Tierärztliche Hochschule Hannover

Untersuchungen zum Einfluss der Laktation auf die gastrointestinale Calcium- und Phosphat-Absorption bei Schaf und Ziege

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Veterinärmedizin

- Doctor medicinae veterinariae -

(Dr. med. vet.)

vorgelegt von

Julia Richter

Oldenburg

Hannover 2013

Wissenschaftliche Betreuung: Apl. Prof. Dr. Bernd Schröder

Physiologisches Institut

1. Gutachter: Apl. Prof. Dr. Bernd Schröder

2. Gutachter: Prof. Dr. M. Ganter

Tag der mündlichen Prüfung: 21.05.2013

Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützt (SCHR 342/8-2).

Für meine Eltern

&

für Jörg

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits auf folgender Tagung vorgestellt:

Richter, J., Wilkens, M., Breves, G., Schröder, B. (2012):
Effects of lactation on gastrointestinal calcium and phosphate transport in goats.
Poster: 20. Symposium der Fachgruppe Physiologie und Biochemie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft
16.-18.02.2012 in München

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

1 Einleitung 1

2 Literaturübersicht 3

2.1. Funktion und Bedeutung von Calcium und Phosphat im Organismus. 3

2.2. Calcium- und Phosphat-Homöostase in der Trächtigkeit und der Laktation bei Schafen und Ziegen 4

2.3. Molekulare Mechanismen des gastrointestinalen Calcium- und Phosphat Transports 10

2.3.1. Parazellulärer Calcium- und Phosphat-Transport 10
2.3.2. Transzellulärer Transport 11
2.3.2.1. Transzellulärer Calcium-Transport 11
2.3.2.2. Transzellulärer Phosphat-Transport 15
2.3.2.3. Besonderheiten der gastrointestinalen Calcium- und Phosphat-Absorption beim Wiederkäuer 16

2.4. Aufrechterhaltung und Regulation der Calcium- und Phosphat-Homöostase 19

2.4.1. Regulation durch die klassischen Hormone 19
2.4.2. Regulation der Calcium-Homöostase bei Wiederkäuern in der Trächtigkeit und der Laktation 23

2.5. Zielsetzung 25

3 Material und Methoden 27

3.1. Material 27

3.1.1. Tiere 27
3.1.2. Fütterung und Melken 28
3.1.3. Entnahme der Blutproben 29
3.1.4. Entnahme von Gewebeproben 30

3.2. Analytische Methoden 32

3.2.1. Konzentrationsbestimmung von Parametern der Makromineral-Homöostase im Vollblut bzw. im Plasma ... 32
3.2.1.1. Ionisiertes Calcium ... 32
3.2.1.2. Gesamtcalcium ... 32
3.2.1.3. Anorganisches Phosphat ... 33
3.2.1.4. Calcitriol ... 34
3.2.1.5. Osteocalcin ... 34
3.2.1.6. CrossLaps® ... 35
3.2.2. Konzentrationsbestimmung von Gesamtcalcium und anorganischem Phosphat in Pansen- und Labmagenflüssigkeit ... 37
3.2.3. Bestimmung der Proteinkonzentration in Gewebepräparationen ... 37

3.3. Funktionelle Studien zum Calcium- und Phosphat-Transport in Ussingkammern ... 39

3.3.1. Prinzip der Ussingkammer-Technik ... 39
3.3.2. Durchführung der Untersuchungen ... 42
3.3.2.1. Eichperiode ... 42
3.3.2.2. Messperiode ... 42
3.3.2.3. Unidirektionale Calcium-, Phosphat- und Mannit-Fluxraten ... 42
3.3.3. Auswertung der elektrophysiologischen Parameter ... 45
3.3.4. Berechnung der Calcium-, Phosphat- und Mannit-Fluxraten ... 46

3.4. Präparative Methoden ... 48

3.4.1. RNA-Isolierung ... 48
3.4.2. Synthese von cDNA ... 49
3.4.3. Präparation von Gesamtmembranen ... 50
3.4.4. Präparation intestinaler Bürstensaummembranen ... 51
3.4.5. Präparation von Cytosol ... 53

3.5. Expressionsstudien ... 54

3.5.1. Polymerase-Kettenreaktion ... 54
3.5.1.1. Prinzip der PCR ... 54
3.5.2. Quantitative RT-PCR ... 55
3.5.3. Western-Blot-Analysen ... 58
3.5.3.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ... 58
3.5.3.2. Tank-Blot-Verfahren ... 59
3.5.3.3. Antikörper-Inkubation ... 60

2.6 Statistische Auswertung ... 62

4 Ergebnisse ... 64

4.1. Milchleistung ... 64

4.2. Einfluss der Geburt und des Einsetzens der Laktation auf die die Makromineral-Homöostase beschreibenden Vollblut- bzw. Plasmaparameter 66

4.2.1. Effekt der Geburt und des Einsetzens der Laktation auf die Konzentrationen von ionisiertem Calcium, Gesamtcalcium und anorganischem Phosphat im Vollblut bzw. Plasma 66

4.2.2. Einfluss der Geburt und des Einsetzens der Laktation auf die Plasmakonzentrationen von Calcitriol, Osteocalcin und CrossLaps® . 70

4.3. Einfluss des Trockenstellens auf die Plasmaparameter der Makromineral-Homöostase 73

4.3.1. Einfluss des Trockenstellens auf die Plasma-Konzentrationen von Gesamtcalcium und anorganischem Phosphat 73

4.3.2. Einfluss des Trockenstellens auf die Plasma-Konzentrationen von Calcitriol, Osteocalcin und CrossLaps® 74

4.4. Konzentrationen von Calcium und Phosphat in der Pansen- sowie Labmagenflüssigkeit von trockengestellten und laktierenden Schafen und Ziegen 77

4.5. Einfluss der Laktation auf elektrophysiologische Gewebeparameter und transepitheliale Fluxraten 79

4.5.1. Elektrophysiologische Parameter von trockengestellten und laktierenden Schafen und Ziegen 79

4.5.1.1. Duodenum 79

4.5.1.2. Jejunum 80

4.5.1.3. Pansen 81

4.5.2. Intestinale Calcium-, Phosphat- und Mannit-Fluxraten sowie ruminale Calcium- und Mannit-Fluxraten trockengestellter und laktierender Schafe und Ziegen 83

4.5.2.1. Duodenum 83

4.5.2.2. Jejunum 85

4.5.2.3. Pansen 87

4.6. Einfluss der Laktation auf die mRNA-Expression Calcium-transportierender Strukturen 89

4.6.1. Duodenum 89

4.6.2. Jejunum 90

4.6.3. Colon 91

4.6.4. Pansen 92

4.7. Nachweis und Quantifizierung spezifischer intestinaler Calcium-transportierender Strukturen sowie von NaPi-IIb auf Proteinebene 94

4.7.1. Nachweis der Calcium-transportierenden Strukturen sowie von NaPi-IIb 94
4.7.1.1. Nachweis von TRPV6 94
4.7.1.2. Nachweis von Calbindin-D_{9k} 95
4.7.1.3. Nachweis von PMCA 95
4.7.1.4. Nachweis von NaPi-IIb 96
4.7.2. Quantifizierung Calcium-transportierender Strukturen im Darm und im Pansen von laktierenden und trockengestellten Schafen und Ziegen sowie von NaPi-IIb im Jejunum der Ziegen 97
4.7.2.1. Duodenum 97
4.7.2.2. Jejunum 99
4.7.2.3. Colon 101
4.7.2.4. Pansen 102

