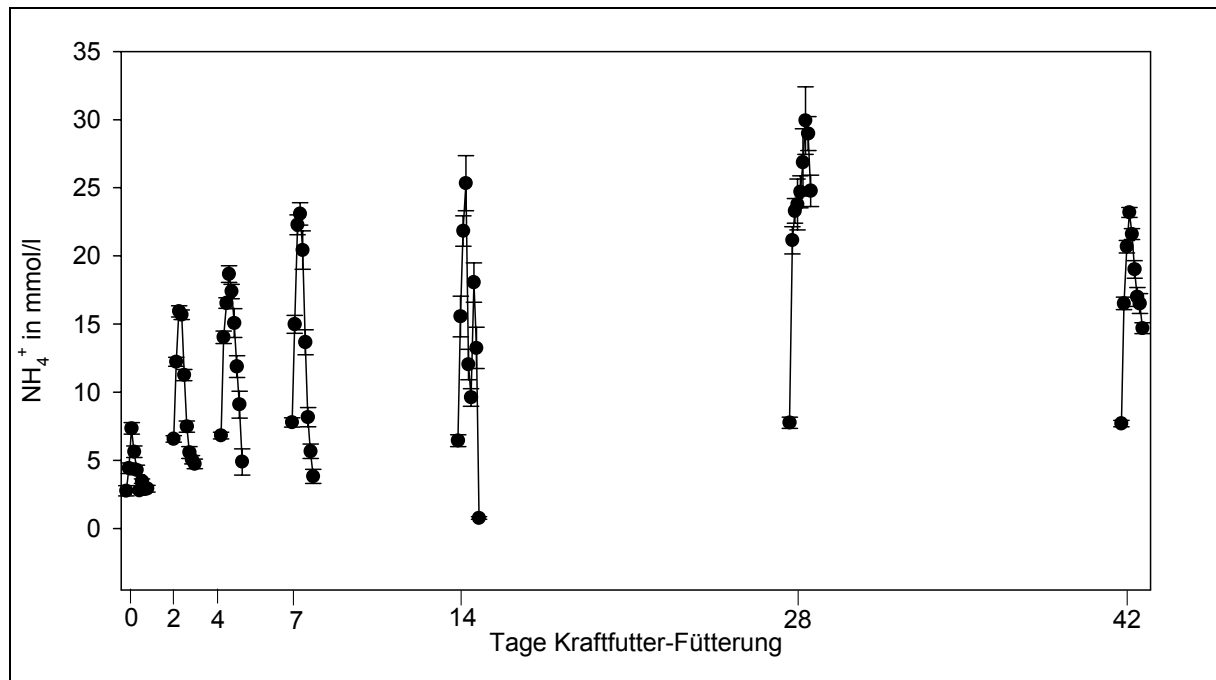


Abb. 18 Gesamtverlauf der Ammonium-Konzentration in der Pansenflüssigkeit am 14. Tag der Heufütterung in Einzelhaltung und am Tag 2, 4, 7, 14, 28 und 42 der Kraftfuttergabe bei 6 Schafen. Die Messung erfolgte direkt vor der Fütterung und 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 und 8 Stunden danach. Die Werte sind mit Standardfehlerbalken versehen.

### 3.4.3 Bestimmung der Osmolalität

Die Osmolalität der Pansenflüssigkeit wurde bei Heufütterung und am 2., 4., 7., 14., 28. und 42. Tag der Konzentratfütterung bestimmt (s. 2.6.3.4). Es erfolgte jeweils eine Messung vor der Fütterung und 1 bis 8 Stunden nach der Fütterung. In Abb. 19 ist der Verlauf der Mittelwerte an den einzelnen Tagen aufgezeichnet. Bei allen Bedingungen ist ein Anstieg der Werte direkt nach der Fütterung zu beobachten. Außerdem besteht eine abfallende Tendenz ab der 2. Stunde nach Fütterung, von der nur die Werte bei Heufütterung und bei 28 Tagen nach Futterumstellung abweichen. Bei Heufütterung tritt nur ein Höchstwert nach 5 Stunden und bei 28 Tagen KF ein zweiter Höchstwert nach 6 Stunden auf. Während nach diesem Höchstwert ein rascher Abfall unter Kontrollbedingungen stattfindet (Heufütterung), sinkt bei 28 Tagen KF die Osmolalität nicht deutlich ab.

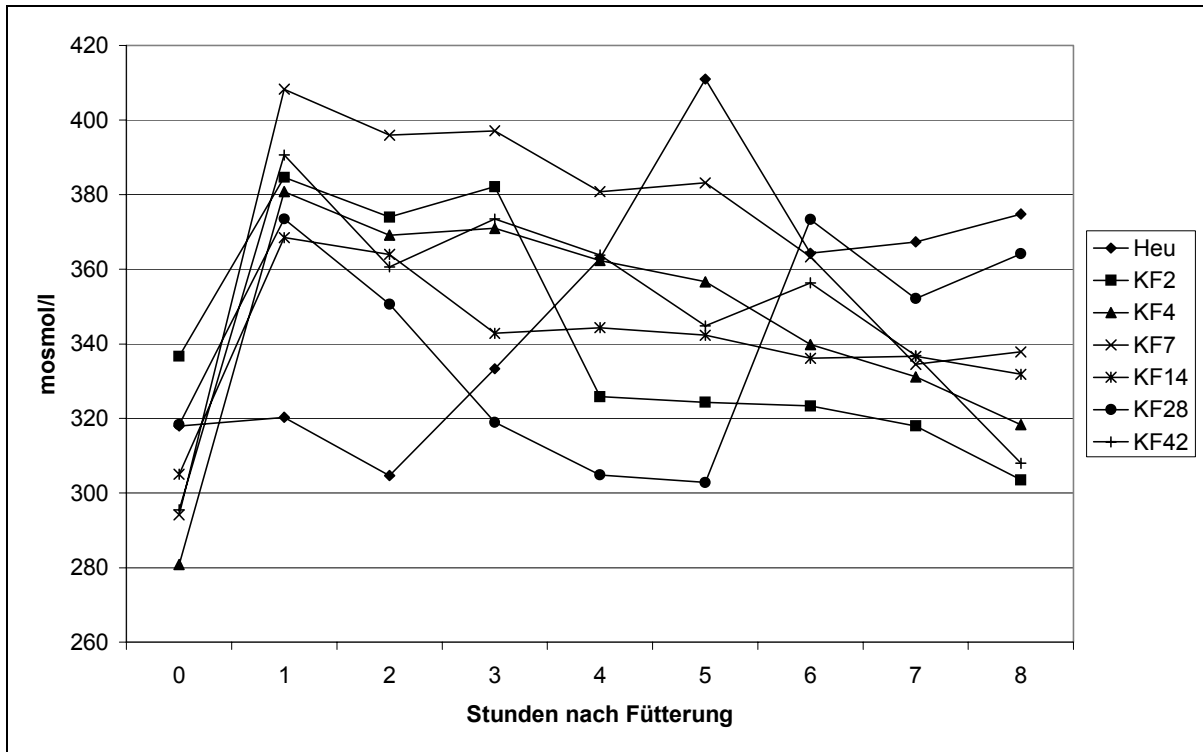


Abb. 19 Verlauf der Osmolalität (Mittelwerte aus  $n = 6$ ; mosmol/l) in der Pansenflüssigkeit in den 8 Stunden nach der Fütterung für die einzelnen Fütterungsgruppen; KF = Konzentratfütterungstag.

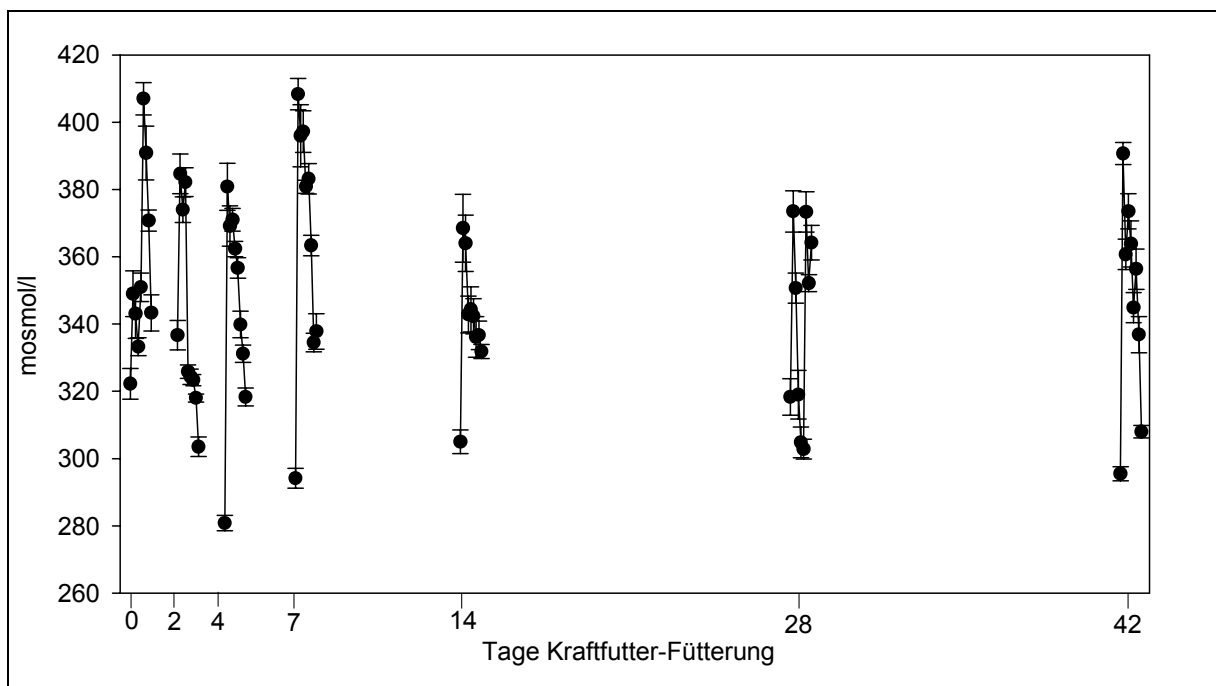


Abb. 20 Gesamtverlauf der Osmolalität in der Pansenflüssigkeit am 14. Tag der Heufütterung in Einzelhaltung und am Tag 2, 4, 7, 14, 28 und 42 der Kraftfuttergabe bei 6 Schafen. Die Messung erfolgte direkt vor der Fütterung und 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 und 8 Stunden danach. Die Werte sind mit Standardfehlerbalken versehen.

Im Gesamtverlauf der Osmolalität (s. Abb. 20) ist keine eindeutige Tendenz erkennbar. Bei Kraftfutterfütterung ist der Kurvenverlauf jedoch in den 8 Stunden nach Fütterung relativ

ähnlich (Ausnahme: 28. Tag): Einem steilen Anstieg 1. Stunde nach Fütterung folgt ein langsamerer Abfall der Werte. Am 2. Tag wird dabei 8 Stunden nach Fütterung das Ausgangsniveau wieder unterschritten, während die Osmolalität am 4., 7., 14. und 42. Tag am Messende noch nicht auf das Ausgangsniveau abgesunken ist.

Die höchsten Werte wurden bei Heufütterung zur 5. Stunde nach Fütterung und bei 7 Tagen KF eine Stunde nach Fütterung gemessen (ca. 410 mosmol/l). Der niedrigste Wert tritt am 4. Tag direkt vor der Fütterung auf (ca. 280 mosmol/l).

#### 3.4.4 Bestimmung des Volumens

Für die Bestimmung des Volumens und der Passage-Rate der Pansenflüssigkeit wurde zum Zeitpunkt der Heufütterung und am 4., 7., 14., 28. und 42. Tag der Kraffutterfütterung eine Stunde vor der Fütterung ein Volumenmarker (Chrom-EDTA, s. 2.6.2) eingegeben. Die Entnahme erfolgte nach demselben Protokoll wie bei der Bestimmung von pH-Wert,  $\text{NH}_4^+$  und Osmolalität. Beim Vergleich der Chrom-Konzentration an den untersuchten Tagen (s. Abb. 21) fällt auf, dass außer dem Ausgangswert vor der Fütterung keine wesentlichen Unterschiede bestehen: Zu den weiteren Untersuchungszeitpunkten (1 - 8 Stunden nach Fütterung) liegen die Mittelwerte (Die 6 Tiere sind als Mittelwert mit Standardabweichung zusammengefasst.) eng beieinander. Die einzelnen Kurven folgen einer logarithmischen Funktion.

In Abb. 22 sind die Werte in einer halblogarithmischen Darstellung als Einzelpunkte pro Tier, Fütterung und Zeiteinheit aufgetragen. Eine Regression, die ins Diagramm gesetzt wurde, zeigt, dass die Werte annähernd einem geraden Verlauf folgen. Die Kurve entspricht also der

**Gleichung 16** 
$$C_t = C_0 \times e^{-kt}$$

(s. 2.6.3.3, s. Gleichung 12).

Durch Extrapolation der Regression kann die Ausgangskonzentration von Chrom in der Pansenflüssigkeit errechnet werden. Mithilfe der Anfangskonzentration von Chrom und dem Wissen, wie viel Chrom in den Pansen gegeben wurde, besteht die Möglichkeit, das Volumen des Pansens zu errechnen (s. 2.6.3.3, Gleichung 14). Das errechnete Volumen beträgt 4,73 – 7,29 Liter mit einem Mittelwert von 5,15 Litern (s. Tab. 15).

Zusätzlich wurde die Turnover-Rate (Flüssigkeitsbewegung [Prozent] in Richtung Blättermagen pro Stunde) bestimmt (s. 2.6.3.3, Gleichung 13). Die Turnover-Rate beträgt 11 – 16 % pro Stunde. Dabei tritt bei Heufütterung der höchste Wert auf, am 4. Tag der Kraffutter-Supplementierung ist der Turnover auf 11 % pro Stunde gesunken. Bei den Messungen am 7., 14., 28. und 42. Tag bewegt sich die Turnover-Rate von 12 bis 14 % (s. Tab. 15).

Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen der Turnoverrate bei Heufütterung (im Mittel 15,7 %/h,  $n = 6$ ) und Konzentratfütterung-Supplementierung (im Mittel 12,9 %/h;  $n = 30$ ) mit  $P < 0,05$ .

Die Ausflußrate aus dem Pansen in Richtung Psalter richtet sich nach dem Turnover und dem vorliegenden Pansenvolumen. Sie schwankt zwischen 0,56 und 0,9 Liter pro Stunde und erreicht am 42. Tage der Konzentrat-Fütterung ihren Höchstwert.

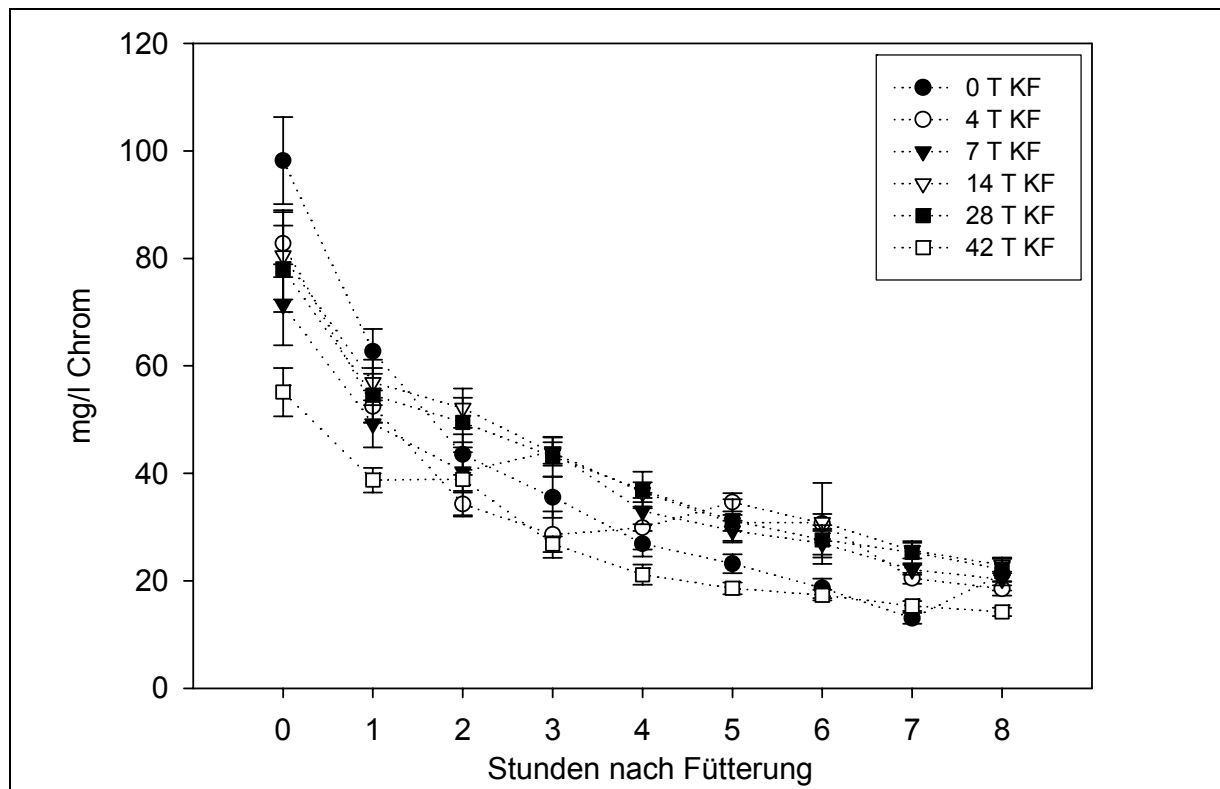


Abb. 21 Änderung der Konzentration des Volumenmarkers (Chrom als Chrom-EDTA) in Abhängigkeit von der Fütterung und der Zeit für alle Fütterungsgruppen (pro Gruppe  $n = 6$ ). Die Eingabe des Cr-EDTA (330 mg in Lösung) erfolgte eine Stunde vor der ersten Messung; Stunde 0 = direkt vor der Fütterung; KF = Konzentratfütterungstag.

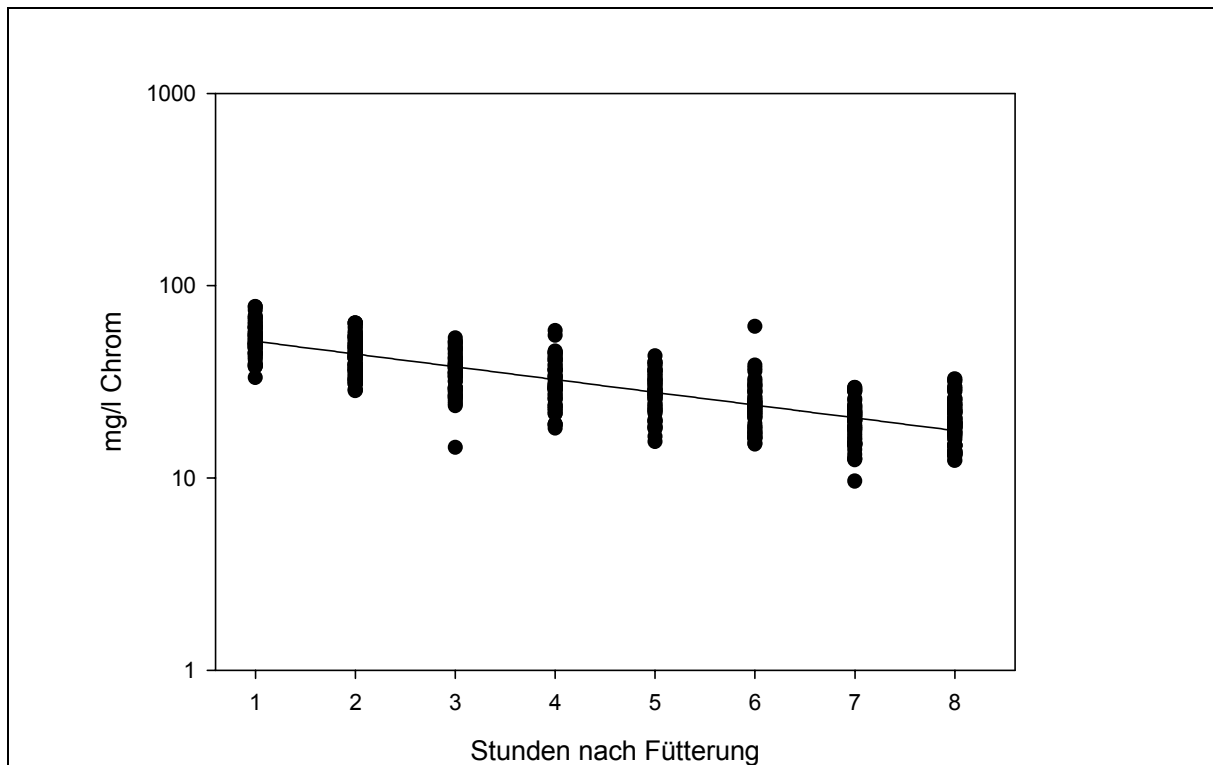


Abb. 22 Halblogarithmische Darstellung der Abnahme der Chrom-Konzentration in allen Einzelproben pro Zeiteinheit. Die Regression folgt der Gleichung  $C_t = C_0 \times e^{-kt}$ ;  $R^2 = 0,65$ .