5 Diskussion 103

5.1. Beurteilung des Versuchsdesigns 103

5.2. Beurteilung der angewandten Methoden 104

5.2.1. Ussingkammer-Technik 104
5.2.2. Quantitative RT-PCR 104
5.2.3. Western-Blot-Analyse 105

5.3. Effekt der Geburt, des Einsetzens der Laktation und des Trockenstellens auf die die Calcium-Homöostase beschreibenden Vollblut- bzw. Plasmaparameter 108

5.4. Einfluss der Laktation auf den gastrointestinalen Calcium- und Phosphat-Transport trockengestellter und laktierender Schafe und Ziegen 114

5.4.1. Einfluss der Laktation auf die im Duodenum, Jejunum und Pansen ermittelten elektrophysiologischen Parameter 115
5.4.2. Einfluss der Laktation auf die gastrointestinalen Calcium- und Mannit-Fluxraten sowie auf die Expression der Calcium-transportierenden Strukturen 117
5.4.2.1. Duodenum 117
5.4.2.2. Jejunum 119
5.4.2.3. Colon 123
5.4.2.4. Pansen 124

5.4.3. Einfluss der Laktation auf die intestinalen Phosphat- und Mannit-Fluxraten sowie auf die Expression von NaPi-IIb 127

5.5. Schlussfolgerungen und Ausblick 132
6 Zusammenfassung 135
7 Summary 137
8 Literaturverzeichnis 139
Anhang 155
Danksagung 161

Abkürzungsverzeichnis

In dieser Arbeit wurden die chemischen Elemente entsprechend der internationalen Nomenklatur abgekürzt. Die Chemikalien der Pufferlösungen sind separat im Anhang aufgelistet. Neben den allgemein üblichen Abkürzungen wurden folgende spezielle Kurzformen verwendet:

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
ANOVA	*analysis of variance*
ATP(ase)	Adenosintriphosphat(ase)
a.p.	*ante partum* (vor der Geburt)
BSM	Bürstensaummembranen
Ca^{2+}	ionisiertes Calcium
CaSR	*calcium sensing receptor* (Calcium-sensitiver Rezeptor)
Ca_t	totales Calcium (Gesamtcalcium)
$Ca_v1.3$	*voltage gated calcium channel type 1.3* (spannungsgesteuerter Calcium-Kanal Typ 1.3)
cDNA	*complementary DNA* (komplementäre DNA)
dpm	*decays per minute* (Zerfälle pro Minute)

C_t	*threshold cycle* (PCR-Zyklus, in dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt)
DNA	*desoxyribonucleic acid* (Desoxyribonukleinsäure)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNP	Denaturierungspuffer
dNTP	2'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
ELISA	*enzym-linked immunosorbent assay* (Antikörper-basiertes Nachweisverfahren)
et al.	*et alii* (und andere)
FAM	6-Carboxyflurescein (Fluoreszenzfarbstoff)
FGF 23	*fibroblast growth factor 23* (Fibroblasten-Wachstums-Faktor 23)
g	Vielfaches der Erd- oder Normalbeschleunigung (g_n = 9,80665 m·s^{-2})
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GM	Gesamtmembranen
G_t	Gewebeleitfähigkeit
h	*hour* (Stunde)
HRP	*horseradish peroxidase* (Meerrettichperoxidase)
I_c	Klemmstrom

I.E.	Internationale Einheiten
Ig	Immunglobulin
I_{sc}	*short circuit current* (Kurzschlussstrom)
i.v.	intravenös
J_{ms}	Fluxrate von mukosal nach serosal
J_{net}	Nettofluxrate
J_{sm}	Fluxrate von serosal nach mukosal
kDa	Kilo-Dalton
KGW	Körpergewicht
mRNA	*messenger RNA* (Boten-RNA)
n	Stichprobenumfang
Na_2-EDTA	Natrium-Ethylendiamintetraacetat
NaPi-IIb	Natrium/Phosphat Kotransporter Typ IIb
NC	Nitrocellulose
NCX	*Natrium/Kalium exchanger* (Natrium/Kalium Austauscher)
n.s.	nicht signifikant
OC	Osteocalcin
P	*probability value* (Irrtumswahrscheinlichkeit)
PBS	*phosphate buffered saline* (salzhaltige Phosphat-gepufferte Lösung)

PBST	*phosphate buffered saline + Tween* (Polysorbat 20)
PCR	*polymerase chain reaction* (Polymerase-Kettenreaktion)
PD_t	Potentialdifferenz
PI-Mix	Protease-Inhibitor-Mix
PiT	Phosphat-Transporter
PMCA	Plasmamembran-Calcium-ATPase
PMSF	Phenyl-methyl-sulfoyl-fluoride
pNPP	para-Nitrophenylphosphat
p.p.	*post partum*
PTH	Parathormon
r^2	Bestimmtheitsmaß der linearen Regression
RM	*repeated measurements* (sich wiederholende Messungen)
RNA	*ribonucleic acid* (Ribonukleinsäure)
rpm	*rounds per minute* (Umdrehungen pro Minute)
RT-PCR	*real-time polymerase chain reaction* (Echtzeit Polymerase Kettenreaktion)
RXR	Retinoid X Rezeptor
SCFA	*short chain fatty acids* (Kurzkettige Fettsäuren)
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	*standard error of the mean* (Standardfehler des Mittelwertes)

SLC	*solute carrier family* (Familie der Solute-Transporter)
TAMRA	Tetramethylrhodamin
TCA	Trichloracid (Trichloressigsäure)
TRP(V)	*transient receptor potential (vanilloid) channel*
VDR	Vitamin D Rezeptor
VDRE	*Vitamin D responsive element* (auf Vitamin D ansprechendes Element)
X	arithmetisches Mittel

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1: Graphische Darstellung der Calcium-Verluste sowie der -Resorption aus dem Skelettsystem und der -Absorptionsrate aus dem Darm; aus BRAITHWAITE et al. (1970) 7

Abb. 2.2: Graphische Darstellung der prozentualen ^{45}Calcium -Absorption vor und nach der Geburt sowie der mittleren Milchleistung von 5 Kühen mit einer genau festgelegte Calcium-Aufnahme während einer Versuchsphase von circa 6 Wochen; aus VAN'T KOOSTER (1976) 8

Abb. 2.3: Klassisches Modell des intestinalen trans- und parazellulären Calcium-Transports 12

Abb. 2.4: Schema der Regulation der Calcium-Homöostase durch die klassischen Hormone 22

Abb. 3.1: Zeitachse der Blutprobenentnahmen vor, während und nach der Geburt 30

Abb. 3.2: Schematische Darstellung der Versuchsapparatur (Ussingkammer mit Gaslift und Strom-/Spannungsklemmeinrichtung) 41

Abb. 3.3: Schematische Darstellung der Präparation intestinaler Gesamtmembranen und intestinaler Bürstensaummembranen 52

Abb. 4.1: Graphische Darstellung der auf das Körpergewicht korrigierten Milchleistung [$l \cdot kg^{-1}$ KGW] laktierender Schafe und Ziegen ab Tag 2 bis Tag 20 p.p. 64

Abb. 4.2: Graphische Darstellung der Konzentrationen von ionisiertem Calcium und Gesamtcalcium im Vollblut bzw. Blutplasma von Schafen und Ziegen 2 Tage a.p. bis 10 Tage p.p. 68

Abb. 4.3: Graphische Darstellung der Konzentrationen von anorganischem Phosphat im Blutplasma von Schafen und Ziegen 2 Tage a.p. bis 10 Tage p.p. 69

Abb. 4.4: Graphische Darstellung der Konzentrationen von Calcitriol im Blutplasma von Schafen und Ziegen 2 Tage a.p. bis 10 Tage p.p. 71

Abb. 4.5: Graphische Darstellung der Konzentrationen von Osteocalcin und CrossLaps® im Blutplasma von Schafen und Ziegen 10 Tage a.p. bis 10 Tage bzw. 21 Tage p.p. 72

Abb. 4.6: Graphische Darstellung der Konzentrationen von Gesamtcalcium und anorganischem Phosphat im Blutplasma von Schafen und Ziegen nach 3 Monaten Laktation sowie 7 Wochen nach dem Trockenstellen 74

Abb. 4.7: Graphische Darstellung der Konzentrationen von Calcitriol im Blutplasma von Schafen und Ziegen nach 3 Monaten Laktation 75

Abb. 4.8: Graphische Darstellung der Konzentrationen von Osteocalcin und CrossLaps® im Blutplasma von Schafen und Ziegen nach 3 Monaten Laktation sowie 7 Wochen nach dem Trockenstellen. 76

Abb. 4.9: Graphische Darstellung der Konzentrationen von Gesamtcalcium in der Pansen- und Labmagenflüssigkeit trockengestellter und laktierender Schafe und Ziegen 78

Abb. 4.10: Graphische Darstellung der Konzentrationen von anorganischem Phosphat in der Pansen- und Labmagenflüssigkeit trockengestellter und laktierender Schafe und Ziegen 78

Abb. 4.11: Calcium-, Phosphat- und Mannit-Nettofluxraten im Duodenum trockengestellter und laktierender Schafe 83

Abb. 4.12: Calcium-, Phosphat- und Mannit-Nettofluxraten im Duodenum trockengestellter und laktierender Ziegen 84

Abb. 4.13: Calcium-, Phosphat- und Mannit-Nettofluxraten im Jejunum trockengestellter und laktierender Schafe 85

Abb. 4.14: Calcium-, Phosphat- und Mannit-Nettofluxraten im Jejunum trockengestellter und laktierender Ziegen 86

Abb. 4.15: Calcium- und Mannit-Nettofluxraten im Pansen trockengestellter und laktierender Schafe 87

Abb. 4.16: Calcium- und Mannit-Nettofluxraten im Pansen trockengestellter und laktierender Ziegen 87

Abb. 4.17: Graphische Darstellung der mRNA-Expression von TRPV6 und PMCA relativ zur Expression von GAPDH im Duodenum von Schafen und Ziegen nach dem Trockenstellen bzw. in der Laktation..... 90

Abb. 4.18: Graphische Darstellung der mRNA-Expression von TRPV6 und PMCA relativ zur Expression von GAPDH im Jejunum von Schafen und Ziegen nach dem Trockenstellen bzw. in der Laktation..... 91

Abb. 4.19 Graphische Darstellung der mRNA-Expression von TRPV6 und PMCA relativ zur Expression von GAPDH im Colon von Schafen und Ziegen nach dem Trockenstellen bzw. in der Laktation..... 92

Abb. 4.20: Graphische Darstellung der mRNA-Expression von PMCA relativ zur Expression von GAPDH im Pansen von Schafen und Ziegen nach dem Trockenstellen bzw. in der Laktation 93

Abb. 4.21: Semiquantitativer Nachweis von TRPV6 mittels Western-Blot-Analyse: Jejunum trockengestellter und laktierender Schafe und Ziegen sowie der Nachweis von Villin 94

Abb. 4.22: Semiquantitativer Nachweis von Calbindin-D_{9k} mittels Western-Blot-Analyse: Jejunum trockengestellter und laktierender Schafe und Ziegen 95

Abb. 4.23: Semiquantitativer Nachweis von PMCA mittels Western-Blot-Analyse: Jejunum trockengestellter und laktierender Schafe und Ziegen sowie der Nachweis von Villin 95

Abb. 4.24: Semiquantitativer Nachweis von NaPi-IIb mittels Western-Blot-Analyse: Jejunum trockengestellter und laktierender Ziegen sowie der Nachweis von β-Actin 96

Abb. 4.25: Semiquantitativer Nachweis von NaPi-IIb mittels Western-Blot-Analyse: Gastrointestinale Achse laktierender und trockengestellter Ziegen..... 96

Abb. 4.26: Proteinexpression von TRPV6 und PMCA in Gesamtmembranen sowie von Calbindin-D_{9k} im Cytosol des Duodenums von trockengestellten und laktierenden Schafen..... 97

Abb. 4.27: Proteinexpression von TRPV6 und PMCA in Gesamtmembranen sowie von Calbindin-D_{9k} im Cytosol des Duodenums von trockengestellten und laktierenden Ziegen 98

Abb. 4.28: Proteinexpression von TRPV6 und PMCA in Gesamtmembranen sowie von Calbindin-D_{9k} im Cytosol des Jejunums von trockengestellten und laktierenden Schafen 99

Abb. 4.29: Proteinexpression von TRPV6 und PMCA in Gesamtmembranen sowie von Calbindin-D_{9k} im Cytosol und von NaPi-IIb in Bürstensaummembranen des Jejunums von trockengestellten und laktierenden Ziegen 100

Abb. 4.30: Proteinexpression von TRPV6 und PMCA in Gesamtmembranen des Colons von trockengestellten und laktierenden Schafen und Ziegen 101

Abb. 4.31: Proteinexpression von PMCA in Gesamtmembranen des Pansens von trockengestellten und laktierenden Schafen und Ziegen 102

Abb. 5.1: Korrelationen zwischen Calcium- und Mannit-Fluxraten von mukosal nach serosal bzw. von serosal nach mukosal im Duodenum trockengestellter und laktierender Schafe und Ziegen..... 119

Abb. 5.2: Korrelationen zwischen Calcium- und Mannit-Fluxraten von mukosal nach serosal bzw. von serosal nach mukosal im Jejunum trockengestellter und laktierender Schafe und Ziegen..... 123

Abb. 5.3: Korrelationen zwischen Calcium- und Mannit-Fluxraten von mukosal nach serosal bzw. von serosal nach mukosal im Pansen trockengestellter und laktierender Schafe und Ziegen..... 126

Abb. 5.4: Korrelationen zwischen Phosphat- und Mannit-Fluxraten von mukosal nach serosal bzw. von serosal nach mukosal im Duodenum trockengestellter und laktierender Schafe und Ziegen..... 130

Abb. 5.5: Korrelationen zwischen Phosphat- und Mannit-Fluxraten von mukosal nach serosal bzw. von serosal nach mukosal im Jejunum trockengestellter und laktierender Schafe und Ziegen..... 131

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Expression der Calcium-transportierenden Strukturen im Gastrointestinaltrakt von Schafen und Ziegen 18

Tab. 3.1: Zusammensetzung der Pellets und Bedarf von Rohprotein, Calcium und Phosphat pro kg Milch sowie die in 800 g Pellets enthaltene Menge zur Deckung des Leistungsbedarfs. 29

Tab. 3.2: Versuchsablauf der Messung der unidirektionalen Calcium-, Phosphat- und Mannit-Fluxraten der Präparate von Schafen 44

Tab. 3.3: Versuchablauf zur Messung der unidirektionalen Calcium-, Phosphat- und Mannit-Fluxraten der Präparate von Ziegen 45

Tab. 3.4: Pipettierschema der TaqMan®-PCR 56

Tab. 3.5: Für die RT-PCR verwendete Primer und Sonden..... 57

Tab. 3.6: Amplifizierungsprotokoll der TaqMan®-PCR. 57

Tab. 3.7: Probenart und –vorbehandlung für die Gel-Elektrophorese 58

Tab. 3.8: Verwendete Antikörper und Inkubationsbedingungen für den spezifischen Proteinnachweis 61