Tab. 15 Pansenvolumen, Turnover und Flüssigkeitsabfluß in den Psalter der Pansenflüssigkeit pro Zeit. Berechnung s. 2.6.3.3, n= 6; KF = Kraffutterfütterungstag, KF0 = Heufütterung.

Fütterung	Pansen-Volumen [l]	Turnover [%/h]	Abfluß in den Psalter [l/h]
KF0	4,73 ± 0,51	16 ± 0,01	0,73
KF4	5,62 ± 0,53	11 ± 0,01	0,59
KF7	4,32 ± 0,36	14 ± 0,01	0,61
KF14	4,51 ± 0,22	14 ± 0,01	0,62
KF28	4,46 ± 0,60	13 ± 0,02	0,56
KF42	7,29 ± 0,50	12 ± 0,01	0,90

### 3.4.5 Bestimmung der Fettsäure-Konzentration

Die Fettsäurebestimmung erfolgte für die Fettsäuren Essigsäure (Acetat), Propionsäure (Propionat) und Buttersäure (Butyrat) bei Heufütterung und am 2., 4., 7., 14., 28. und 42. Tag KF vor der Fütterung sowie 2 und 8 Stunden nach der Fütterung (s. 2.6.3.2). Weiterhin wurde die Summe der drei oben genannten Fettsäuren errechnet (Gesamfettsäuren). Die erhaltenen Werte sind in Abb. 23 für alle Fütterungsgruppen als Mittelwerte ohne Standardabweichung dargestellt.

In Bezug auf die Einzelwerte weist Butyrat mit 4,2 - 27,6 mmol/l die niedrigste Konzentration auf, es folgt Propionat mit 7,6 – 35,9 mmol/l, während Acetat mit 25,9 – 107,2 mmol/l das größte Vorkommen besitzt.

Der Verlauf der Fettsäure-Konzentration an den untersuchten Tagen verhält sich unterschiedlich. Für Propionat und Butyrat gilt am 2., 4., 7., 14. und 28. Tag KF und für Acetat am 2. und 7. Tag KF, dass zur 2. Stunde nach Fütterung ein Anstieg und zur 8. Stunde nach Fütterung ein Absinken der Konzentration stattfindet (s. Abb. 23). In den weiteren Fällen (Prop. und But. am 42. Tag KF, Ac. am 0., 4., 14., 28. und 42. Tag KF) erfolgt nach dem Anstieg zur 2. Stunde ein weiteres Ansteigen der Werte bis zur 8. Stunde. Dabei erreicht der 2. Anstieg (von der 2. bis zur 8. Stunde) nur bei Acetat am Tag 42 zur 8. Stunde die Höhe des ersten Anstieges (von vor der Fütterung bis 2 Stunden danach) (s. Abb. 23).

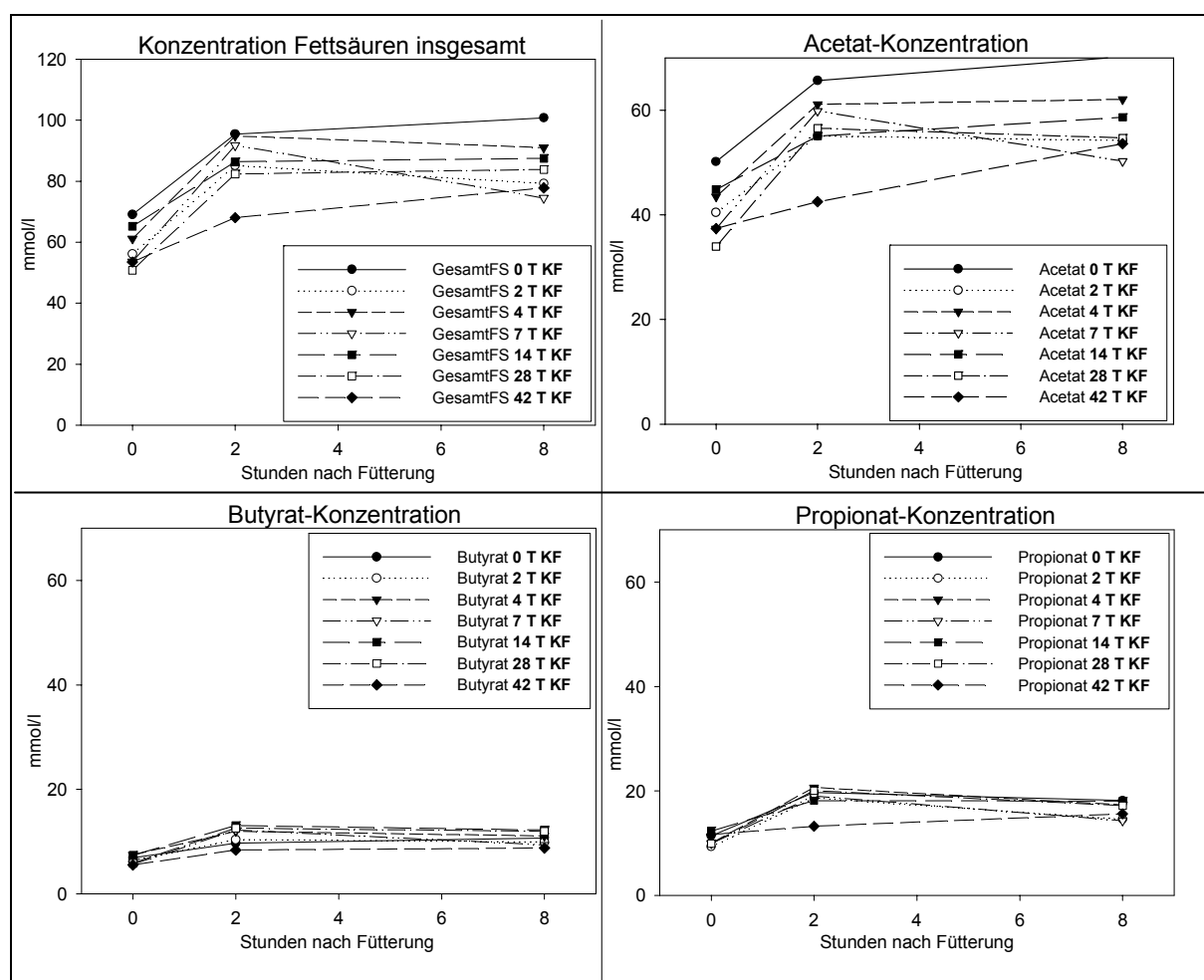


Abb. 23 Konzentration der flüchtigen Fettsäuren (Gesamtfettsäuren, Acetat, Propionat, Butyrat) in der Pansenflüssigkeit der verschiedenen Fütterungsgruppen (pro Gruppe n = 6); T KF = Tage Konzentratfütterung.



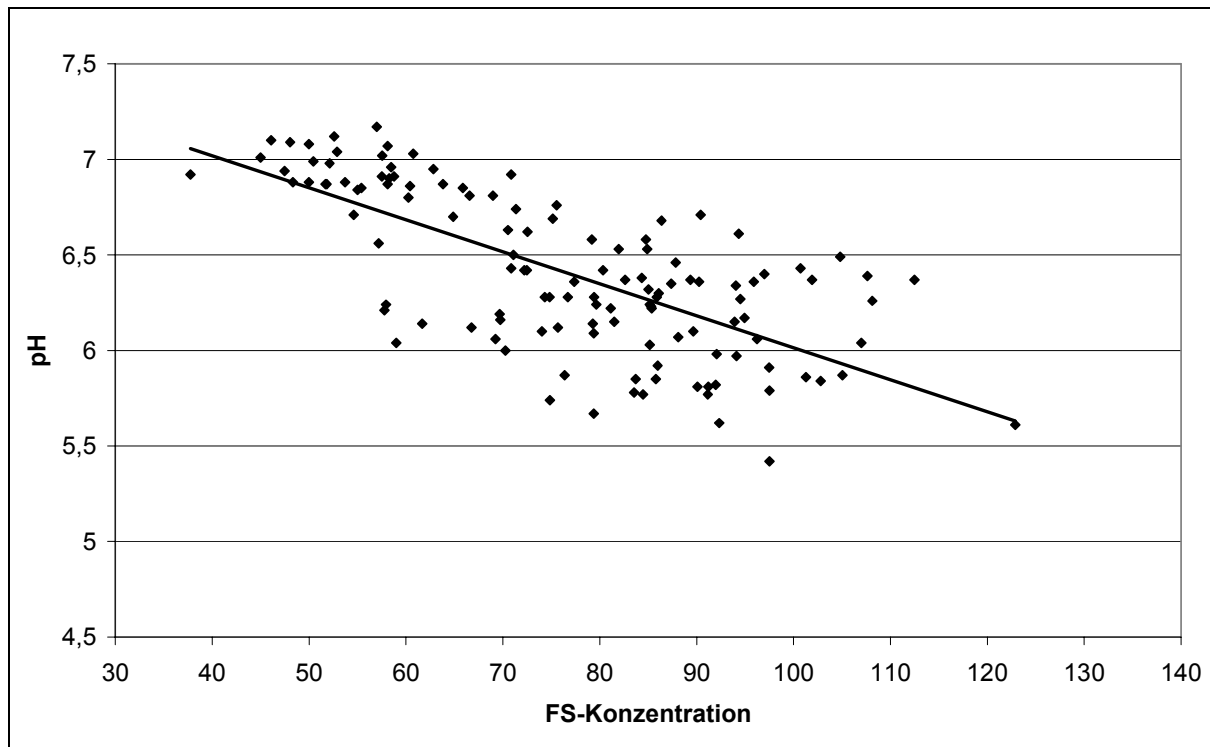


Abb. 24 Fettsäure-Konzentration gegen pH-Wert aller Einzelproben; Regression:  $y = -0,0168x + 7,6896$ ;  $R^2 = 0,5$ .

Abb. 24 zeigt das Verhältnis von pH-Wert zu Fettsäure-Konzentration. Es besteht ein linearer Zusammenhang: Bei steigender Fettsäurekonzentration nimmt der pH-Wert ab, während er bei sinkender Fettsäurekonzentration steigt.

### 3.4.6 Bestimmung des Natrium- und Kalium-Gehaltes

Um den Einfluss der Fütterung auf den Natrium- und Kalium-Gehalt der Pansenflüssigkeit zu erfassen, wurden zum Zeitpunkt der Heufütterung und an den Tagen 2, 4, 7, 14, 28 und 42 der Kraftfutter-Fütterung (KF) jeweils vor der Fütterung, 2 Stunden danach und 8 Stunden danach die Konzentration dieser Elektrolyte in der Pansenflüssigkeit bestimmt (s. 2.6.3.3). Die Konzentrationen der beiden Mineralstoffe verhalten sich zu nahezu allen Messzeitpunkten reziprok zueinander, d.h., bei einer hohen Natrium-Konzentration besteht eine niedrige Kalium-Konzentration und umgekehrt ebenso (s. Abb. 25). Die Streuung zwischen den Tieren ist, besonders bei Heufütterung, für Natrium größer. Hier nehmen die Tiere nicht zu einem bestimmten Zeitpunkt die gleiche Menge Futter auf, sondern alle Tiere haben ihre eigene Fress-Geschwindigkeit und Kauintensität. Die höchsten Natrium-Werte werden pro Tag zum ersten Messzeitpunkt (vor der Fütterung; 105 -127 mmol/l) erreicht. Anschließend sinkt die Natrium-Konzentration bis zur 2. Stunde nach der Fütterung ab (74 – 99 mmol/l) und steigt bis zur 8. Stunde nach Fütterung in den meisten Fällen wieder an (78 – 103 mmol/l; Ausnahme: Heufütterung und 7. Tag KF). Für Kalium werden die höchsten Werte jeweils zum zweiten Messpunkt erreicht (2 Stunden nach Fütterung; 36-48 mmol/l).

Davor und danach sind die Werte niedriger (nach 8 Stunden 30 - 44 mmol/l), wobei die Werte vor der Fütterung am niedrigsten sind (16-27 mmol/l). Für Natrium beträgt der Gesamtmittelwert aus allen Messungen 99,1 mmol/l, für Kalium liegt er bei 32, 6 mmol/l. In der Summe bleiben die Natrium- und die Kalium-Konzentration annähernd konstant (s. Abb. 26). Das reziproke Verhältnis der Natrium- und Kalium-Konzentration wird in der Abb. 27 besonders deutlich. Hier ist der Natrium-Wert jeder einzelnen Probe auf der x-Achse mit dem Kalium-Wert der gleichen Probe auf der y-Achse kombiniert aufgetragen.

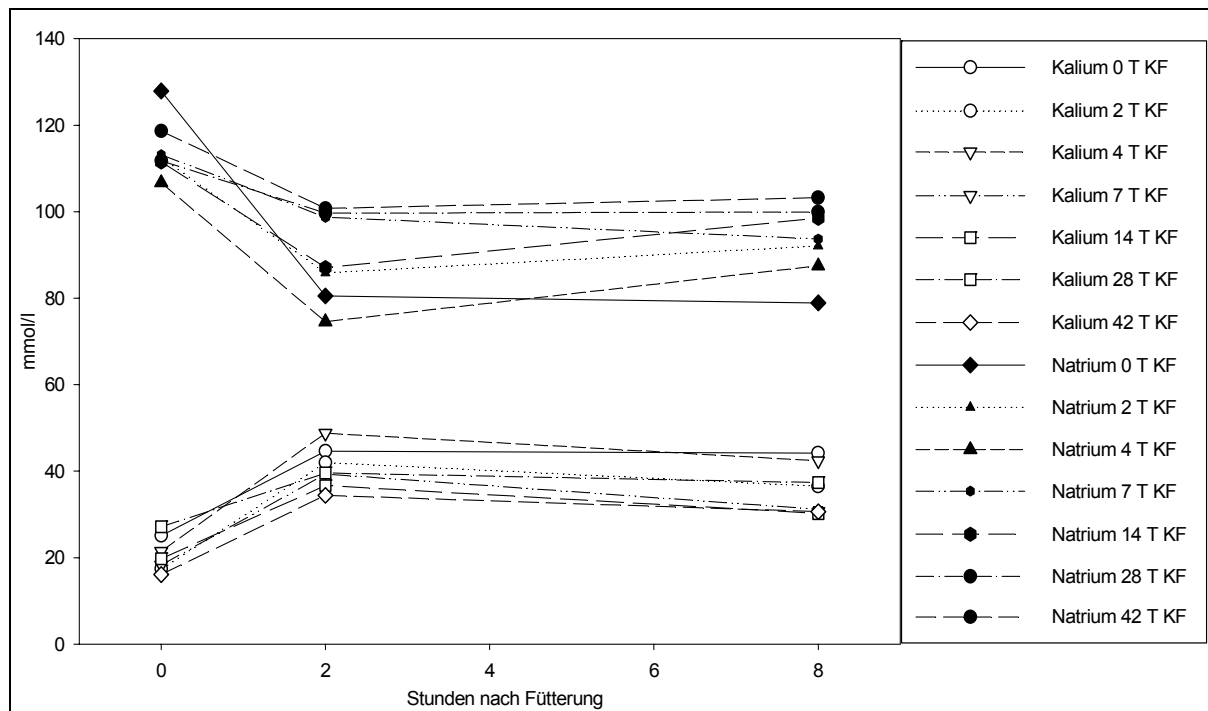


Abb. 25 Natrium- und Kalium-Konzentration (mmol/l) in der Pansenflüssigkeit der verschiedenen Fütterungsgruppen (Mittelwerte aus n = 6) vom Zeitpunkt vor der Fütterung (= 0) bis 8 Stunden danach; T KF = Tage Konzentratfütterung.

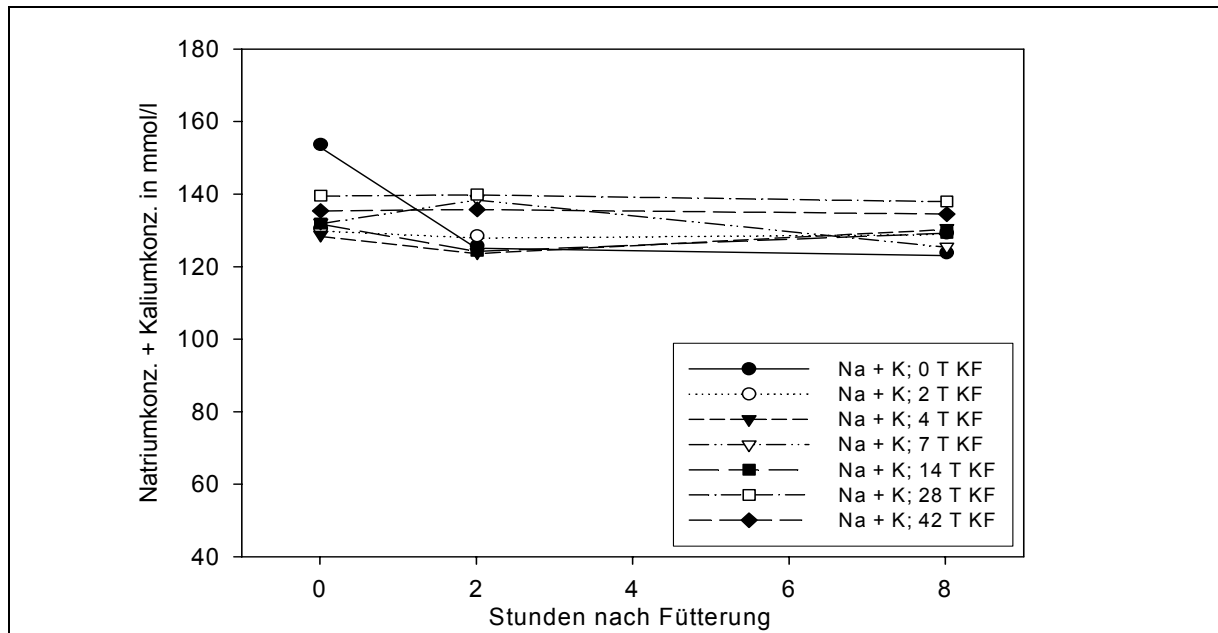


Abb. 26 Summe aus Natrium- und Kalium-Konzentration in der Pansenflüssigkeit der verschiedenen Fütterungsgruppen (Mittelwerte aus n = 6) vom Zeitpunkt vor der Fütterung (= 0) bis 8 Stunden danach; Na = Natrium; K = Kalium; T KF = Tage Konzentratfutter-Fütterung.