Tab. 4.1: Konzentrationen von ionisiertem Calcium, Gesamtcalcium und anorganischem Phosphat im Vollblut bzw. Blutplasma von trächtigen bzw. laktierenden Schafen und Ziegen 2 Tage a.p. bis 10 Tage p.p. .. 66

Tab. 4.2: Konzentrationen von Calcitriol sowie Osteocalcin und CrossLaps® im Blutplasma von trächtigen bzw. laktierenden Schafen und Ziegen 2 Tage bzw. 10 Tage a.p. bis 10 Tage bzw. 21 Tage p.p. 70

Tab. 4.3: Elektrophysiologische Parameter des Duodenums trockengestellter und laktierender Schafe und Ziegen..... 80

Tab. 4.4: Elektrophysiologische Parameter des Jejunums trockengestellter und laktierender Schafe und Ziegen..... 81

Tab. 4.5: Elektrophysiologische Parameter des Pansens trockengestellter und laktierender Schafe und Ziegen..... 82

Tab. 4.6: Unidirektionale sowie Calcium-, Phosphat- und Mannit-Nettofluxraten im Duodenum trockengestellter und laktierender Schafe und Ziegen . 84

Tab. 4.7: Unidirektionale sowie Calcium-, Phosphat- und Mannit-Nettofluxraten im Jejunum trockengestellter und laktierender Schafe und Ziegen 86

Tab. 4.8: Unidirektionale sowie Calcium- und Mannit-Nettofluxraten im Pansen trockengestellter und laktierender Schafe und Ziegen ……88

1 Einleitung

Bilanzversuche an laktierenden Schafen (BRAITHWAITE 1978) und Milchkühen (VAN'T KLOOSTER 1976) konnten zeigen, dass die Effizienz der gastrointestinalen Calcium-Absorptionsmechanismen nicht ausreichend ist, die beim Wiederkäuer mit dem Einsetzen der Laktation einhergehende negative Calcium-Bilanz auszugleichen. Durch den in der späten Trächtigkeit bzw. mit Beginn der Laktation gesteigerten Bedarf an Calcium sind diese Zeiträume häufig, insbesondere bei der hochleistenden Milchkuh, mit dem Auftreten von Störungen der Calcium-Homöostase (BRAITHWAITE et al. 1970; HORST et al. 2005) assoziiert und mit erheblichen wirtschaftlichen Verlusten verbunden (GOFF u. HORST 1997). Aufgrund ihrer besseren Praktikabilität wurden viele Untersuchungen zur Calcium-Homöostase sowie zur Prävention von Hypocalcämien anstelle an der Milchkuh an Schafen und Ziegen durchgeführt. Jedoch unterscheiden sich beide Spezies nicht nur im Hinblick auf ihren Ernährungstyp (HOFMANN 1989), ihrer Milchleistung sowie dem zeitlichen Auftreten einer Hypocalcämie (OETZEL 1988), sondern auch in ihrer Anpassung an einen durch eine alimentäre Calcium-Restriktion induzierten erhöhten Calcium-Bedarf (WILKENS et al. 2011; WILKENS et al. 2012). Aufgrund dieser bereits gezeigten spezies-spezifischen Adaptationsmechanismen war es nachfolgend das Ziel der hier vorliegenden Arbeit, zu untersuchen inwieweit sich Schafe und Ziegen in ihrer Adaptation an eine durch die Trächtigkeit bzw. Laktation erhöhte Belastung der Calcium-Homöostase peripartal und langfristig ähneln bzw. unterscheiden.

Im Gegensatz zum monogastrischen Tier, bei dem eine Adaptation an einen gesteigerten Calcium-Bedarf hauptsächlich durch eine Steigerung der Absorption von Calcium aus dem Duodenum (VAN ABEL et al. 2003) sowie einer verringerten renalen Exkretion erfolgt (FRIEDMAN u. GESEK 1995), konnte in vorangegangenen Studien gezeigt werden, dass die intestinale Calcium-Absorption beim Schaf und bei der Ziege wahrscheinlich nicht in erster Linie im Duodenum sondern vor allem im Jejunum lokalisiert ist (MROCHEN 2010; WILKENS et al. 2012). Die strukturellen

Grundlagen für einen Calcitriol-abhängigen, transzellulären Calcium-Transport im Darm, welche bereits durch umfangreiche Untersuchungen in monogastrischen Tieren nachgewiesen wurden, konnten nachfolgend auch bei Schafen und Ziegen ermittelt werden (WILKENS et al. 2011; WILKENS et al. 2012). Obwohl eine Absorption von Calcium auch im Pansen nachgewiesen wurde (HÖLLER et al. 1988; SCHRÖDER et al. 1999; SIDLER-LAUFF et al. 2010), konnte der molekulare Mechanismus des ruminalen Calcium-Transports sowie dessen Regulation bisher noch nicht näher charakterisiert werden.

Das Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen in welcher Art und Weise die Laktation einen Einfluss auf den Calcium- sowie auf den Phosphat-Transport aus dem Gastrointestinaltrakt von Schafen und Ziegen hat.

Zu diesem Zweck wurden im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit analytische Untersuchungen der die Calcium-Homöostase beschreibenden Vollblut- bzw. Plasmaparameter an Blutproben von Calcium- und Phosphat-adäquat ernährten, adulten trächtigen bzw. laktierenden Schafen und Ziegen im Vergleich zu der jeweiligen trockengestellten Gruppe durchgeführt. Weiterhin wurden zur Ermittlung der Expression der bereits bei Schafen und Ziegen bzw. bei Ziegen nachgewiesenen Calcium- bzw. Phosphat-transportierenden Strukturen quantitative sowie semiquantitative Analysen auf Transkriptions- und Translationsebene an intestinalen Epithelien sowie an dem Pansenepithel durchgeführt. Zur näheren Charakterisierung der Calcium- und Phosphat-Bewegungen über die entsprechenden Epithelien wurden weiterhin funktionelle Untersuchungen mit Hilfe der Ussingkammer-Technik durchgeführt.

2 Literaturübersicht

2.1. Funktion und Bedeutung von Calcium und Phosphat im Organismus

In einer Vielzahl von Geweben und zellulären Strukturen spielt Calcium eine große Rolle bei physiologischen Prozessen wie Muskelkontraktion (EBASHI et al. 1969), Signalübertragung an neuro-muskulären und neuro-neuronalen Synapsen (BERRIDGE 1998) und Blutgerinnung (SINHA et al. 1987). Als *Second messenger* ist es weiterhin an der Ausschüttung von Hormonen und Wachstumsfaktoren beteiligt (HORST et al. 2005). Im Knochen ist Calcium gemeinsam mit Phosphat in Form von Hydroxylapatit ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) als Strukturelement maßgeblich an der Knochenmineralisation beteiligt (BOSKEY 1978). Bei Säugetieren wird insbesondere in der späten Trächtigkeit eine große Menge an maternalem Calcium für die Mineralisierung des fetalen Skelettsystems (BROMMAGE u. DELUCA 1985) sowie in der sich anschließenden Laktation für die Milchproduktion benötigt (NEVILLE et al. 1994). Auch Phosphat kommt eine große Bedeutung hinsichtlich einer Vielzahl biologischer Prozesse, wie beispielsweise der Synthese von Nukleinsäuren und dem Energiemetabolismus zu (KREBS u. BEAVO 1979).

Die Konzentration von Calcium und Phosphat wird durch strikte Regulationsmechanismen (siehe 2.4.) in einem engen physiologischen Bereich gehalten. Diese Kontrollmechanismen der Calcium-Homöostase sind auch an der Regulation des Phosphat-Haushaltes beteiligt. Aufgrund dessen ist die Calcium-Homöostase eng mit der des Phosphats assoziiert.

2.2. Calcium- und Phosphat-Homöostase in der Trächtigkeit und der Laktation bei Schafen und Ziegen

Die Calcium-Konzentrationen im Plasma liegen bei Schafen zwischen 2,1 und 2,7 $mmol \cdot l^{-1}$ und bei Ziegen zwischen 2,2 und 2,8 $mmol \cdot l^{-1}$ (KRAFT u. DÜRR 1999). Die Plasma-Phosphat-Konzentrationen rangieren bei Schafen zwischen 1,3 und 1,9 $mmol \cdot l^{-1}$ und bei Ziegen zwischen 1,4 und 2,3 $mmol \cdot l^{-1}$ (KRAFT u. DÜRR 1999).

Adulte, nicht tragende und bedarfsgerecht gefütterte Schafe nehmen am Tag im Mittel etwa 5,4 g Calcium mit der Nahrung auf. Bei einer mittleren faecalen Calcium-Exkretion von 4,3 $g \cdot Tag^{-1}$ werden folglich mindestens 1,1 $g \cdot Tag^{-1}$ entlang des Gastrointestinaltraktes absorbiert (SCHRÖDER et al. 1997). Im Gegensatz zum monogastrischen Tier ist der Anteil des Verlusts von Calcium durch renale Exkretion bei Wiederkäuern schon unter physiologischen Bedingungen sehr gering und wird insgesamt nur wenig von der alimentären Calcium-Aufnahme und der aktuellen Lage des Calcium-Haushalts beeinflusst (RAMBERG et al. 1970; BRAITHWAITE u. RIAZUDDIN 1971).

Phosphat wird über den für die Wiederkäuer charakteristischen endogenen Phosphat-Kreislauf recycelt. Über Sekretion aus den Speicheldrüsen gelangt dabei zunächst ein Großteil des Phosphats in das Vormagensystem (KAY 1966) und von dort aus unter anderem mittels abgestorbener Mikroorganismen in den Darm. Die immense Sekretionsrate von Phosphat wird hier durch eine hohe intestinale Absorption ausgeglichen (BRUCE et al. 1966). Im Gegensatz zu Monogastriern, bei denen die Erhaltung der Phosphat-Homöostase hauptsächlich durch die Niere gesteuert wird, ist die renale Exkretion von Phosphat bei Wiederkäuern sehr gering. Die Phosphat-Homöostase wird daher bei ihnen hauptsächlich durch Absorptionsmechanismen im Darm reguliert. Die Ausscheidung von Phosphat erfolgt zu einem Großteil über die Faeces (SCOTT et al. 1985).

In der Trächtigkeit sowie der Laktation treten zusätzliche Verluste an Calcium und Phosphat durch den Transfer zum wachsenden Fetus bzw. durch Sekretion in das Kolostrum und in die Milch auf (RAMBERG et al. 1975). Bei zwillingsträchtigen

Schafen beträgt der maternale Verlust an Calcium vor allem in der späten Trächtigkeit bis zu etwa 0,05 g Calcium·kg^{-1} KGW des Muttertieres. In den ersten 62 Tagen nach der Gestation verbleibt dabei die Menge an von der Mutter zum Fetus transportiertem Calcium mit circa 0,66 g Calcium·Tag^{-1} zunächst auf einem niedrigen Level, steigt dann aber stetig an und erreicht schließlich in der späten Trächtigkeit, wenn durch die Mineralisation des fetalen Skeletts der Bedarf des Fetus am höchsten ist mit circa 3 g Calcium·Tag^{-1} ihr Maximum (GRACE et al. 1986). Aufgrund dieses hohen Bedarfs sind schon die letzten 4 bis 6 Wochen der Trächtigkeit bei Schafen im Gegensatz zu Milchkühen und Ziegen häufig mit einer Hypocalcämie assoziiert (OETZEL 1988).

Der Beginn der Laktation bedeutet für den Wiederkäuer einen plötzlichen, im Vergleich zur Gravidität noch höheren Anstieg des Calcium-Bedarfs. Diese Belastung der Calcium-Homöostase ist insbesondere bei der hochleistenden Milchkuh, die beispielsweise am ersten Tag der Laktation durch die Produktion von Kolostrum mit circa 23 g Calcium das etwa 9-fache des gesamten Plasma-Calcium-Pools verliert, von Bedeutung (HORST et al. 2005). Auch in der folgenden Laktationsphase wird bei diesen Tieren durch eine Kombination aus genetischen Einflussfaktoren infolge der hohen Milchleistung Calcium in einer Menge in die Milch sezerniert, die weit über die Rate des fetalen Calcium-Bedarfs in der späten Trächtigkeit hinausgeht (HORST et al. 2005). Durch die gesteigerten Anforderungen an die Calcium-Homöostase ist der frühe postpartale Zeitraum bei der Milchkuh oft mit einer sich auch klinisch auswirkenden Hypocalcämie verbunden. Auch bei Ziegen kann dieses beobachtet werden (OETZEL 1988).

Da die durch die Laktation entstehende negative Calcium-Bilanz beim Wiederkäuer nicht nennenswert durch eine Verringerung der ohnehin schon geringen renalen Exkretion von Calcium ausgeglichen werden kann, wird die Calcium-Homöostase hauptsächlich durch die Mobilisation von Calcium aus dem Knochen und/oder durch eine gesteigerte Calcium-Absorption im Gastrointestinaltrakt reguliert (HORST et al. 2005).

Im Knochen liegt Calcium zusammen mit Phosphat in Form von Hydroxylapatit in einem Verhältnis von circa 2:1 vor (GLIMCHER 1959). Durch Mobilisation und Abgabe von Calcium in das Blutplasma stellt das Skelettsystem somit ein schnell verfügbares Reservoir zur Aufrechterhaltung der Calcium-Homöostase dar (CROSS et al. 1995). BRAITHWAITE et al. (1970) konnten in Bilanzstudien an trächtigen Schafen zeigen, dass durch eine gesteigerte Calcium-Resorption aus dem Knochen ab der späten Trächtigkeit, mit einem Maximum am Beginn der Laktation, circa 20% der skelettalen Calcium-Reserven mobilisiert werden. In der späten Laktation fand eine Wiederherstellung dieser Ressourcen durch eine verminderte Knochenresorption bei gleichzeitiger Steigerung der Knochenformation statt (siehe Abb. 2.1).

Infolge der Calcium-Mobilisation aus dem Knochen konnte BRAITHWAITE (1983) des Weiteren eine damit verbundene erhöhte Phosphat-Resorption beobachten. So nahm in dem von ihm durchgeführten Bilanzversuch an laktierenden Schafen die Phosphat-Absorption zwar zu (41,5 $mg \cdot Tag^{-1} \cdot kg^{-1}$ KGW), jedoch steigerte sich auch die renale und faecale Phosphat-Ausscheidung (45,2 $mg \cdot Tag^{-1} \cdot kg^{-1}$ KGW). Da gleichzeitig ebenfalls die Mobilisation von Phosphat aus dem Skelettsystem zunahm (27,7 $mg \cdot Tag^{-1} \cdot kg^{-1}$ KGW) folgerte BRAITHWAITE (1983), dass trotz des reichlichen Angebots von alimentärem Phosphat dieses aufgrund der laktationsbedingten Calcium-Mobilisation aus dem Knochen mobilisiert wurde.