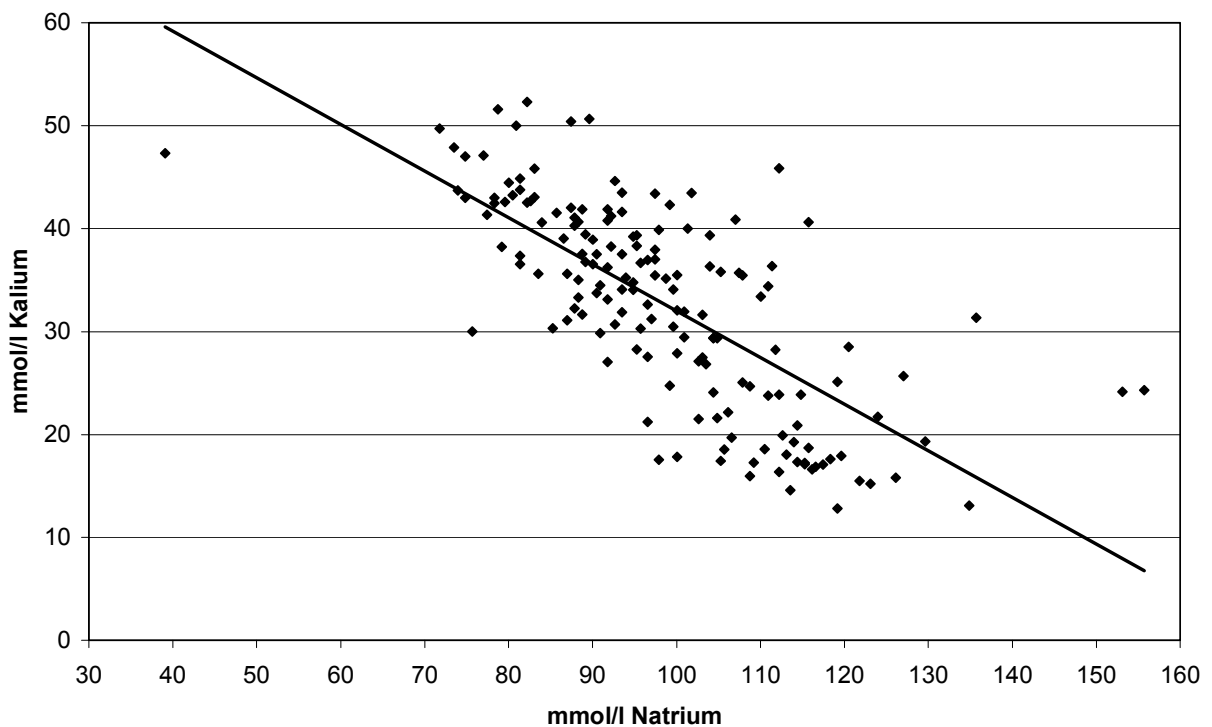


Abb. 27 Natrium- (x-Achse) und Kalium- (y-Achse)- Konzentration aller Einzelproben in der Pansenflüssigkeit als Punktdarstellung mit Regression;  $y = -0,4529 x + 77,308$ ;  $R^2 = 0,513$ .

### 3.5 Qualitativer Nachweis der Targets

Für die Amplifikation der mRNA-Sequenzen der gesuchten Gene wurden anhand veröffentlichter Sequenzen spezifische Primerpaare ausgewählt (s. 8.6). Als GOI (gene of interest; zu untersuchendes, interessierendes Gen) boten sich nach Literaturrecherche das Transportprotein MCT1 (Monocarboxylat-Transporter 1), die Ionenpumpe NaKA (Na-K-ATPase), die Enzyme CA1, CA2 (Carboanhydrase 1 und 2), ACS2 (Acetyl-CoA-Synthetase 2) und das PDZ-Protein NHERF1 (Natrium-Protonen-Austauscher 3 regulating factor) an (s. 1.7). Die Primerpaare wurden in ein RT-PCR-Experiment (s. 2.5.5.2) eingesetzt. Die Sequenzen der hierfür verwendeten Primerpaare sind der Tab. 24 im Anhang zu entnehmen. Als RNA-Matrize wurde eine zufällig ausgewählte Probe verwendet, bei der aus Pansenepithel eine Isolierung der Gesamt-RNA (s. 2.5.2) erfolgt war.

Für sämtliche Targets (MCT1, NaKA, CA1, CA2, ACS2, NHERF1) konnte der qualitative Nachweis im Pansen mittels konventioneller PCR erbracht werden (s. Abb. 28).

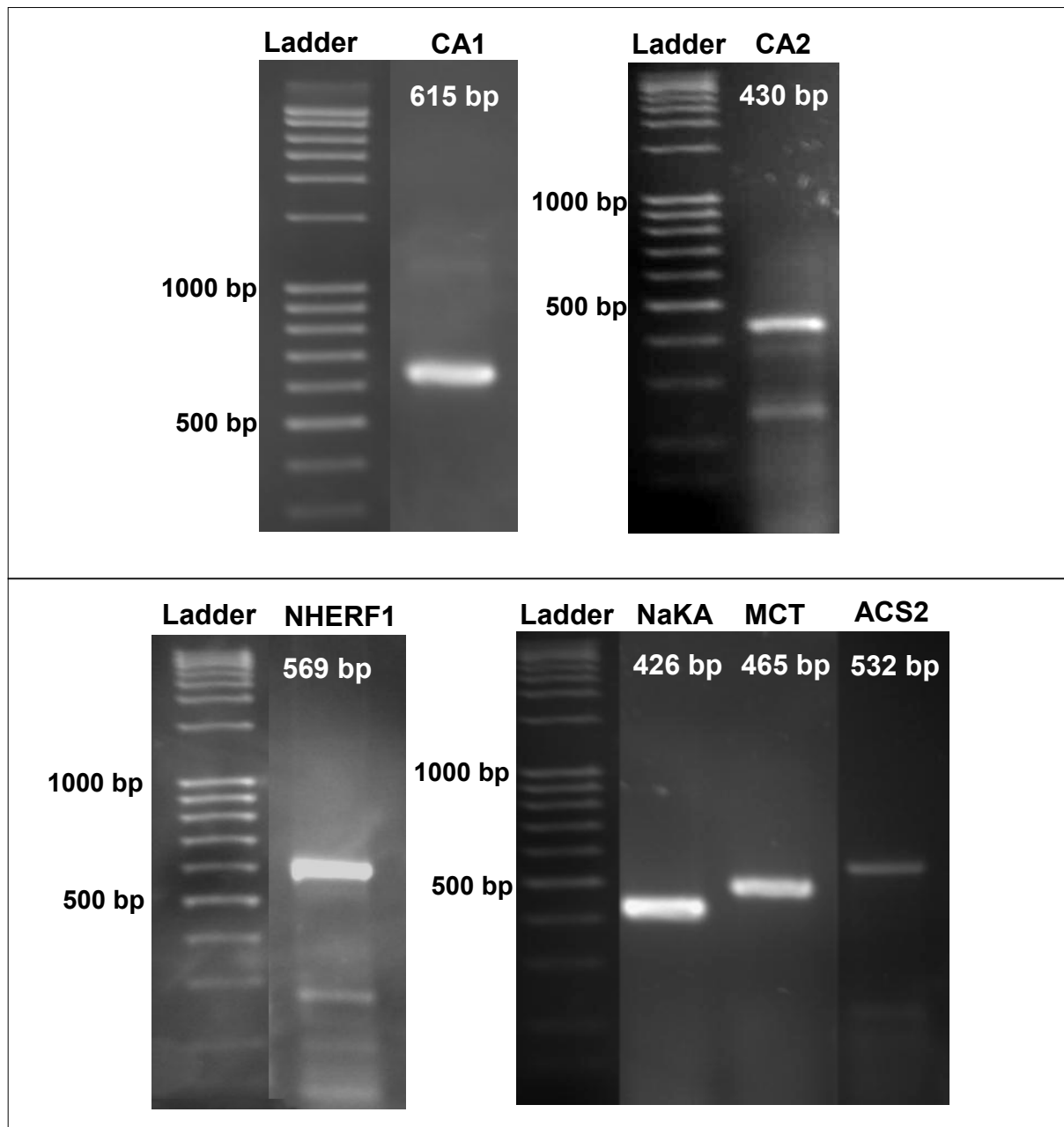


Abb. 28 Qualitativer Nachweis von NHERF1, NaKA, MCT1, ACS2, CA1 und CA2. Der qualitative Nachweis der Targets (Zielgene) erfolgte durch RT-PCR, DNA-Gelelektrophorese im Agarosegel und anschließende Sequenzierung. In der Gelelektrophorese ist im idealen Fall eine prominente Bande zu sehen, die im Vergleich zur 100 bp-Ladder (bp = Basenpaare, 100 bp Ladder = Leiter, bei der von 100 bp bis 1600 bp alle 100 Basenpaare eine Bande im Agarosegel erscheint) an der Stelle liegt, die der Länge des erwarteten Produktes (s. Tab. 24) entspricht.

### 3.6 Homologie der sequenzierten Targets

Nach der Sequenzierung der Targets wurde eine Analyse der Homologie (Übereinstimmung der Nukleinsäuresequenz) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Sequenzierungsergebnisse (s. 2.5.5.6) der durch RT-PCR gewonnenen Produkte mit der Vorlage verglichen (s. Tab. 16). Eine Übereinstimmung der Basenpaare bestand zu 85 bzw. 90 % bei Verwendung des Rindes als Vorlage, zu 89 % zur Vorlage vom Menschen und zu 98 bzw. 99 % der Basenpaare vom Schaf. Eine software-gestützte Suche in der für die Recherche benutzten Genbank (NIH Genbank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entry/query.fcgi>, s. 2.5.4.10) ergab für die PCR-Produkte als ersten Treffer mit den meisten Übereinstimmungen das gesuchte orthologe Gen. Es wurde daher angenommen, dass es sich bei dem sequenzierten PCR-Produkt um das orthologe Gen zu der Vorlage handelt. Für eine übersichtlichere Darstellung sind in den darauf folgenden Abbildungen (Abb. 29; Abb. 30; Abb. 31; Abb. 32; Abb. 33; Abb. 34) nur Teile der ermittelten Sequenzen, in denen eine größtmögliche Übereinstimmung mit der Vorlage besteht, dargestellt. Die jeweils obere Sequenz diente als Vorlage, die beiden unteren sind die sequenzierten PCR-Produkte (seq) für den sense-Strang (s; Nukleinsäurekette vom 5`-Ende zum 3`-Ende) und den antisense-Strang (as; Nukleinsäurekette vom 3`-Ende zum 5`-Ende). Die Zahlen darüber stehen für die Nummerierung der cds (codierende Sequenz), die seitlichen Zahlen für das letzte Basenpaar der Sequenz der jeweiligen Reihe.

Tab. 16 Sequenzvergleiche der Vorlage mit dem PCR-Produkt für ACS2, CA1 und CA2, MCT1, NaKa und NHERF1

Target (PCR-Produkt)	Tierart Vorlage	Tierart PCR-Produkt	Acc. No. Genbank	Richtung	Anzahl sequenzierte Bp	Homologe Bp zur Vorlage	Anzahl nicht bestimmbarer Bp bei Sequenzierung	Homologe Bp in Prozent
ACS2	Bos taurus	Ovis aries	<u>AB046741</u>	s	496	446	32	90
				as	501	448	36	89
CA1	Ovis aries	Ovis aries	<u>NM_001009771</u>	s	583	575	3	99
				as	592	555	22	94
CA2	Bos taurus	Ovis aries	<u>NM_178572</u>	s	408	347	31	85
				as	403	319	56	79
MCT1	Ovis aries	Ovis aries	<u>AJ315929</u>	s	427	421	1	99
				as	451	431	0	96
NaKa	Ovis aries	Ovis aries	<u>BCO11777</u>	s	379	371	0	98
				as	375	368	1	98
NHERF1	Homo sapiens	Ovis aries	<u>AY785285</u>	s	542	467	27	86
				as	557	496	16	89





## Ergebnisse

	*                    20                    *                    40                    *	
CA2 bov :	atgtcccatcactggggatacggcaagcacaacggccccgaacactggcataaggact	: 58
seq as :	-----GGCATAAAGGACT-----	: 12
		GGCATAAAGGACT
	*                    80                    *                    100                    *	
CA2 bov :	tccccattgccaacggagagcgccagtcacccggtgacatcgacaccaaggccgctcgt	: 116
seq as :	TCCCATTGCCAACGGAGAGCGCCAGTCACCCGTTGACATCGACACCAAGGCCGTCGT	: 70
	T CCCATTGCCAACGGAGAGCGCCAGTCACCCGTTGACATCGACACCAAGGCCGTCGT	
	*                    120                    *                    140                    *                    160                    *	
CA2 bov :	tcaggatcctgcttgaagcctctggcccttgctctatggggaagcaacttcgcggaga	: 174
seq as :	TC-----	: 72
	TC	

	*                    300                    *                    320                    *                    340	
CA2 bov :	gggctcatctgatgaccaaggttctgagcatactgtggataggaagaaatgatgctgcc	: 348
seq s :	-----ACCAAGGATCTGAGCATACTGTGGATAGGAAGAAATATGCTGCA-----	: 44
	ACCAAGG TCTGAGCATACTGTGGATAGGAAGAAATATGCTGC	
	*                    360                    *                    380                    *                    400	
CA2 bov :	gagctacacctggttcactggaacaccaagtacggggactttggaacagcagcacagc	: 406
seq s :	GAGCTACACCTGGTTCACTGGAACACCAAGTACGGGGACTTTGGAACAGCA-----	: 95
	GAGCTACACCTGGTTCACTGGAACACCAAGTACGGGGACTTTGGAACAGCA	
	*                    420                    *                    440                    *                    460	
CA2 bov :	agcctgatggactggctgttgggtgttttttgaagggttggtgatgctaaccagc	: 464
seq s :	-----	: -

Abb. 31 Carboanhydrase 2. Das sequenzierte Produkt vom Schaf ist innerhalb des dargestellten Bereiches von 72 (as-Sequenz) und 95 (s-Sequenz) Basenpaaren zu 98,2% zur Vorlage vom Rind (CA2 bov) homolog.

	*                    2500                    *                    2520                    *                    2540                    *                    2560                    *	
NaKA ov :	aagagacagcccagaaacccccagacagacaaactcgtgaacagcggcctgatcagcatggcctacggacagattggtatgat	: 2573
seq s :	-----CGGCTGATCAGCATGGCCTACGGACAGATTGGTATGAT-----	: 38
seq as :	-----CGGCTGATCAGCATGGCCTACGGACAGATTGGTATGAT-----	: 38
	CGGCTGATCAGCATGGCCTACGGACAGATTGGTATGAT	
	*                    2580                    *                    2600                    *                    2620                    *                    2640                    *	
NaKA ov :	ccaggccctgggggcttcttcaacttactttgtgatcatggctgagaacggcttcctcctaatcacctgctgggcatccgag	: 2656
seq s :	CCAGGCCCTGGGGGCTTCTTCACTTACTTTGTGATCATGGCTGAGAACGGCTTCCTCCCTAATCACCTGCTGGGCATCCGAG	: 121
seq as :	CCAGGCCCTGGGGGCTTCTTCACTTACTTTGTGATCATGGCTGAGAACGGCTTCCTCCCTAATCACCTGCTGGGCATCCGAG	: 121
	CCAGGCCCTGGGGGCTTCTTCACTTACTTTGTGATCATGGCTGAGAACGGCTTCCTCCCTAATCACCTGCTGGGCATCCGAG	
	*                    2660                    *                    2700                    *                    2720                    *                    274	
NaKA ov :	tgacctgggatgaccggttgatcaacgaactggaggacagctatgggcagcagtggaacctatgaacagaggaagatcgtggaa	: 2739
seq s :	TGACCTGGGATGACCGTTGGATCAACGACGTGGAGGACAGCTATGGGCAGCAGTGGACCTATGAACAGAGGAAGATCGTGGAA	: 204
seq as :	TGACCTGGGATGACCGTTGGATCAACGACGTGGAGGACAGCTATGGGCAGCAGTGGACCTATGAACAGAGGAAGATCGTGGAA	: 204
	TGACCTGGGATGACCGTTGGATCAACGACGTGGAGGACAGCTATGGGCAGCAGTGGACCTATGAACAGAGGAAGATCGTGGAA	
	*                    2760                    *                    2780                    *                    2800                    *                    2820	
NaKA ov :	ttcacctgccacacggccttctttgtcagcatcgtggtggtgcagtgggctgacttggatcatctgcaagaccaggaggaattc	: 2822
seq s :	TTCACCTGCCACACGGCCTTCTTTGTGATCATCGTGGTGGTGCAGTGGGCTGACTTGGTCACTCTGCAAGACCAGGAGGAATTC	: 287
seq as :	TTCACCTGCCACACGGCCTTCTTTGTGATCATCGTGGTGGTGCAGTGGGCTGACTTGGTCACTCTGCAAGACCAGGAGGAATTC	: 287
	TTCACCTGCCACACGGCCTTCTTTGTGATCATCGTGGTGGTGCAGTGGGCTGACTTGGTCACTCTGCAAGACCAGGAGGAATTC	
	*                    2840                    *                    2860                    *                    2880                    *                    2900	
NaKA ov :	cgtcttccagcaggggatgaagaacaagatcttaatatattggcctcttcgaagagacagcccttgctgctttcctttcctact	: 2905
seq s :	CGTCTTCCAGCAGGGGATGAAGAACAAGATCTTAATATTTGGC-----	: 330
seq as :	CGTCTTCCAGCAGGGGATGAAGAACAAGATCTTAATATTTGGC-----	: 330
	CGTCTTCCAGCAGGGGATGAAGAACAAGATCTTAATATTTGGC	

Abb. 32 Natrium-Kalium-ATPase. Das sequenzierte Produkt ist mit der Vorlage vom Schaf (NaKA ov) innerhalb des dargestellten Bereiches von 330 Basenpaaren zu 100% homolog.

## Ergebnisse

	*	100	*	120	*	140	*	160	*		
MCT1 ov :	catccttatcaggcagtggtctgattgctgcttcctctgtaaacactgtgcaggaactttacttttctgttggagtcattggaggtc									: 172	
seq s :	-----ACTTTTCTGTTGGAGTCATTGGAGGTC-----									: 27	
seq as :	-----ACTTTTCTGTTGGAGTCATTGGAGGTC-----									: 27	
		180	*	200	*	220	*	240	*	2	
MCT1 ov :	ttgggcttgccctcaacttaaatccggctttgaccatgattggcaaatatttctataagagacgaccgctggcaaatggactagcc										: 258
seq s :	TTGGGCTTGCCCTCAACTAAATCCGGCTTTGACCATGATTGGCAAATATTCTATAAGAGACGACCGCTGGCAAATGGACTAGCC										: 113
seq as :	TTGGGCTTGCCCTCAACTAAATCCGGCTTTGACCATGATTGGCAAATATTCTATAAGAGACGACCGCTGGCAAATGGACTAGCC										: 113
		60	*	280	*	300	*	320	*	340	
MCT1 ov :	atggcaggcagccctgtgttccctctaccctggccccctcaaccaggctttctttatgatctatggctggagaggaagcttcc										: 344
seq s :	ATGCAGGCAGCCCTGTGTCC-----										: 135
seq as :	ATGCAGGCAGCCCTGTGTCC-----										: 135
		ATGCAGGCAGCCCTGTGTCC									

Abb. 33 Monocarboxylat-Transporter 1. Das sequenzierte Produkt ist mit der Vorlage vom Schaf (MCT1 ov) innerhalb des dargestellten Bereiches von 135 Basenpaaren zu 100% homolog.

	*	660	*	680	*	700	*	720			
NHERF1 hum :	acgtggtgtccgccaatcagggtcggcggaacagacccaagctgctggtggtggacagggaaactgacgagttcttcaag									: 720	
seq s :	-----AGTTCTTCAAG-----									: 11	
seq as :	-----AGTTCTTCAAG-----									: 11	
		740	*	760	*	780	*	800			
NHERF1 hum :	aaatgcagagtgatcccatccaggagcacctgaatggtccctgcctgtgcccctcaccaatggggagatcacagaagga										: 800
seq s :	AAATGCAAGTGATCCCTCCAGGAGCACCTGCAAGGTCCCTGCCTGAGCCCATACCAAACGGGGAGATCCAGAAGGA										: 91
seq as :	AAATGCAAGTGATCCCTCCAGGAGCACCTGCAAGGTCCCTGCCTGAGCCCATACCAAACGGGGAGATCCAGAAGGA										: 91
		820	*	840	*	860	*	880			
NHERF1 hum :	gaacagtcgtgaagccctggcagagggcagcctggagagccccaggccagccctggtgagatccgcctccagtacacca										: 880
seq s :	GAACAGT-----										: 98
seq as :	GAACAGT-----										: 98
		GAACAGT									

Abb. 34 Natrium-Protonen-Austauscher regulating factor 1. Das sequenzierte Produkt vom Schaf ist mit der Vorlage vom Menschen (NHERF1 hum) innerhalb des dargestellten Bereiches von 98 Basenpaaren zu 87,7% homolog.

### 3.7 Ergebnisse der RNA-Extraktion

Die an der gleichen Stelle im Pansen der Versuchstiere gewonnenen Pansenzotten wurden gemäß dem Protokoll zur RNA-Extraktion verarbeitet (s. 2.5.2). Im Endprodukt (RNA gelöst in 50 µl RNase freiem Wasser) wurden in der spektralphotometrischen Analyse (s. 2.5.2.3) Konzentrationen von 294 - 1232 ng/µl RNA mit einer durchschnittlichen Konzentration von 698 ng/µl festgestellt. Im Photometer wurde bei allen Proben bei 260 nm eine höhere Extinktion festgestellt als bei 230 nm (s. 2.5.2.3). Es erfolgte eine Verdünnung auf 100 ng/µl, die im Agilent Bioanalyser überprüft wurde (s. 2.5.2.4). Im Anschluss an die Qualitätskontrolle wurden 100 ng RNA (= 1 µl) in die cDNA-Synthese (s. 2.5.3) eingesetzt. Dabei wurde nur RNA verwendet, die eine RIN (RNA-integrity-number) von über 7 (s. 2.5.2.4) aufwies (Ausnahme: Nr. 1102, RIN = 5,2). Neben den 21 Proben der Tiere für die Ussing-Kammer-Versuche wurden hier die RNA von einem Ersatztier und von 3 Tieren mit Pansenfistel untersucht und ausgewertet. Es ergibt sich daher insgesamt eine Probenanzahl von 25.

### 3.8 Ergebnisse der relativen Quantifizierung

#### 3.8.1 Etablierung der Assays mittels Regressionsanalyse

Bevor mittels „Real-Time-PCR“ (s. 2.5.4) die relative Quantifizierung stattfinden konnte, musste für jedes Zielgen (ACS2, AE2,  $\beta$ -Aktin, CA1, CA2, MCT1, NaKA NHE1, NHE3, NHERF1, vHATPase B und E) die Etablierung des entsprechenden Assays vorgenommen werden (s. 2.5.4.11). Das Ergebnis der Etablierung ist in Abb. 35 für das Gen NHERF1 beispielhaft dargestellt.

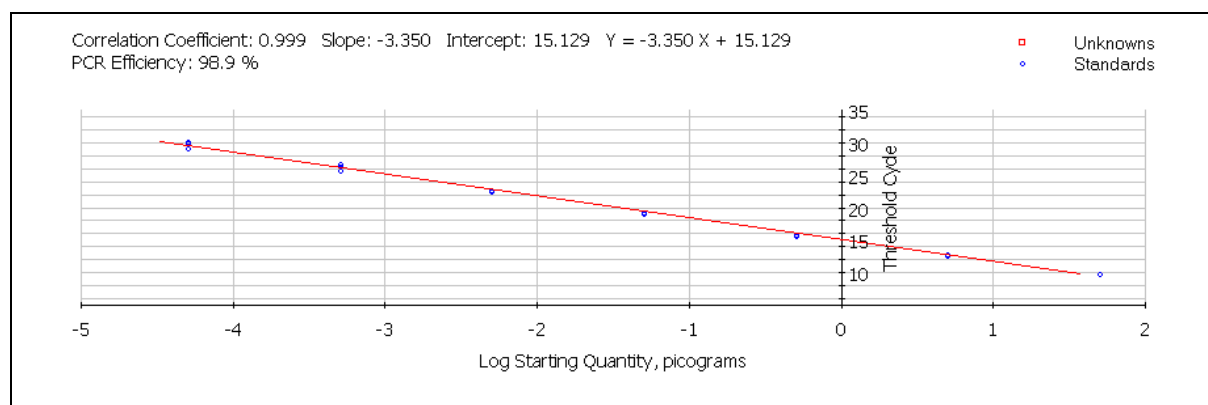


Abb. 35 Graphische Darstellung der Regressionsanalyse von NHERF1. Zur Bestimmung der PCR-Effizienz wird mittels Regressionsanalyse die Ausgangsmenge an Target-DNA gegen die Zykluszahl (CT) in einer logarithmischen Funktion dargestellt. Bei einer Steigung (Slope) der Regressionsgeraden von  $-3,333$  (absteigende Verdünnungsreihe) liegt die PCR-Effizienz bei 100%.

Die PCR-Effizienz lag bei allen verwendeten Primerpaaren über 93% (s. Tab. 17). Der Korrelationskoeffizient ist dabei ein Maß für die Linearität der PCR-Effizienz in variierenden Mengengebieten der eingesetzten Kopienzahl und beträgt im idealen Fall 1 (s. 2.5.4.11).

Tab. 17 Effizienzdaten der qPCR-assays

Target	Korrelations-Koeffizient	Slope	PCR-Effizienz (%)	Linearer Konzentrations-Bereich in pg	$T_M$ des PCR-Produktes
ACS2	1	-3,464	94,4	50-0,0005	83,5
AE2	0,998	-3,342	99,20	50 – 0,05	85
CA1	1	-3,422	96	50 – 0,005	81,5
CA2	1	-3,416	96,2	500 – 0,005	81,5
MCT1	1	-3,308	100,6	50 – 0,005	81,5
NaKA	1	-3,485	93,6	5 – 0,005	82,5
NHE1	0,999	-3,480	93,80	500 – 0,005	88
NHE3	0,998	-3,337	99,40	500 – 0,005	87
NHERF1	0,999	-3,35	98,9	50 – 0,00005	85

Target	Korrelations-Koeffizient	Slope	PCR-Effizienz (%)	Linearer Konzentrations-Bereich in pg	T <sub>M</sub> des PCR-Produktes
β-Aktin	1	-3,331	99,60	500 – 0,005	84,5
VHATPase B	0,999	-3,363	98,30	50 – 0,005	80
vHATPase E	0,999	-3,353	98,70	500 – 0,05	83

### 3.8.2 Beurteilung und Berechnung der Ergebnisse

Die aus der „Real-Time-PCR“ gewonnenen Fluoreszenzdaten werden zunächst beurteilt (s. 2.5.4.5). Die sich hieraus ergebenden Fluoreszenzmittelwerte wurden zur relativen Quantifizierung verwendet (s. 2.5.4.7). Die so berechneten FC-Werte (Fold change, Definition s. 2.5.4.7) geben Auskunft über die relative Expressionsrate des entsprechenden Targetgens unter definierten Bedingungen.

### 3.8.3 Relative Expressionsraten an Pansenepithelgeweben

Für jedes untersuchte Gen werden im Folgenden 3 Darstellungen gezeigt:

In der ersten Darstellung sind die FC-Werte für jedes Zielgen jeweils für die Kontrollgruppe (Heufütterung = 0 Tage KF) und die Testgruppen (2., 4., 7., 14., 28. und 42. Tag der Krafftutterzulage (2, 4, 7, 14, 28, 42 Tage KF)) als Einzelpunkte (pro Tier bzw. RNA-Probe) an den entsprechenden Tagen auf der Zeitachse (x-Achse) abgebildet. Die Punkte jeder Testgruppe stellen die FC-Werte der einzelnen Testproben gegenüber dem Median der Basisproben dar.

Die zweite Darstellung zeigt die FC-Werte der Testgruppen und der Basisgruppe für das Kontrollgen (β-Aktin). Die Werte der Testgruppen zeigen die Transkriptionsraten des Kontrollgens bezogen auf den Median der Basisgruppe.

Die dritte Grafik stellt die prozentuale Verteilung der FC-Werte der einzelnen Testproben für das untersuchte Gen gegenüber dem Median des normalisierten Gens der entsprechenden Basisproben dar. Die Verteilung der FC-Werte wird pro Fütterungsgruppe (x-Achse) durch Einteilung in 3 Untergruppen (Gruppe 1: FC-Werte < 0,5, Gruppe 2: FC-Werte von 0,5 bis 2, Gruppe 3: FC-Werte > 2) wiedergegeben. Ein klares Übergewicht an Proben in der Gruppe > 2 zeigt mit großer Sicherheit eine Zunahme der relativen mRNA-Kopienzahl an, während ein klares Übergewicht an Proben in der Gruppe < 0,5 mit großer Sicherheit als Abnahme der relativen mRNA-Kopienzahl zu bewerten ist. Wenn sich die Werte zum erheblichen Teil in der Gruppe >0,5 und <2 befinden, ist kein Unterschied in der relativen mRNA-Kopienzahl zwischen den Testproben und den Basisproben der jeweiligen Fütterungsgruppe vorhanden.

### 3.8.3.1 FC-Werte der Transportproteine

#### Die Natrium-Protonen-Austauscher (NHE 1 und 3) und der NHE-regulating-factor

Die Transportproteine NHE1 (Natrium-Protonen-Austauscher Isoform 1) und NHE3 (Natrium-Protonen-Austauscher Isoform 3) befinden sich auf der basolateralen (NHE1) sowie sehr wahrscheinlich auf der apikalen (NHE3) Seite der Epithelzellen. Beide befördern Natrium in die Zelle und Protonen in den Extrazellulärraum (s. 1.4.3, 1.5.2.1).

Der NHERF1 (Natrium-Protonen-Austauscher 3 regulating factor 1) ist ein PDZ-Domäne-Protein, das im Zusammenschluss mit anderen Proteinen in einem Multiproteinkomplex durch eine cAMP-abhängige Phosphorylierung des NHE3 eine Hemmung des Protonen-Austauschers hervorrufen kann (s. 1.5.2.2).

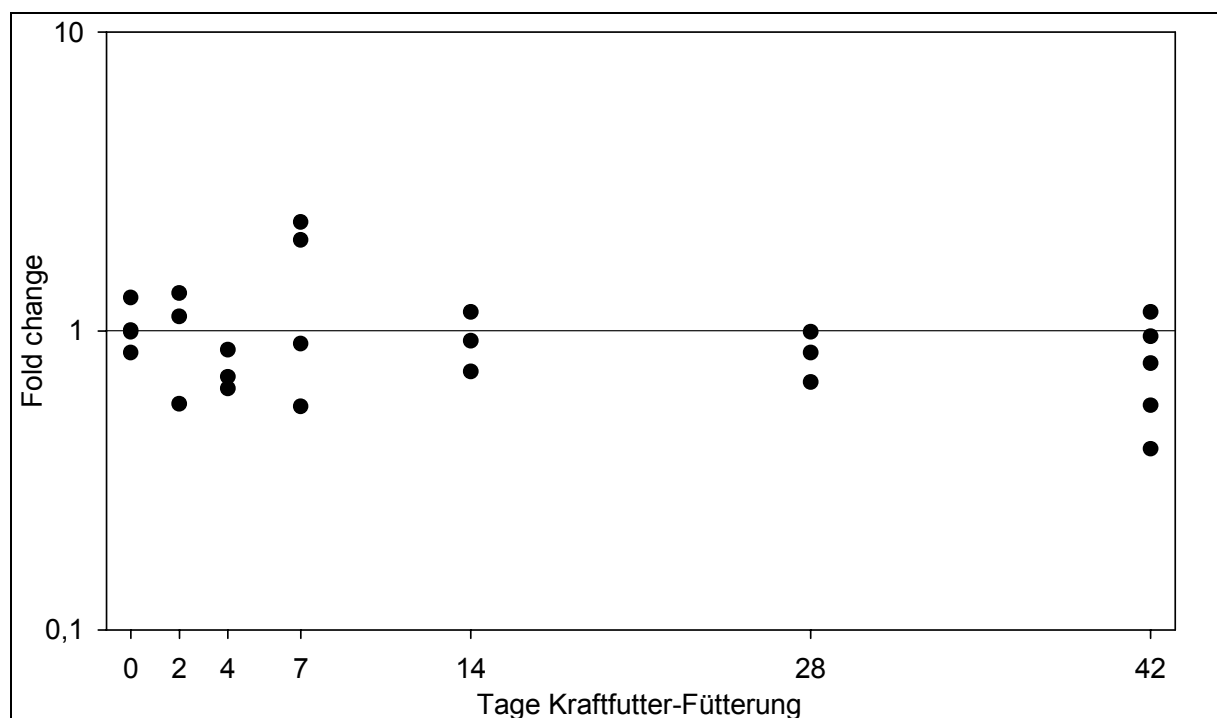


Abb. 36 FC-Werte für NHE1. Jeder Einzelpunkt entspricht dem FC-Wert einer Pansenepithel-Probe von einem Versuchstier. In den Fütterungsgruppen wurden jeweils 3 – 5 Proben untersucht. Die Punkte der 6 Testgruppen (2. – 42. Tag der Kraftfutterfütterung) sind bezogen auf den Median (= 1) der Basisgruppe (Heufütterung = Tag 0 der Kraftfutterfütterung).

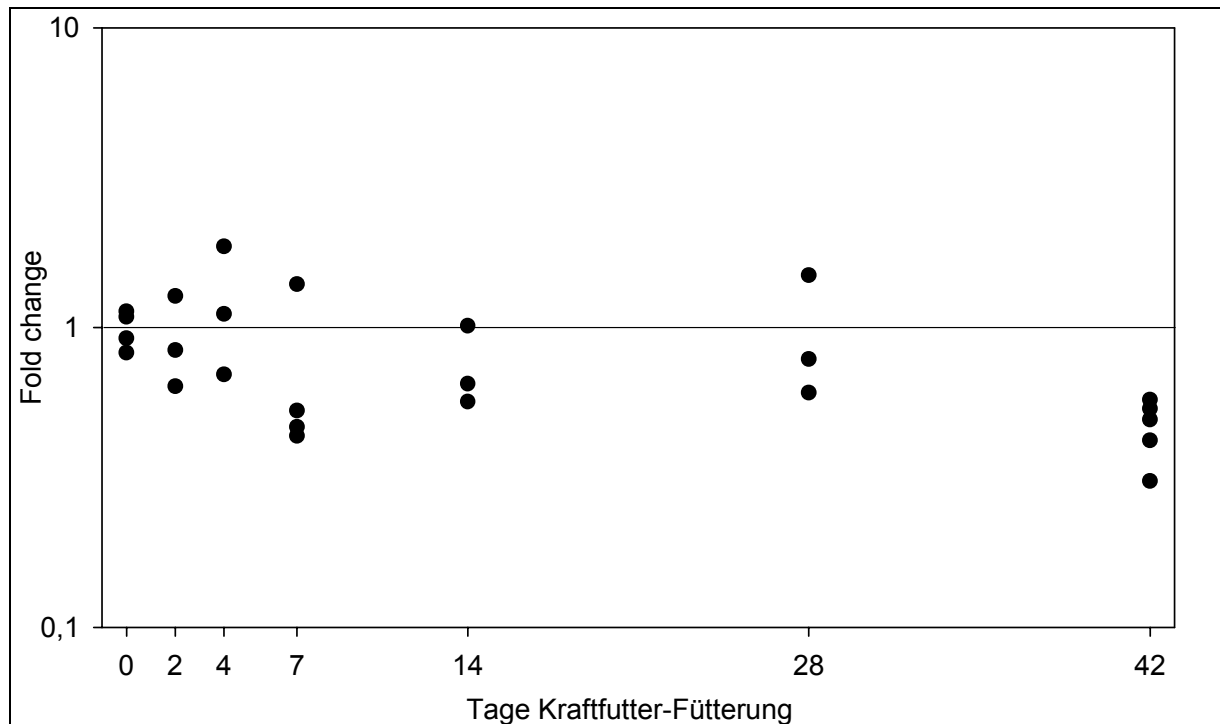


Abb. 37 FC-Werte des Kontrollgens ( $\beta$ -Aktin) für NHE1. Jeder Einzelpunkt entspricht dem FC-Wert des Referenzgenes einer Pansenepithel-Probe von einem Versuchstier. In den Fütterungsgruppen wurden jeweils 3 – 5 Proben untersucht. Die Punkte der 6 Testgruppen (2. – 42. Tag der Krafffutterfütterung) sind bezogen auf den Median (= 1) der Basisgruppe (Heufütterung = Tag 0 der Krafffutterfütterung).

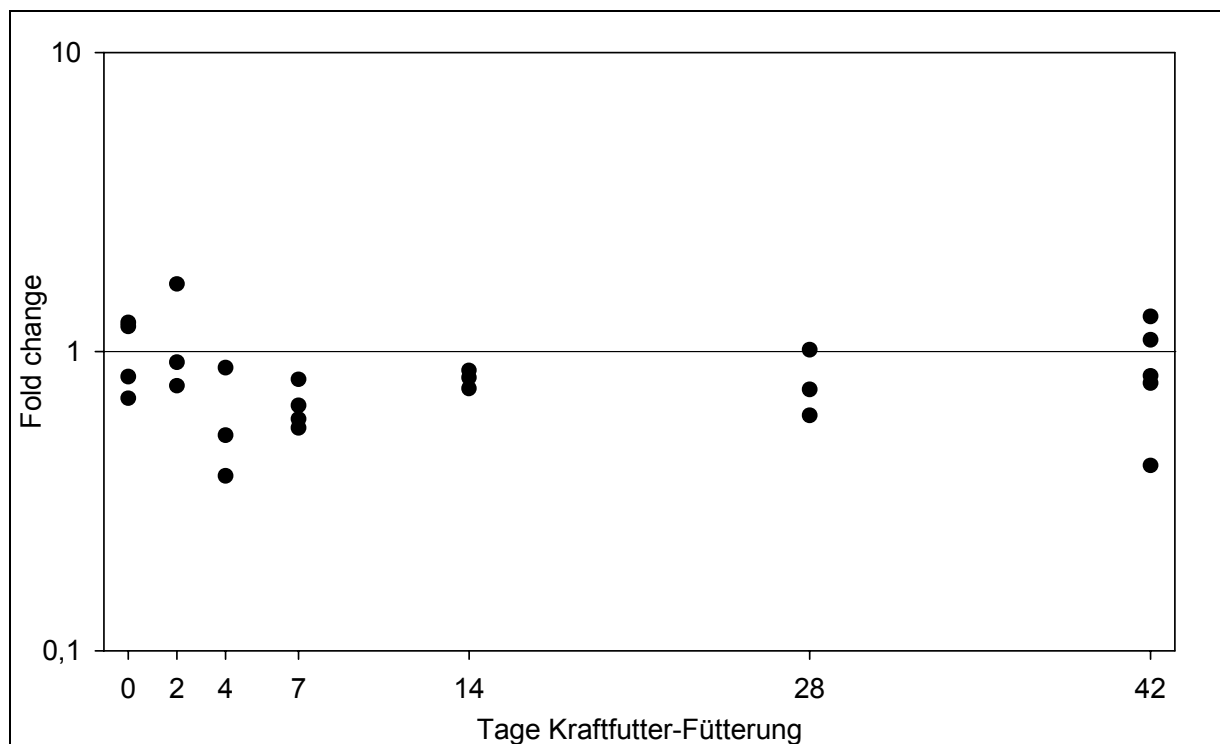


Abb. 38 FC-Werte für NHE3. Jeder Einzelpunkt entspricht dem FC-Wert einer Pansenepithel-Probe von einem Versuchstier. In den Fütterungsgruppen wurden jeweils 3 – 5 Proben untersucht. Die Punkte der 6 Testgruppen (2. – 42. Tag der Krafffutterfütterung) sind bezogen auf den Median (= 1) der Basisgruppe (Heufütterung = Tag 0 der Krafffutterfütterung).