Eine weitere Adaptation an den gesteigerten Calcium-Bedarf erfolgt auf der Ebene der gastrointestinalen Absorption. So konnten BRAITHWAITE et al. (1970) bei laktierenden Schafen eine scheinbare Verdaulichkeit des aufgenommenen Calciums von circa 15% ermitteln, die nach dem Trockenstellen der Tiere auf 6% abfiel. Des Weiteren wurde ab der späten Trächtigkeit eine erhöhte gastrointestinale Calcium-Absorption beobachtet, die sich stetig während der Trächtigkeit steigerte und ihr Effizienzmaximum in der Mitte der Laktation erreichte (BRAITHWAITE 1983) (siehe Abb. 2.1).

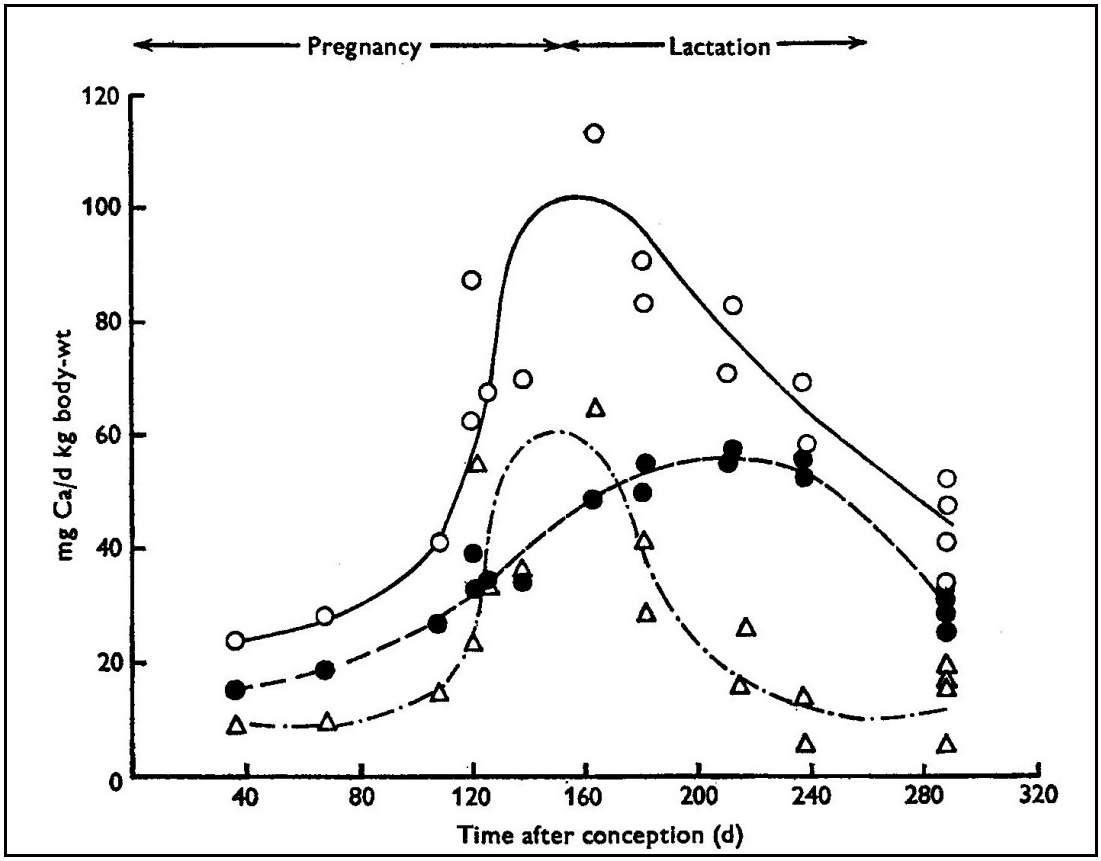

Abb. 2.1: Graphische Darstellung der Calcium-Verluste sowie der -Resorption aus dem Skelettsystem und der -Absorptionsrate aus dem Darm; aus BRAITHWAITE et al. (1970); ○ = irreversibler Verlust von Calcium trächtiger und laktierender Mutterschafe, △ = Resorptionsrate von Calcium aus dem Knochen, ● = Absorptionsrate von Calcium aus dem Darm; *body-wt* (*body weight*) = Körpergewicht, Ca = Calcium, d = Tage.

Neben den Ergebnissen aus den Bilanzversuchen mit Schafen konnten ähnliche Resultate auch in entsprechenden Versuchen mit Kühen ermittelt werden. So konnte VAN'T KLOOSTER (1976) in Untersuchungen über Absorptionsort und –kinetik aus dem Dünndarm fistulierter Milchkühe in Abhängigkeit von dem Einsetzen der Laktation eine Steigerung der intestinalen Calcium-Absorption ab Tag 3 der Laktation mit einem *Peak* am 18. Tag beobachten (siehe Abb. 2.2). Mit Hilfe einer Infusion von Na_2-EDTA simulierte er zusätzlich einen abrupten Abfall des verfügbaren Calciums in der extrazellulären Flüssigkeit wie er vergleichsweise auch am Beginn der Laktation auftritt. Als Antwort auf diesen Verlust konnte auch hier eine Adaptation des gastrointestinalen Transports in Form einer gesteigerten Calcium-Absorption mit

einer Verzögerung von 1 bis 2 Tagen beobachtet werden. Auch RAMBERG et al. (1970) konnten in Bilanzstudien an Kühen eine postpartale Steigerung der gastrointestinalen Calcium-Absorption beobachten, die jedoch ebenfalls mit einer Verzögerung ihr Maximum nach 10 bis 20 Tagen erreichte und danach wieder abfiel.