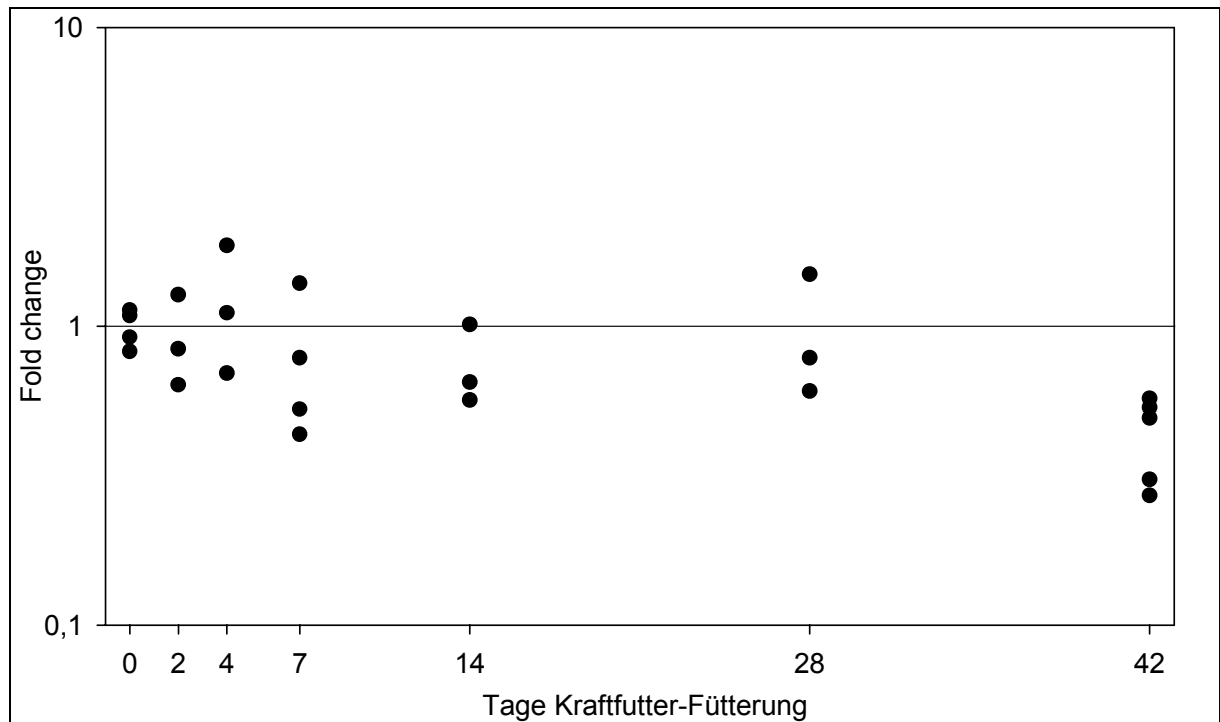


Abb. 39 FC-Werte des Kontrollgens ( $\beta$ -Aktin) für NHE3. Jeder Einzelpunkt entspricht dem FC-Wert des Referenzgenes einer Pansenepithel-Probe von einem Versuchstier. In den Fütterungsgruppen wurden jeweils 3 – 5 Proben untersucht. Die Punkte der 6 Testgruppen (2. – 42. Tag der Kraftfutterfütterung) sind bezogen auf den Median (= 1) der Basisgruppe (Heufütterung = Tag 0 der Kraftfutterfütterung).

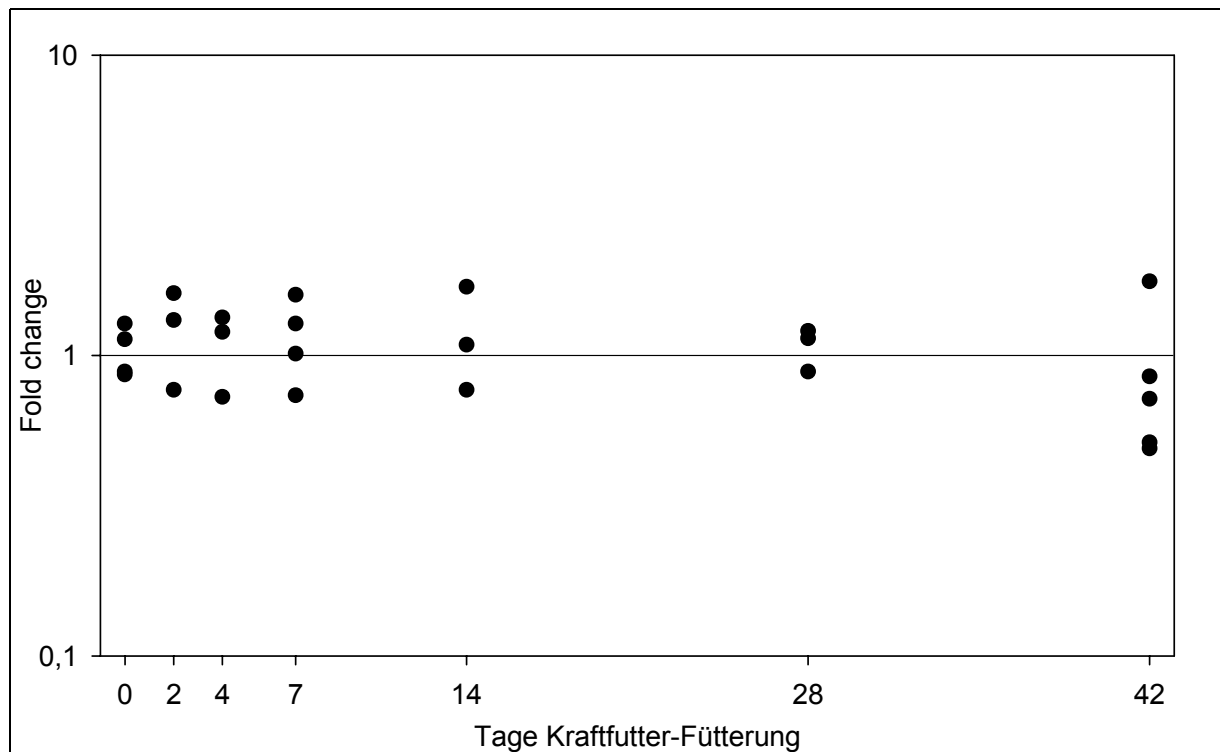


Abb. 40 FC-Werte für NHERF1. Jeder Einzelpunkt entspricht dem FC-Wert einer Pansenepithel-Probe von einem Versuchstier. In den Fütterungsgruppen wurden jeweils 3 – 5 Proben untersucht. Die Punkte der 6 Testgruppen (2. – 42. Tag der Kraftfutterfütterung) sind bezogen auf den Median (= 1) der Basisgruppe (Heufütterung = Tag 0 der Kraftfutterfütterung).

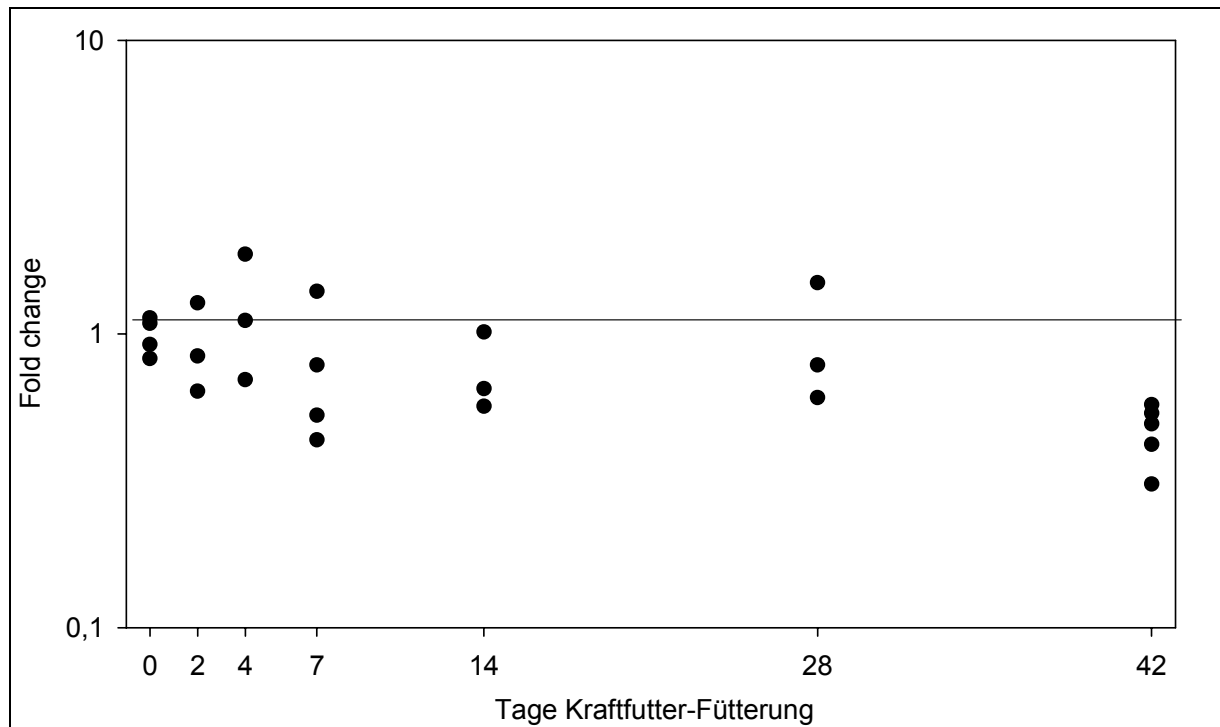


Abb. 41 FC-Werte des Kontrollgens ( $\beta$ -Aktin) für NHERF1. Jeder Einzelpunkt entspricht dem FC-Wert des Referenzgenes einer Pansenepithel-Probe von einem Versuchstier. In den Fütterungsgruppen wurden jeweils 3 – 5 Proben untersucht. Die Punkte der 6 Testgruppen (2. – 42. Tag der Kraftfutterfütterung) sind bezogen auf den Median (= 1) der Basisgruppe (Heufütterung = Tag 0 der Kraftfutterfütterung).



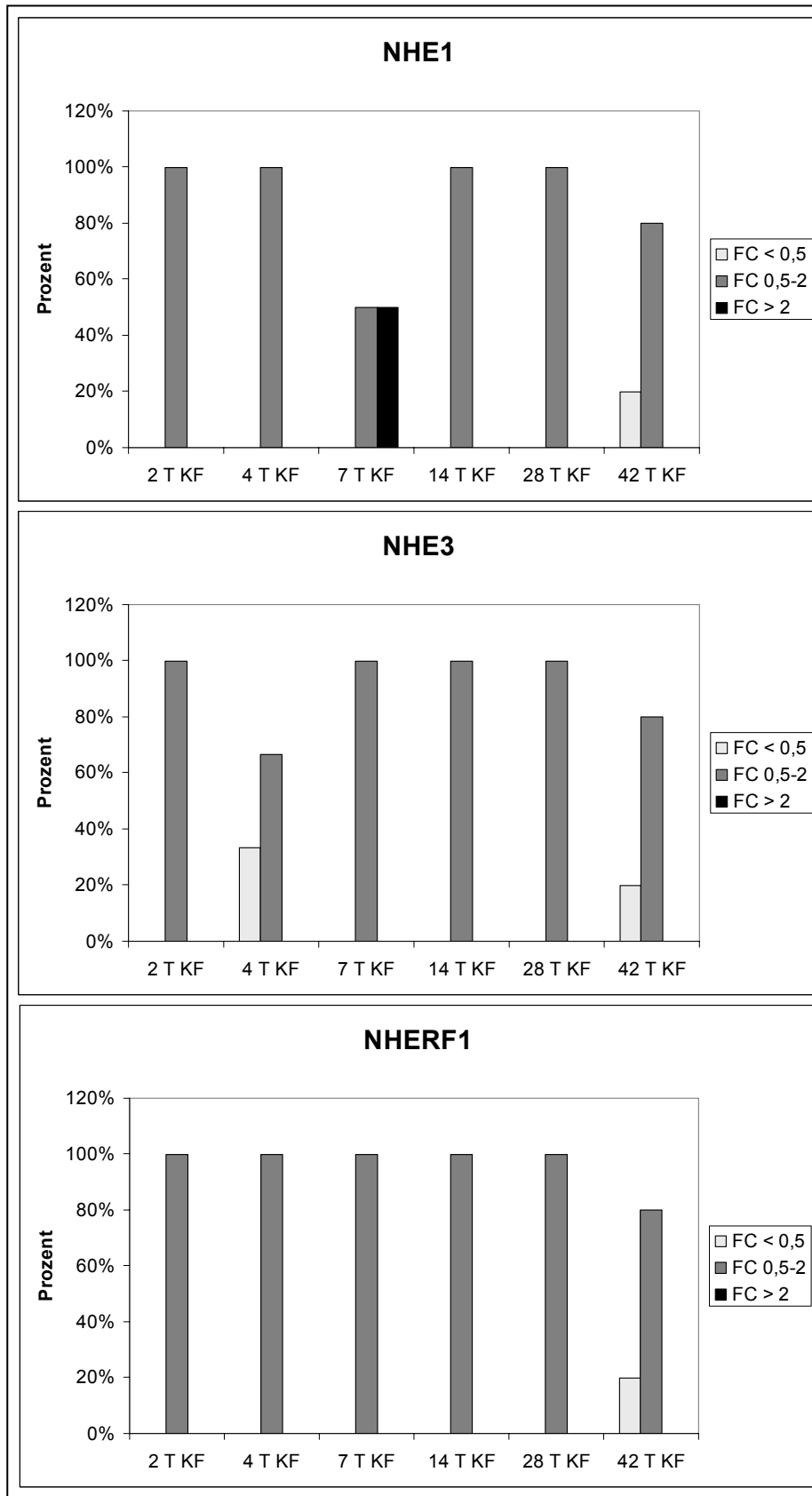


Abb. 42 Verteilung der FC-Werte für NHE1, NHE3 und NHERF1. Der prozentuale Anteil der FC-Werte in den FC-Wert-Gruppen FC <0,5, FC 0,5-2 und FC >2 ist für alle Untersuchungszeitpunkte (2 T KF bis 42 T KF) dargestellt; T KF = Tage Krafftutter-Fütterung; FC = Fold change.

Die beiden Isoformen NHE1 und NHE3 weisen nur geringfügige Änderungen in der relativen mRNA-Kopienzahl auf, mindestens 50% der FC-Werte befinden sich zu allen Untersuchungszeitpunkten zwischen 0,5 und 2 (s. Abb. 36 und Abb. 38). Bei NHE1 sind am 7. Tag jedoch auch 50% der FC-Werte über 2 (2 Tiere von 4) und für NHE3 ergibt sich eine abnehmende Tendenz der mRNA-Menge am 4. Tag mit 33% (1 Tier von 3).

Das PDZ-Protein NHERF1 bleibt im Wesentlichen auch bei einem Fold change von 1 (s. Abb. 40). Alle drei Gene haben die Gemeinsamkeit, dass am 42 Tag 20% der FC-Werte unter 0,5 liegen (s. Abb. 42).

### Der Monocarboxylat-Transporter 1 (MCT1) und der Anion-Austauscher 2 (AE2)

Der Monocarboxylat-Transporter 1 (MCT1) befördert basolateral Protonen und Ketonkörper sowie Lactat aus der Zelle heraus (s. 1.5.2.7)

Der Anion-exchanger 2 (AE2) gehört zur SLC4-Genfamilie und tauscht Chlorid-Ionen gegen Bicarbonat aus (s. 1.5.2.3, Tab. 3).

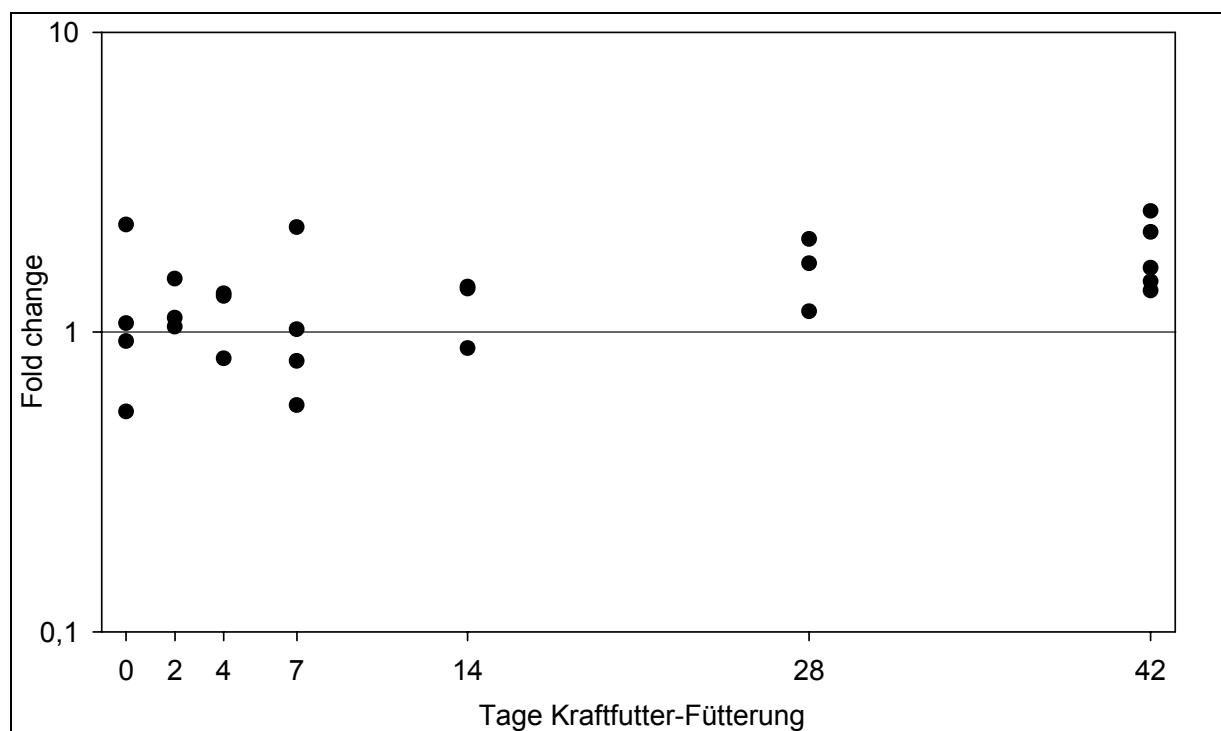


Abb. 43 FC-Werte für MCT1. Jeder Einzelpunkt entspricht dem FC-Wert einer Pansenepithel-Probe von einem Versuchstier. In den Fütterungsgruppen wurden jeweils 3 – 5 Proben untersucht. Die Punkte der 6 Testgruppen (2. – 42. Tag der Kraffutterfütterung) sind bezogen auf den Median (= 1) der Basisgruppe (Heufütterung = Tag 0 der Kraffutterfütterung).

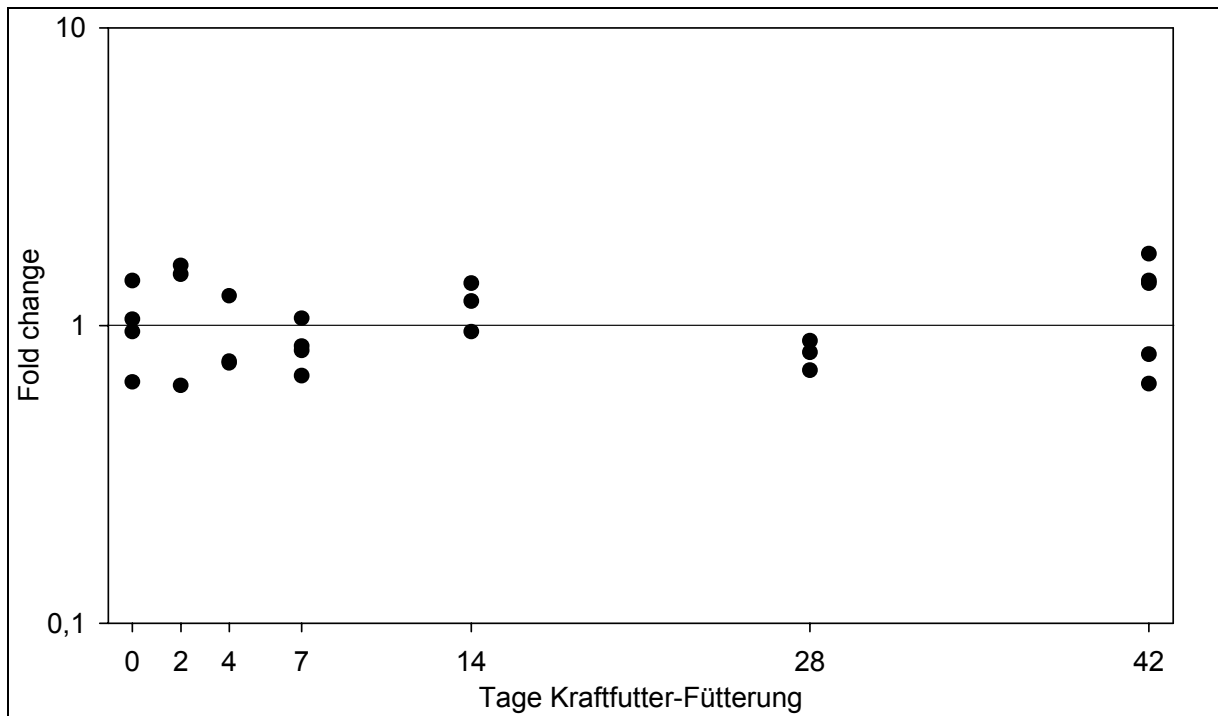


Abb. 44 FC-Werte für AE2. Jeder Einzelpunkt entspricht dem FC-Wert einer Pansenepithel-Probe von einem Versuchstier. In den Fütterungsgruppen wurden jeweils 3 – 5 Proben untersucht. Die Punkte der 6 Testgruppen (2. – 42. Tag der Kraffutterfütterung) sind bezogen auf den Median (= 1) der Basisgruppe (Heufütterung = Tag 0 der Kraffutterfütterung).

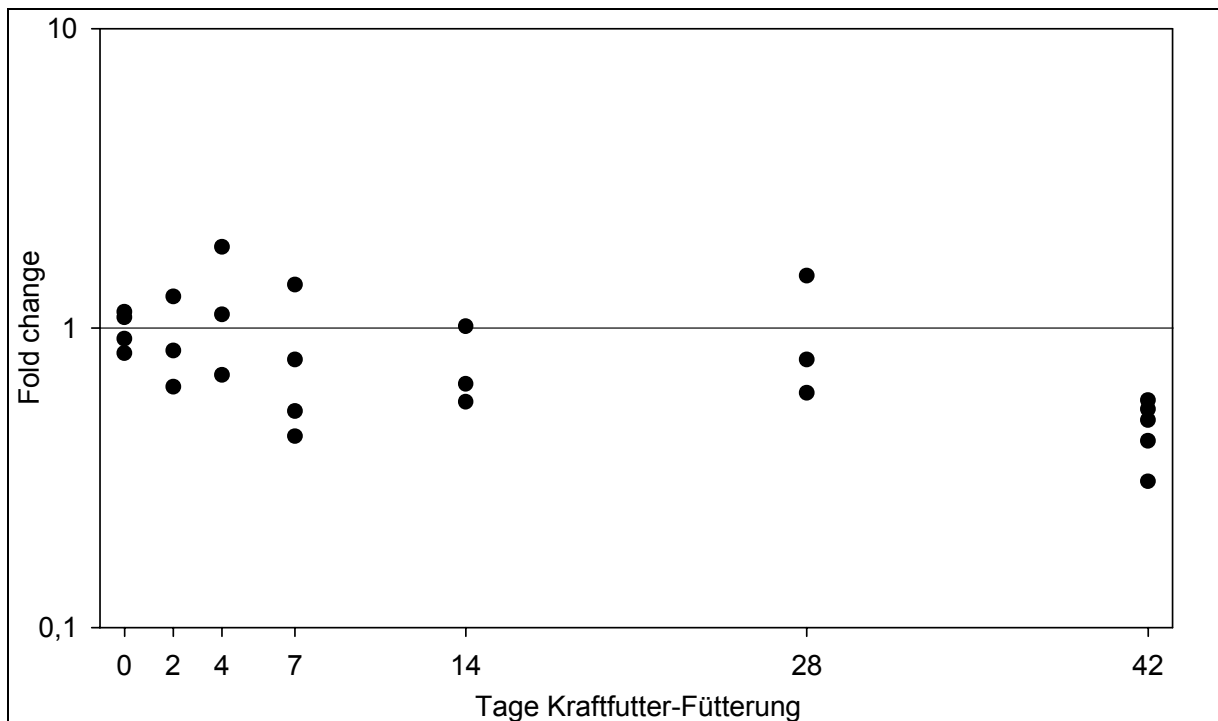


Abb. 45 FC-Werte des Kontrollgens ( $\beta$ -Aktin) für MCT1 und AE2. Jeder Einzelpunkt entspricht dem FC-Wert des Referenzgenes einer Pansenepithel-Probe von einem Versuchstier. In den Fütterungsgruppen wurden jeweils 3 – 5 Proben untersucht. Die Punkte der 6 Testgruppen (2. – 42. Tag der Kraffutterfütterung) sind bezogen auf den Median (= 1) der Basisgruppe (Heufütterung = Tag 0 der Kraffutterfütterung).

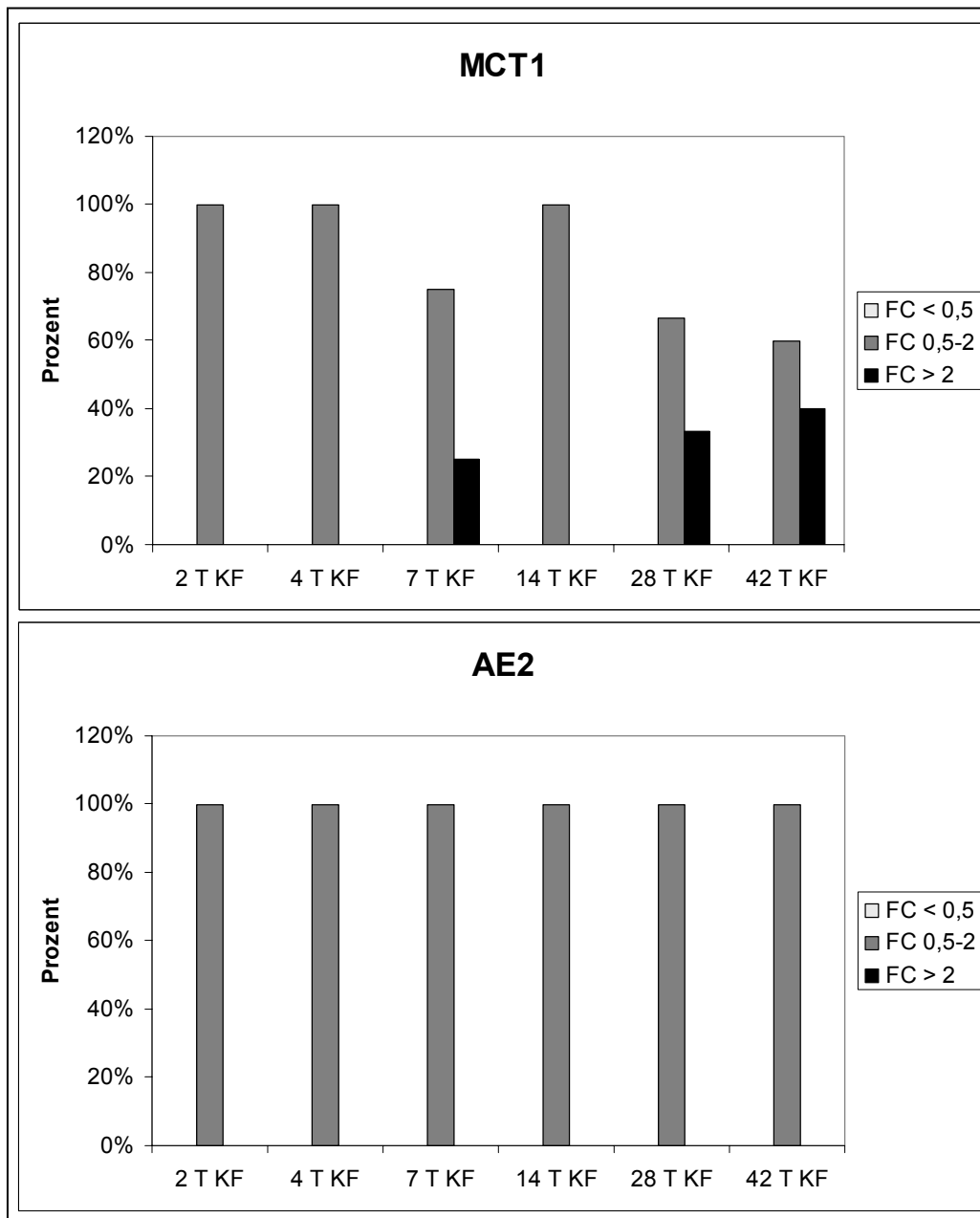


Abb. 46 Verteilung der FC-Werte für MCT1 und AE2. Der prozentuale Anteil der FC-Werte in den FC-Wert-Gruppen FC < 0,5, FC 0,5-2 und FC > 2 ist für alle Untersuchungszeitpunkte (2 T KF bis 42 T KF) dargestellt; T KF = Tage Kraftfutter-Fütterung; FC = Fold change.

Gegen Ende des Fütterungsversuches ist für MCT1 eine Tendenz zur Zunahme der FC-Werte über 2 feststellbar (1 Tier am 28. und 2 Tiere am 42. Tag) (s. Abb. 43, Abb. 46).

Dagegen zeigt der AE2 (Anion exchanger 2) keine Zu- oder Abnahme der relativen mRNA-Kopienzahl. Die FC-Werte sind hier sehr regelmäßig verteilt und bewegen sich um einen Mittelwert von 1 (s. Abb. 44, Abb. 46).

### 3.8.3.2 FC-Werte der Ionenpumpen: Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase Untereinheit $\alpha$ 1, vH-ATPase Untereinheit E und B

Die Ionenpumpen Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase und vH-ATPase befördern Ionen unter Aufwendung von Energie. Während die Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase Natrium-Ionen in den Extrazellulärraum und Kalium-Ionen im Austausch nach intrazellulär transportiert, verbringt die vH-ATPase ausschließlich Protonen aus der Zelle heraus (s. 1.5.2.4, 1.5.2.8).

Die Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase besteht aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit, von denen 4 ( $\alpha$ -Untereinheit) bzw. 3 Isoformen ( $\beta$ -Untereinheit) bekannt sind. Die untersuchte  $\alpha$ -Untereinheit ist die katalytische Untereinheit (s. 1.5.2.8).

Die vakuoläre Protonen-ATPase ist ein Komplex aus V0- und V1- Untereinheit, welche wiederum aus 8 (V1) und 6 (V0) Untereinheiten zusammengesetzt sind (s. 1.5.2.4). Die untersuchten Untereinheiten B und E gehören zur V1- Untereinheit (s. 1.5.2.4)

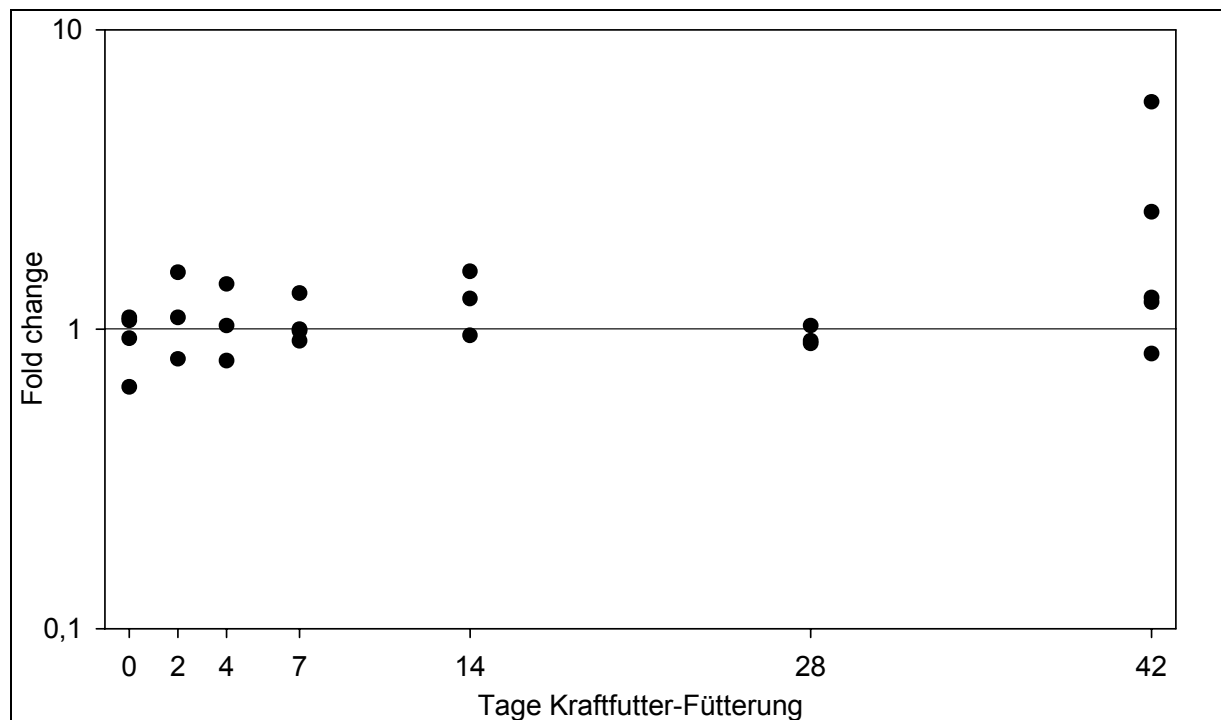


Abb. 47 FC-Werte für Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase Untereinheit  $\alpha$ 1. Jeder Einzelpunkt entspricht dem FC-Wert einer Pansenepithel-Probe von einem Versuchstier. In den Fütterungsgruppen wurden jeweils 3 – 5 Proben untersucht. Die Punkte der 6 Testgruppen (2. – 42. Tag der Kraftfutterfütterung) sind bezogen auf den Median (= 1) der Basisgruppe (Heufütterung = Tag 0 der Kraftfutterfütterung).

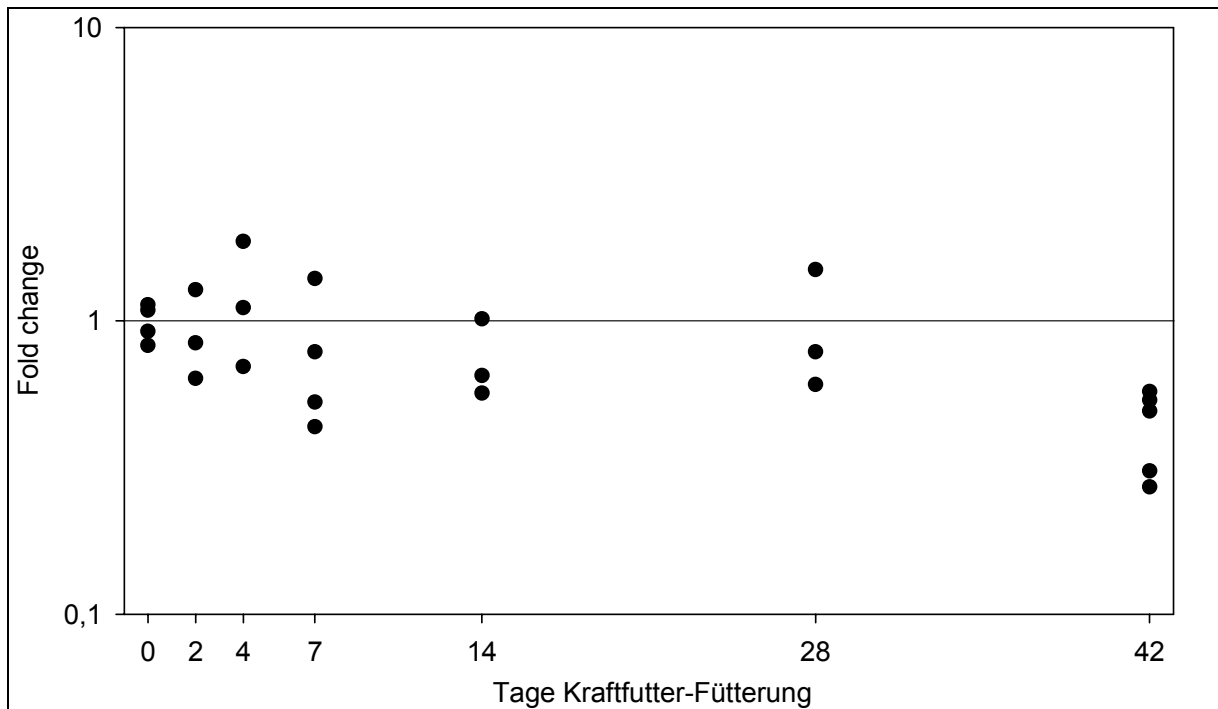


Abb. 48 FC-Werte des Kontrollgens ( $\beta$ -Aktin) für die  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase Untereinheit  $\alpha 1$ . Jeder Einzelpunkt entspricht dem FC-Wert des Referenzgenes einer Pansenepithel-Probe von einem Versuchstier. In den Fütterungsgruppen wurden jeweils 3 – 5 Proben untersucht. Die Punkte der 6 Testgruppen (2. – 42. Tag der Kraffutterfütterung) sind bezogen auf den Median (= 1) der Basisgruppe (Heufütterung = Tag 0 der Kraffutterfütterung).

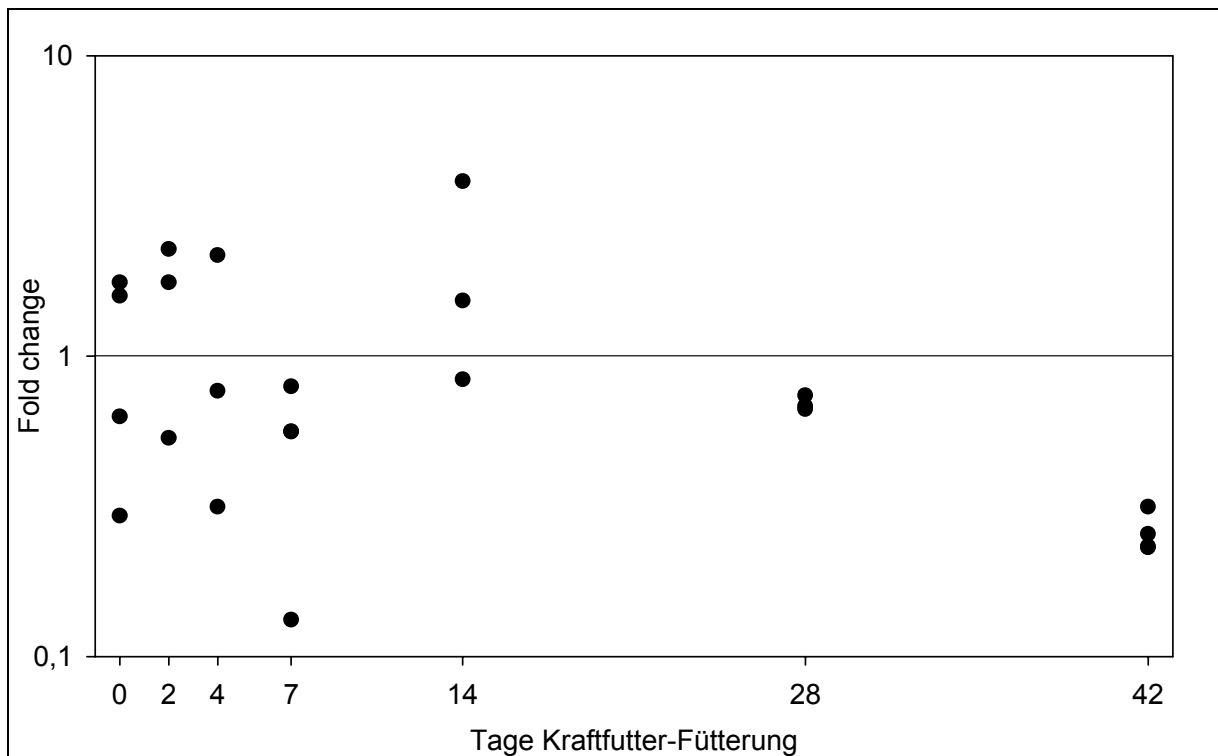


Abb. 49 FC-Werte für die vakuoläre Protonen-ATPase Untereinheit B. Jeder Einzelpunkt entspricht dem FC-Wert einer Pansenepithel-Probe von einem Versuchstier. In den Fütterungsgruppen wurden jeweils 3 – 5 Proben untersucht. Die Punkte der 6 Testgruppen (2. – 42. Tag der Kraffutterfütterung) sind bezogen auf den Median (= 1) der Basisgruppe (Heufütterung = Tag 0 der Kraffutterfütterung).