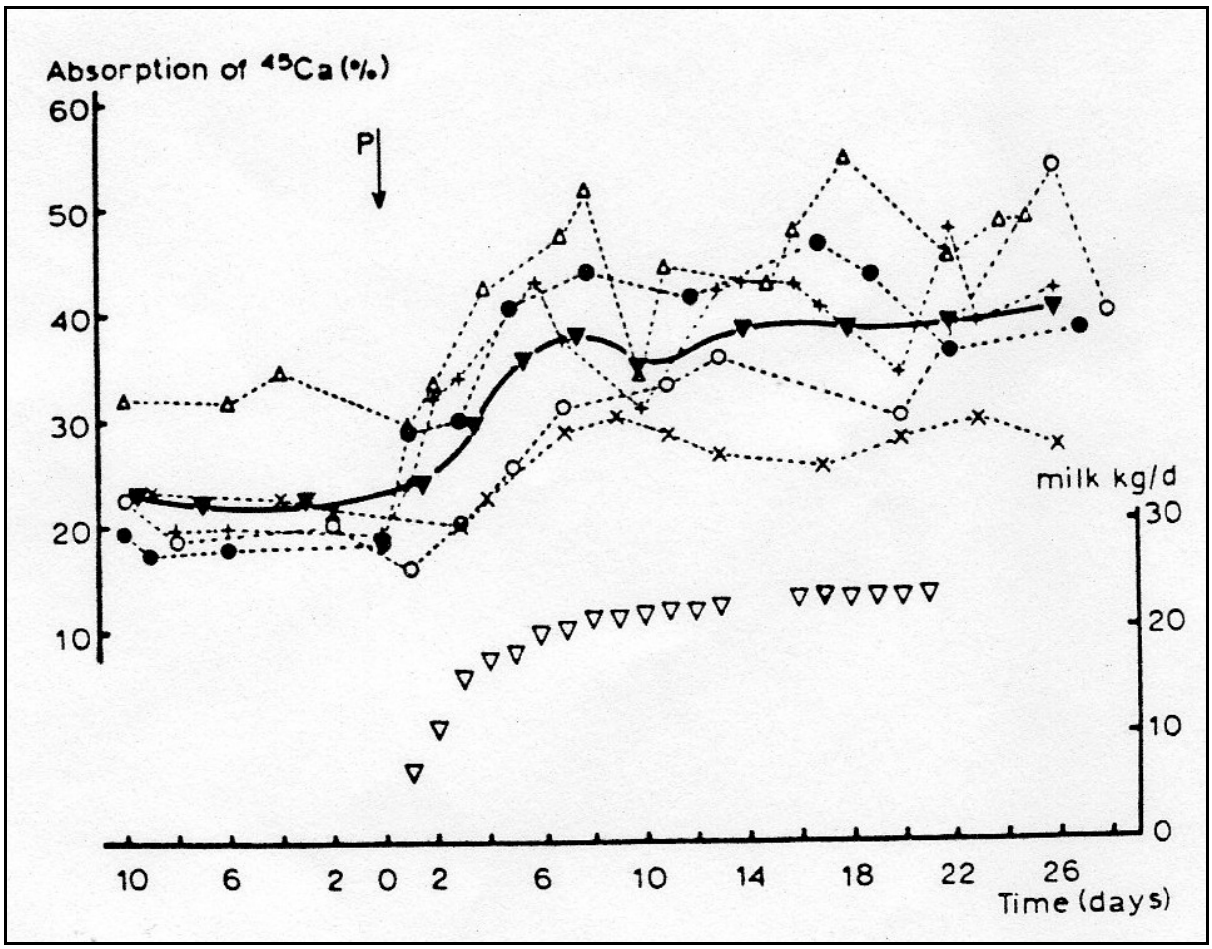

Abb. 2.2: Graphische Darstellung der prozentualen ^{45}Calcium -Absorption vor und nach der Geburt sowie der mittleren Milchleistung von 5 Kühen mit einer genau festgelegte Calcium-Aufnahme während einer Versuchsphase von circa 6 Wochen; aus VANT' KLOOSTER (1976); ● - - -● Hinke 14, ○ - - -○ Hinke 15, X - - - X Witschoft, + - - -+ Anna, △ - - - △ Dina, ▼- - -▼ Mittelwerte der 5 Kühe, ▽ Mittelwerte der Milchleistung der 5 Kühe, P (*partum*) = Geburt; ^{45}Ca: radioaktiv markiertes Calcium.

Zusammenfassend kann dem Calcium-Verlust während der Laktation also durch Mobilisation von Calcium aus dem Knochen und durch vermehrte gastrointestinale Absorption entgegengewirkt werden. Diese erreicht jedoch, wie in den oben erwähnten Bilanzstudien gezeigt werden konnte, erst verzögert nach dem Einsetzen der Laktation ihr Maximum. In der späten Trächtigkeit bzw. der frühen Laktation, als den Zeitpunkten des höchsten Calcium-Bedarfs (BRAITHWAITE 1983) ist die Effizienz der gastrointestinalen Absorptionsmechanismen anscheinend nicht ausreichend, um über diesen Weg die negative Calcium-Bilanz vollständig auszugleichen (BRAITHWAITE 1978).

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Bilanzversuchen mit Schafen und Kühen wurden mit laktierenden Ziegen keine vergleichbaren Experimente durchgeführt, so dass über entsprechende Anpassungsmechanismen der Calcium-Homöostase bei dieser Spezies bislang nichts Näheres bekannt ist.

2.3. Molekulare Mechanismen des gastrointestinalen Calcium- und Phosphat Transports

Prinzipiell kann die Absorption von Calcium und Phosphat aus dem Gastrointestinaltrakt bei Wiederkäuern wie für Monogastrier gut beschrieben auf para- oder transzellulärem Wege erfolgen (FLEET u. SCHOCH 2010). Die parazelluläre Absorption erlaubt einen direkten Austausch von Elektrolyten zwischen zwei Kompartimenten, während die transzelluläre Route in der Regel einen Transport über zwei Plasmamembranen einschließt. Die relativen Beteiligungen der trans- und parazellulären Komponenten an der Gesamtabsorption des jeweiligen Elektrolyts sind unter anderem von dem elektrischen und dem chemischen Gradienten abhängig (KARBACH 1992).

2.3.1. Parazellulärer Calcium- und Phosphat-Transport

Die parazelluläre Absorption stellt einen unter physiologischen Bedingungen nicht-sättigbaren Transportweg dar, bei dem Ionen über Diffusion parazelluläre Zwischenräume passieren können. Zur Aufrechterhaltung der Semipermeabilität des Epithels bilden interzelluläre Proteinstrukturen (so genannte *Tight junctions*) eine primäre Barriere für die diffundierenden Ionen. Sie beinhalten unter anderem verschiedene, zum Teil ladungsselektive Claudin-Typen, welche einen Tunnel parazellulärer Poren bilden können (VAN ITALLIE u. ANDERSON 2006).

Die Bewegung der Ionen durch die *Tight junctions* ist ein passiver Prozess, der größtenteils von dem Konzentrationsgradienten der diffundierenden Ionen und dem elektrischen Gradienten abhängig ist. Durch einen aktiven Transport von Ionen wird des Weiteren ein osmotischer Gradient erzeugt, durch den Wasser und damit auch im Wasser gelöste andere Ionen parazellulär nachströmen. Dieses Phänomen wird als *Solvent drag* bezeichnet (KARBACH 1992; TUDPOR et al. 2008).

Eine größere Bedeutung kommt dem parazellulären Calcium-Transport bei hohen luminalen Calcium-Konzentrationen durch beispielsweise einer im diätetischen Calcium-Gehalt adäquaten Ration zu, infolge dessen transzellulär Calcium-transportierende Strukturen (siehe 2.3.2.1 und 2.3.2.2) vermindert exprimiert werden (BRONNER 2003).

Die Regulation der parazellulären Route ist bisher noch unklar, obwohl Effekte von Calcitriol, das unter anderem für die Regulation des transzellulären Calcium-Transports verantwortlich ist (siehe 2.4.1), auf die *Tight junctions* nachgewiesen wurden (KUTUZOVA u. DELUCA 2004).

Der parazelluläre Phosphat-Transport spielt im Vergleich zur transzellulären Komponente (siehe 2.3.2.2), die circa 78% der Phosphat-Absorption ausmacht, nur eine geringe Rolle (ETO et al. 2006). Die zugrunde liegende Ursache ist mit hoher Wahrscheinlichkeit in der Kationen-Selektivität der *Tight junctions* (VAN ITALLIE u. ANDERSON 2006) begründet.

2.3.2. Transzellulärer Transport

Die transzelluläre Absorption von Elektrolyten ist ein mehrstufiger Prozess, der mindestens 3 Schritte beinhaltet: 1. Transport über die apikale Membran, 2. Transfer durch das Cytoplasma, 3. Ausschleusung über die basolaterale Membran (MURER u. HILDMANN 1981). Als aktiver, sättigbarer Transport werden hier Elektrolyte im Gegensatz zum parazellulären Weg auch gegen einen Konzentrationsgradienten transportiert (BRONNER 2003).

2.3.2.1. Transzellulärer Calcium-Transport

Die transzelluläre Komponente der Calcium-Absorption spielt prinzipiell eine bedeutsame Rolle in Situationen erhöhten Calcium-Bedarfs bzw. bei geringer Verfügbarkeit von alimentärem Calcium (PANSU et al. 1981). Das am weitesten akzeptierte Modell des aktiven, transzellulären intestinalen Calcium-Transports ist

eine Carrier-vermittelte Passage von Calcium über die in Abb. 2.3 vorgestellten Mechanismen.