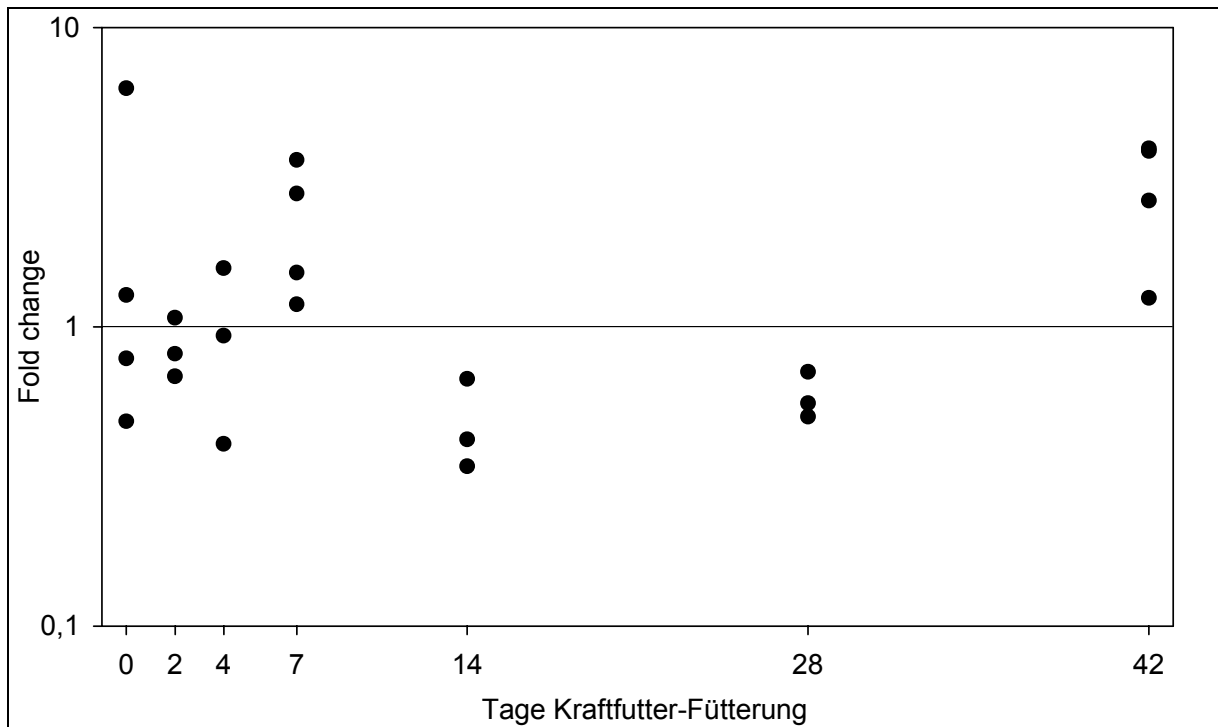


Abb. 50 FC-Werte des Kontrollgens ( $\beta$ -Aktin) für die vakuoläre Protonen-ATPase Untereinheit B. Jeder Einzelpunkt entspricht dem FC-Wert des Referenzgenes einer Pansenepithel-Probe von einem Versuchstier. In den Fütterungsgruppen wurden jeweils 3 – 5 Proben untersucht. Die Punkte der 6 Testgruppen (2. – 42. Tag der Kraftfutterfütterung) sind bezogen auf den Median (= 1) der Basisgruppe (Heufütterung = Tag 0 der Kraftfutterfütterung).

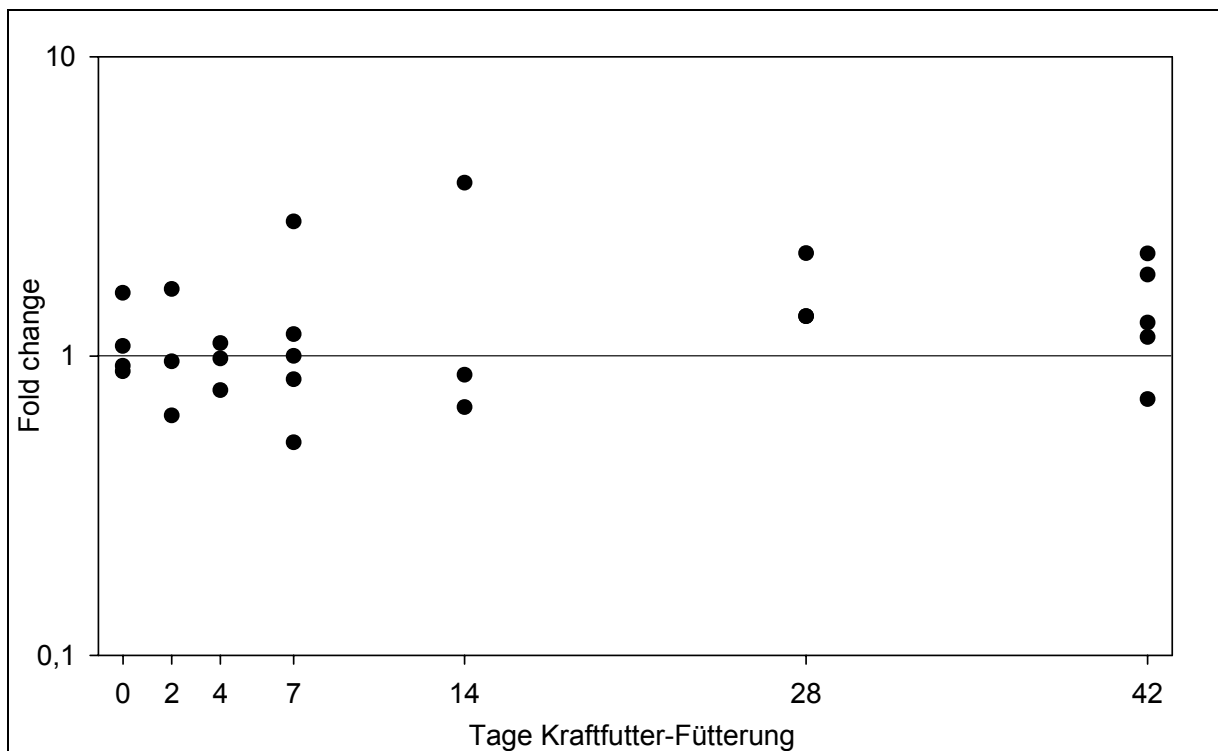


Abb. 51 FC-Werte für vakuoläre Protonen-ATPase Untereinheit E. Jeder Einzelpunkt entspricht dem FC-Wert einer Pansenepithel-Probe von einem Versuchstier. In den Fütterungsgruppen wurden jeweils 3 – 5 Proben untersucht. Die Punkte der 6 Testgruppen (2. – 42. Tag der Kraftfutterfütterung) sind bezogen auf den Median (= 1) der Basisgruppe (Heufütterung = Tag 0 der Kraftfutterfütterung).

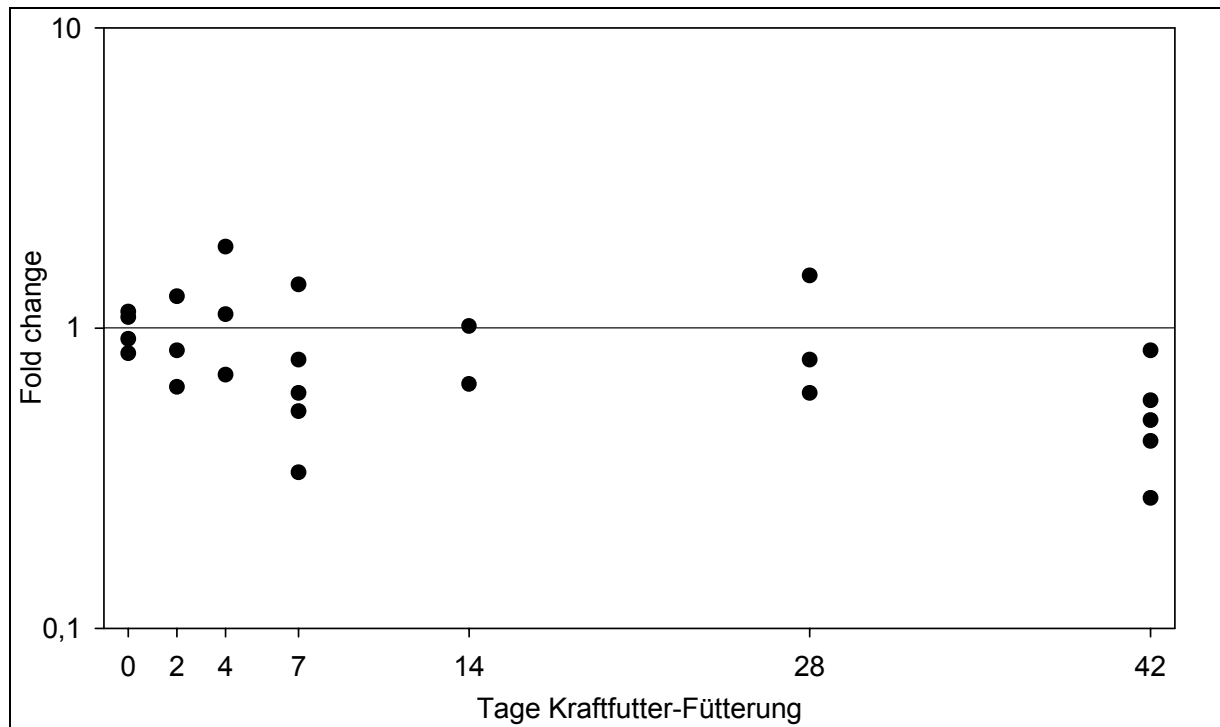


Abb. 52 FC-Werte des Kontrollgens ( $\beta$ -Aktin) für vakuoläre Protonen-ATPase Untereinheit E. Jeder Einzelpunkt entspricht dem FC-Wert des Referenzgenes einer Pansenepithel-Probe von einem Versuchstier. In den Fütterungsgruppen wurden jeweils 3 – 5 Proben untersucht. Die Punkte der 6 Testgruppen (2. – 42. Tag der Kraffutterfütterung) sind bezogen auf den Median (= 1) der Basisgruppe (Heufütterung = Tag 0 der Kraffutterfütterung).



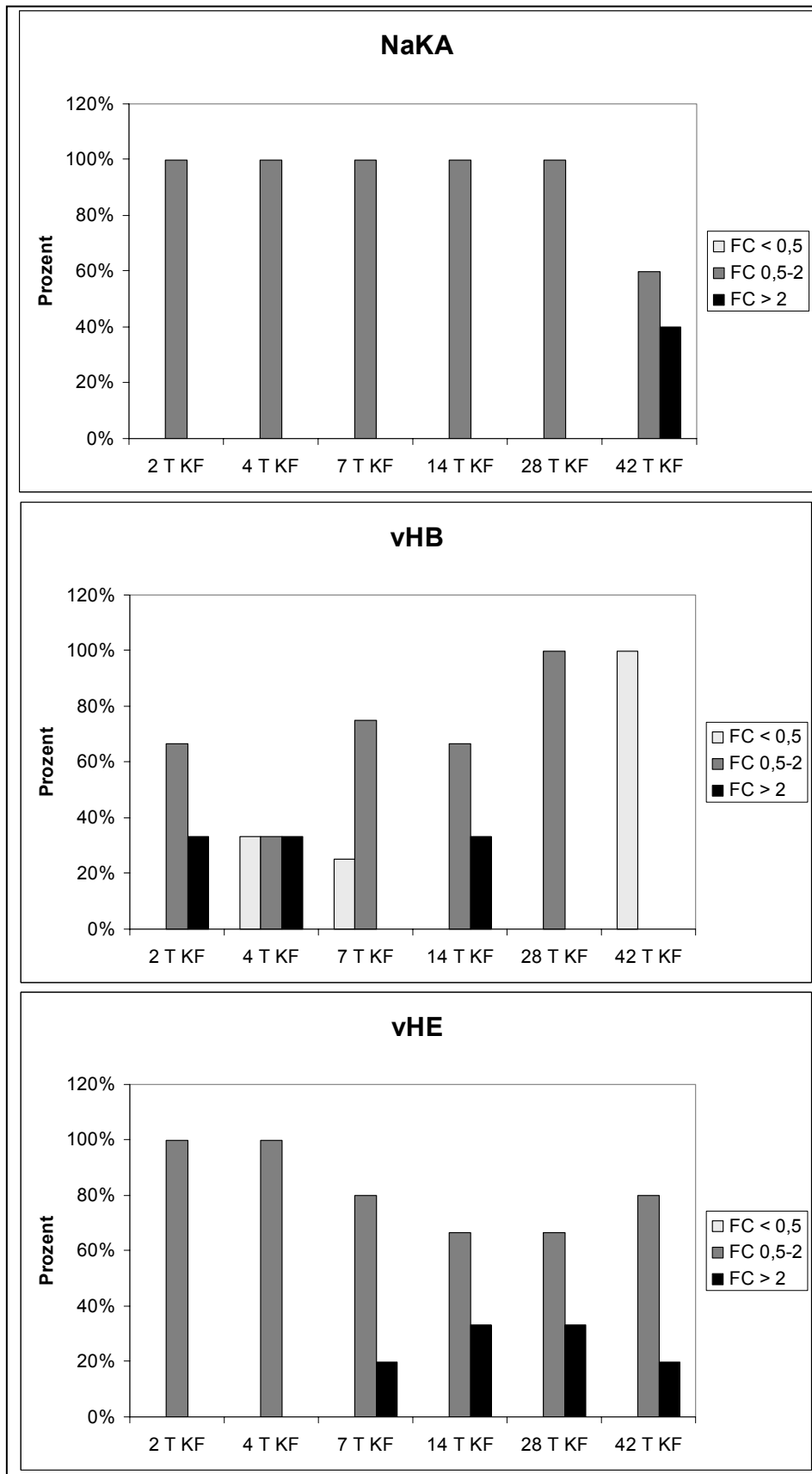


Abb. 53 Verteilung der FC-Werte bei den Ionnpumpen. Der prozentuale Anteil der FC-Werte in den FC-Wert-Gruppen FC < 0,5, FC 0,5-2 und FC > 2 ist für alle Untersuchungszeitpunkte (2 T KF bis 42 T KF) dargestellt; T KF = Tage Kraftfutter-Fütterung; FC = Fold change.

Bei den Ionenpumpen ergibt sich in der Verteilung der FC-Werte ein inhomogenes Bild (s. Abb. 53).

Die  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase Untereinheit  $\alpha 1$  weist bis zum 28. Tag sehr konstant und mit geringer Streuung FC-Werte um 1 auf, am Ende des Fütterungsversuches (42. Tag) liegen jedoch die FC-Werte zu 40% über 2. Dabei erreicht die Probe eines Tier sogar einen FC-Wert von 5,7 (s. Abb. 47).

Einer Abnahme der relativen mRNA-Kopienzahl der Untereinheit B zu 100% am 42. Tag KF (s. Abb. 49) steht eine große Streubreite des Kontrollgenes  $\beta$ -Aktin zu diesem Untersuchungszeitpunkt gegenüber (s. Abb. 50).

Die Tendenz zur Steigerung der mRNA-Menge der Untereinheit E am 7 - 42. Tag KF ist nur bei jeweils einem Tier vorhanden (s. Abb. 51).

### **3.8.3.3 FC-Werte für die Enzyme Karboanhydrase (1 und 2) und die Acetyl-CoA-Synthetase 2**

Die Isozyme 1 und 2 aus der Gruppe der Karboanhydrasen befinden sich im Zytosol und sind in der Lage, aus Protonen und Hydroxid-Ionen Wasser und Kohlendioxid herzustellen oder diese Reaktion umzukehren. Damit ist diese Enzymgruppe für die pH-Regulation der Zelle von großer Bedeutung (s. 1.5.2.5).

Die Acetyl-CoA-Synthetase aktiviert Acetat durch Kopplung mit Koenzym A. Das so entstandene Acetyl-CoA ist für die Zelle zur Fettsäurebiosynthese oder für den Citratzyklus nutzbar (s. 1.5.2.6).

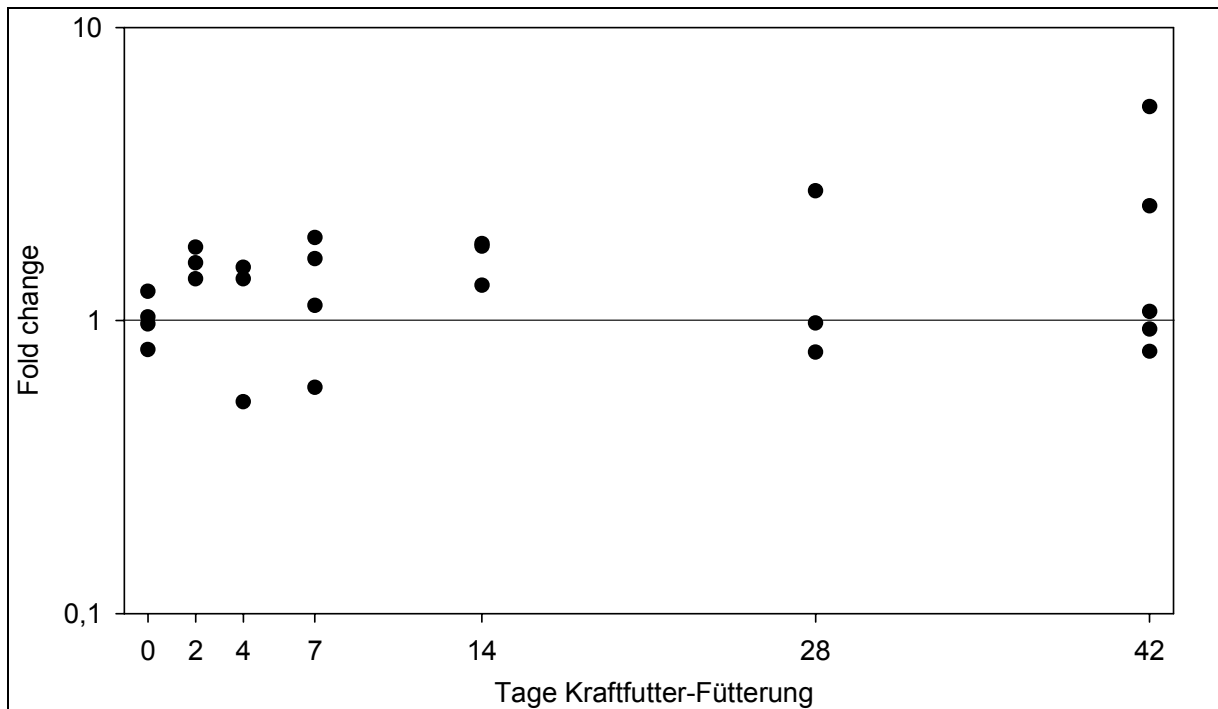


Abb. 54 FC-Werte für CA1. Jeder Einzelpunkt entspricht dem FC-Wert einer Pansenepithel-Probe von einem Versuchstier. In den Fütterungsgruppen wurden jeweils 3 – 5 Proben untersucht. Die Punkte der 6 Testgruppen (2. – 42. Tag der Kraftfutterfütterung) sind bezogen auf den Median (= 1) der Basisgruppe (Heufütterung = Tag 0 der Kraftfutterfütterung).

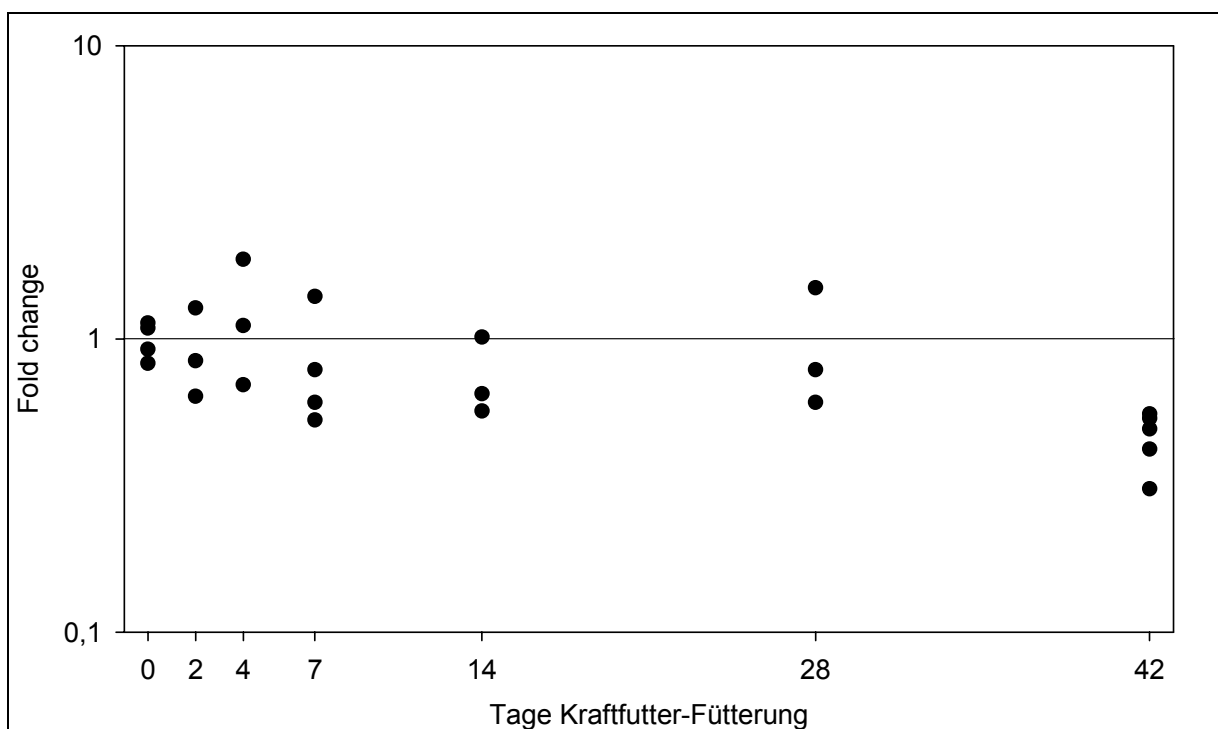


Abb. 55 FC-Werte des Kontrollgens ( $\beta$ -Aktin) für CA1. Jeder Einzelpunkt entspricht dem FC-Wert des Referenzgenes einer Pansenepithel-Probe von einem Versuchstier. In den Fütterungsgruppen wurden jeweils 3 – 5 Proben untersucht. Die Punkte der 6 Testgruppen (2. – 42. Tag der Kraftfutterfütterung) sind bezogen auf den Median (= 1) der Basisgruppe (Heufütterung = Tag 0 der Kraftfutterfütterung).

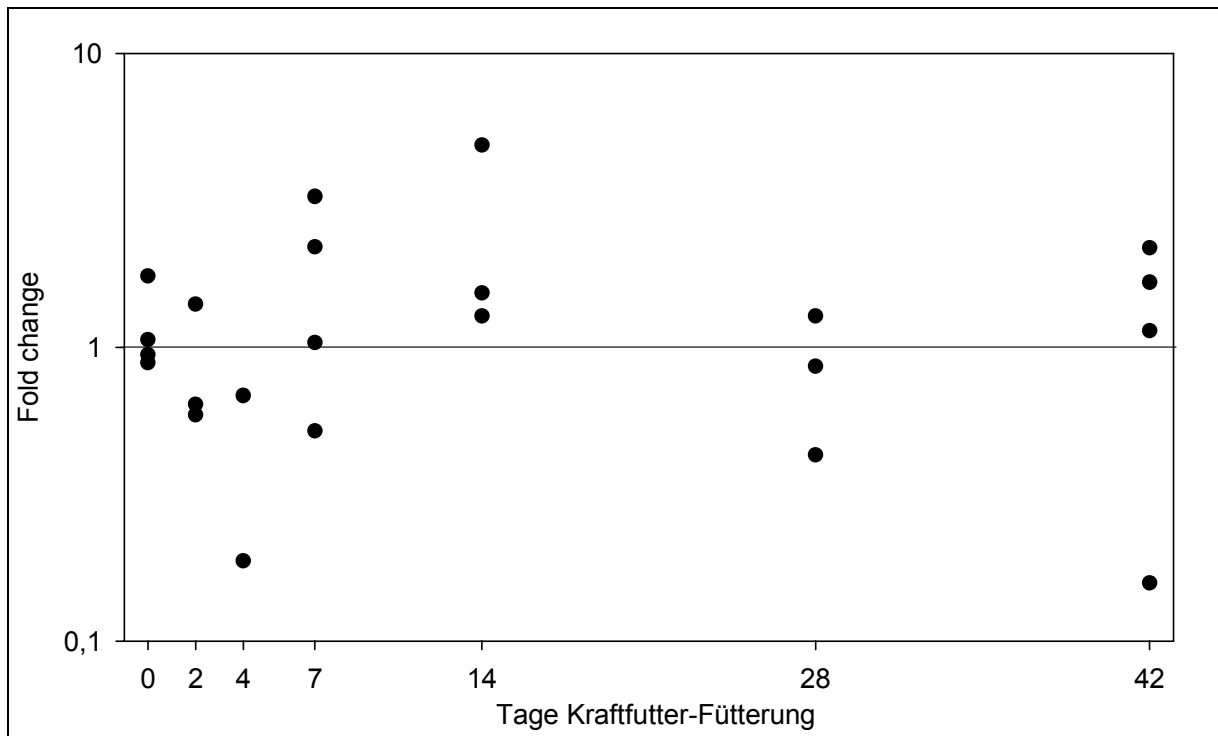


Abb. 56 FC-Werte für CA2. Jeder Einzelpunkt entspricht dem FC-Wert einer Pansenepithel-Probe von einem Versuchstier. In den Fütterungsgruppen wurden jeweils 3 – 5 Proben untersucht. Die Punkte der 6 Testgruppen (2. – 42. Tag der Kraftfutterfütterung) sind bezogen auf den Median (= 1) der Basisgruppe (Heufütterung = Tag 0 der Kraftfutterfütterung).

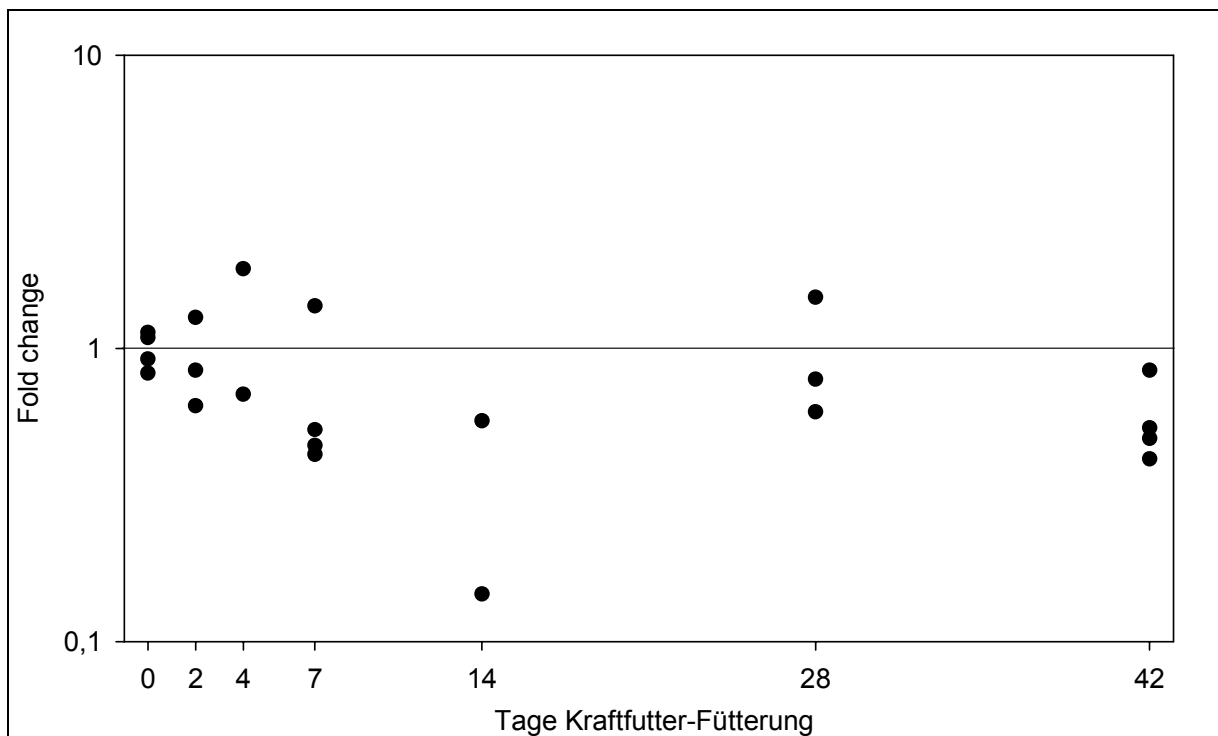


Abb. 57 FC-Werte des Kontrollgens ( $\beta$ -Aktin) für CA2. Jeder Einzelpunkt entspricht dem FC-Wert des Referenzgenes einer Pansenepithel-Probe von einem Versuchstier. In den Fütterungsgruppen wurden jeweils 3 – 5 Proben untersucht. Die Punkte der 6 Testgruppen (2. – 42. Tag der Kraftfutterfütterung) sind bezogen auf den Median (= 1) der Basisgruppe (Heufütterung = Tag 0 der Kraftfutterfütterung).

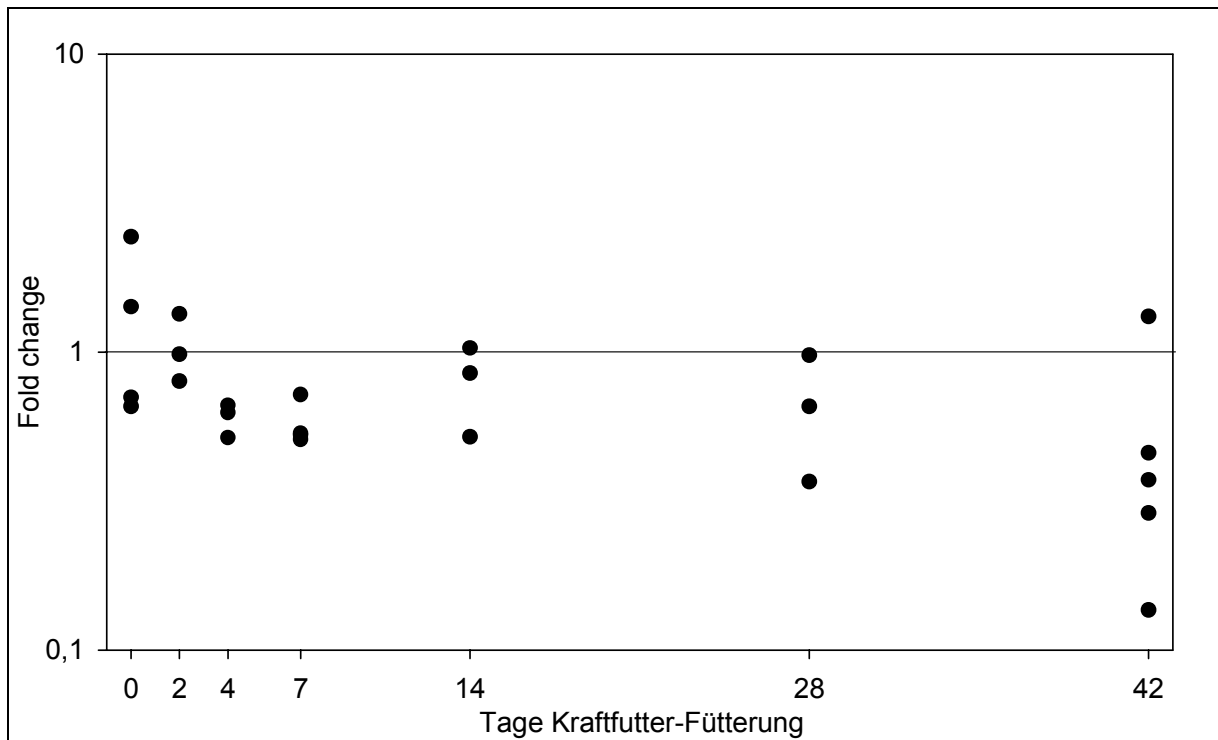


Abb. 58 FC-Werte für ACS2. Jeder Einzelpunkt entspricht dem FC-Wert einer Pansenepithel-Probe von einem Versuchstier. In den Fütterungsgruppen wurden jeweils 3 – 5 Proben untersucht. Die Punkte der 6 Testgruppen (2. – 42. Tag der Kraftfutterfütterung) sind bezogen auf den Median (= 1) der Basisgruppe (Heufütterung = Tag 0 der Kraftfutterfütterung).

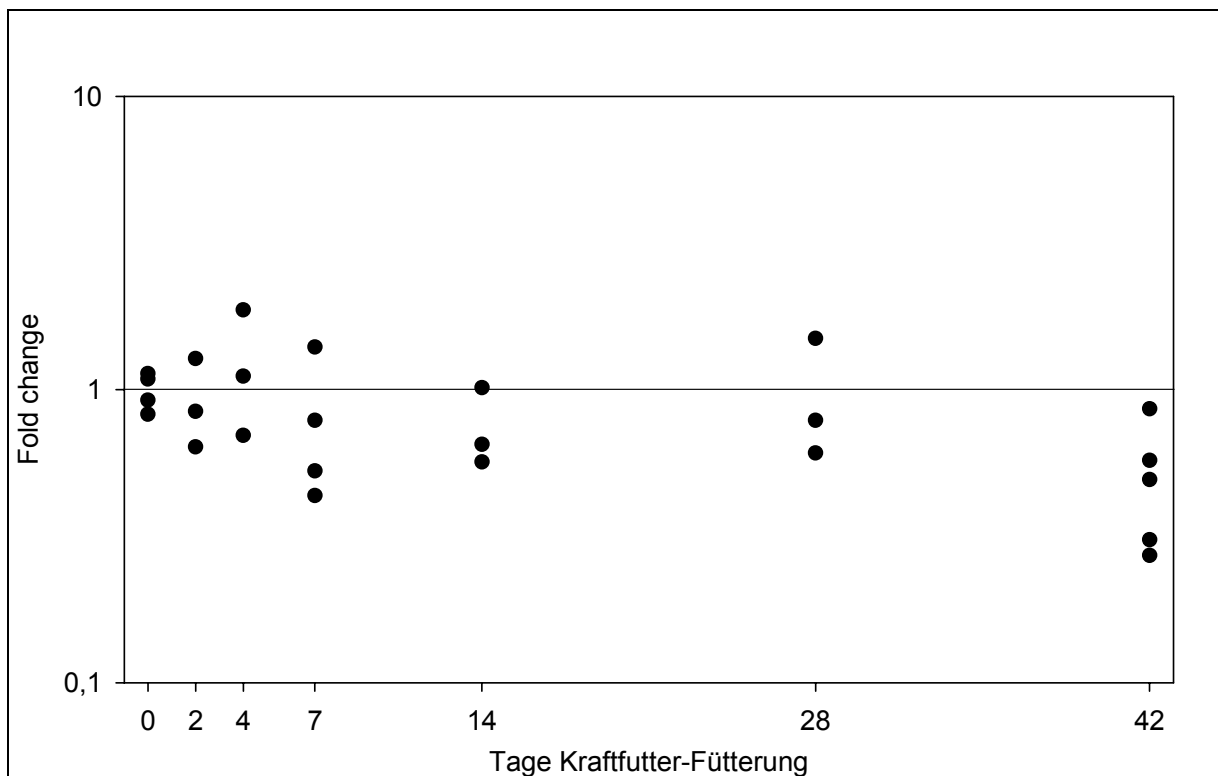


Abb. 59 FC-Werte des Kontrollgens ( $\beta$ -Aktin) für ACS2. Jeder Einzelpunkt entspricht dem FC-Wert des Referenzgenes einer Pansenepithel-Probe von einem Versuchstier. In den Fütterungsgruppen wurden jeweils 3 – 5 Proben untersucht. Die Punkte der 6 Testgruppen (2. – 42. Tag der Kraftfutterfütterung) sind bezogen auf den Median (= 1) der Basisgruppe (Heufütterung = Tag 0 der Kraftfutterfütterung).

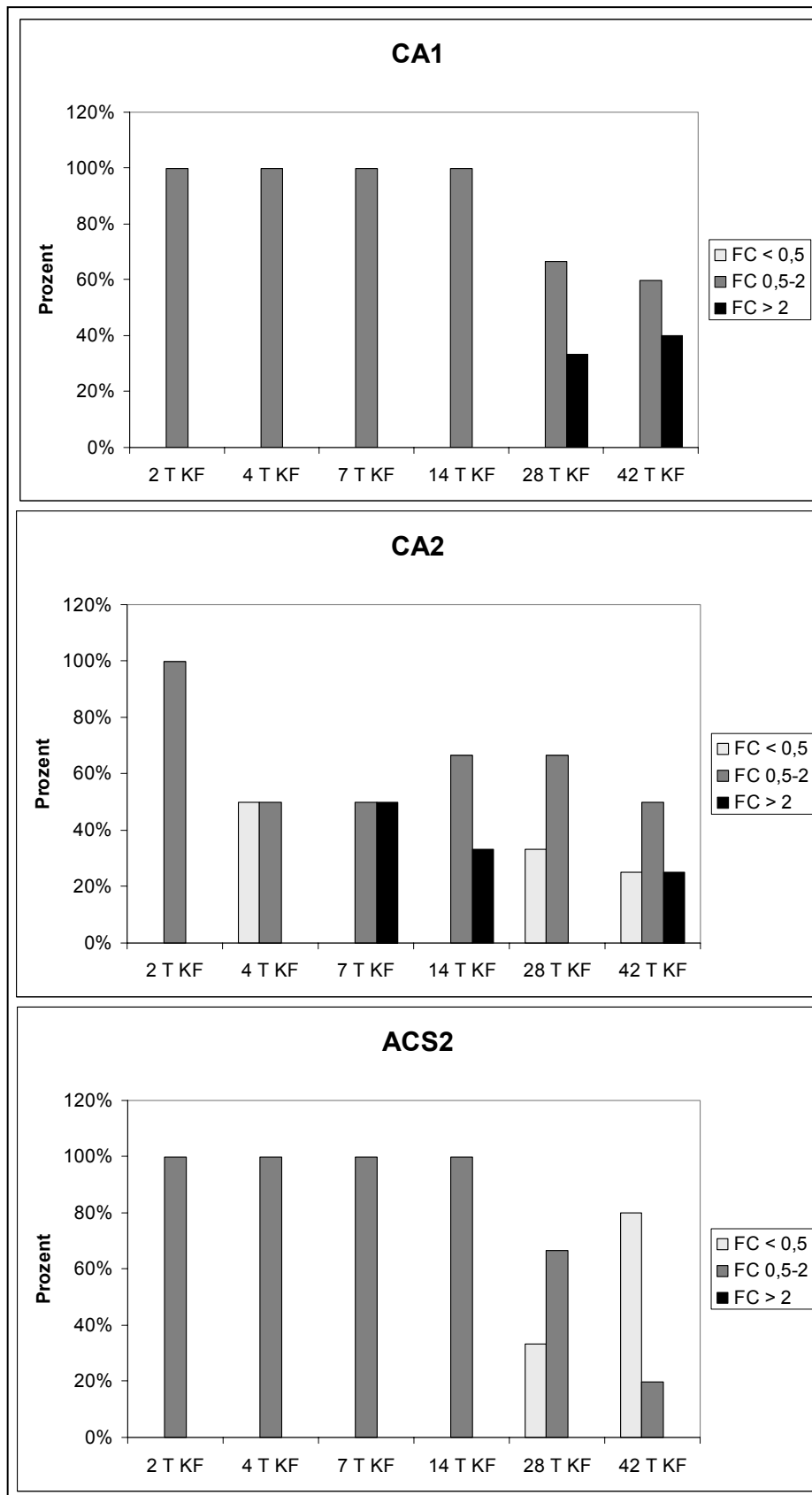


Abb. 60

Verteilung der FC-Werte für CA1, CA2 und ACS2. Der prozentuale Anteil der FC-Werte in den FC-Wert-Gruppen FC < 0,5, FC 0,5-2 und FC > 2 ist für alle Untersuchungszeitpunkte (2 T KF bis 42 T KF) dargestellt; T KF = Tage Kraftfutter-Fütterung; FC = Fold change.

Bei den zytoplasmatischen Enzymen Karboanhydrase 1 und 2 und der mitochondrialen Acetyl-CoA-Synthetase 2 sind starke Streuungen der FC-Werte zu erkennen (s. Abb. 54, Abb. 56, Abb. 58). Dennoch besteht gegen Ende des Fütterungsversuches (am 28. und 42. Tag) eine Tendenz zur Steigerung der relativen mRNA-Kopienzahl bei CA1 mit 30-40% der FC-Werte und bei ACS2 am 28. und 42. Tag eine Tendenz zur Abnahme der mRNA-Menge mit ca. 30% (28. Tag) und ca. 80% (42. Tag) (s. Abb. 60). Die Werte der Karboanhydrase 2 entziehen sich aufgrund der großen Streubreite einer sicheren Bewertung.