Basierend auf Untersuchungen am Duodenum des Huhns wird daneben von einigen Autoren auch für Monogastrier ein nicht-genomisch regulierter vesikulärer Transport von Calcium postuliert, über welchen eine schnelle Aufnahme („Transcaltachia“) von Calcium auch bei niedrigen luminalen Calcium-Konzentrationen erfolgen kann (NEMERE u. NORMAN 1990; NEMERE 1992).

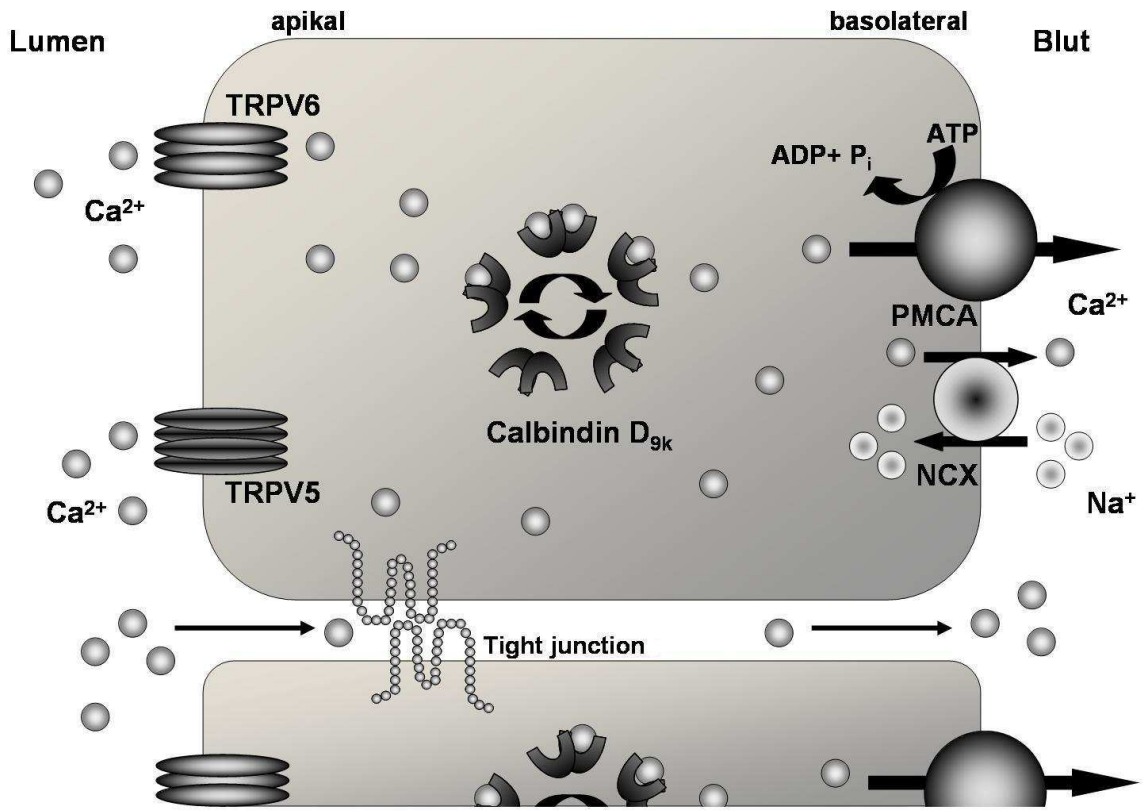

Abb. 2.3: Klassisches Modell des intestinalen trans- und parazellulären Calcium-Transports; Erläuterungen im Text (2.3.1 und 2.3.2); ADP = Adenosindiphosphat, ATP = Adenosintriphosphat, Ca^{2+} = ionisiertes Calcium, Na^+ = ionisiertes Natrium, NCX = Natrium/Calcium-Austauscher, TRPV5/6 = *transient receptor potential vanilloid channel type 5/6*, P_i = anorganisches Phosphat, PMCA = *plasma membrane Calcium-ATPase*.

Der klassische Mechanismus der aktiven transzellulären intestinalen Calcium-Absorption verläuft über die folgenden Teilschritte:

Eintritt von Calcium über die apikale Membran:

Die Aufnahme von Calcium in die Enterozyten erfolgt durch die Calcium-selektiven Kanäle TRPV5 und TRPV6 (*transient receptor potential vanilloid channel type 5/6*) an der apikalen Membran (VAN ABEL et al. 2005). Beide Kanäle werden der TRP-Superfamilie und der Subfamilie der TRPV-Kanäle zugeordnet (MONTELL et al. 2002). Sie kommen sowohl in der Niere als auch im Darm und in anderen Organen wie Pankreas, Prostata, Milchdrüse und Schweiß- sowie Speicheldrüsen vor (VAN ABEL et al. 2005). Der Kanal TRPV5 wird im Darm im Gegensatz zur Niere nur in geringem Ausmaß exprimiert, während es sich für TRPV6 umgekehrt verhält (HOENDEROP et al. 2001).

Nach ihrer Entdeckung im Monogastrier (HOENDEROP 1999; PENG et al. 1999; SUZUKI et al. 2000; HINTERDING 2002) konnten sowohl TRPV5 als auch TRPV6 im Darm des Schafes und der Ziege nachgewiesen werden (siehe Tabelle 2.1).

Sowohl TRPV5 als auch TRPV6 haben eine hohe Affinität für Calcium und sind maximal bei einem negativen Membranpotential (-150 bis -60 mV) geöffnet (MORGAN et al. 2003). Eine Aktivierung findet deshalb eher durch Hyperpolarisation als durch Depolarisation statt. Auch durch steigende intrazelluläre Calcium-Konzentrationen werden beide Kanäle inhibiert (HOENDEROP et al. 2002).

Die Aufnahme von Calcium durch TRPV6 wurde zunächst vor allem von HOENDEROP et al. (2002) als geschwindigkeitslimitierender Schritt angesehen. Seine wesentliche Beteiligung an der intestinalen Calcium-Absorption konnte durch Studien an TRPV6-*knockout* Mäusen, in denen eine verminderte Calcium-Absorption im Vergleich zu Wildtyp Mäusen beobachtet wurde, untermauert werden. Dennoch wurde in diesen Studien ebenfalls eine weiterhin bestehende aktive Absorption von Calcium nachgewiesen (BIANCO et al. 2007; BENN et al. 2008; KUTUZOVA et al. 2008). Dies zeigt, dass neben der in Abb. 2.3 gezeigten Absorption von Calcium

durch TRPV6 noch weitere TRPV6-unabhängige Mechanismen vorhanden sein könnten.

Transfer von Calcium durch das Cytoplasma

Der Transfer des apikal aufgenommenen Calciums durch das Cytoplasma zur basolateralen Membran wird prinzipiell durch das Calcium-bindende Protein, Calbindin-D_{9k}, vermittelt, welches im Vergleich zu einer freien Diffusion des Elektrolyts einen 70mal schnelleren Transport ermöglicht (KRETSINGER et al. 1982). Calbindin-D_{9k} ist bei Säugetieren hauptsächlich im Darm exprimiert (THOMASSET et al. 1982; SCHRÖDER et al. 2001). Es stellt nicht nur ein Carrier-Protein dar, sondern fungiert auch als Calcium pufferndes System, das einen Schutz gegen für die Zelle zu hohe und damit toxische Mengen an Calcium bei hohen luminalen Calcium-Konzentrationen bietet (SCHRÖDER u. BREVES 1996). Die Rolle von Calbindin-D_{9k} als geschwindigkeitslimitierender Faktor des Gesamtprozesses der intestinalen Calcium-Absorption wird kontrovers diskutiert. SLEPCHENKO und BRONNER (2001) konnten zeigen, dass sich der maximale transzelluläre Calcium-Transport direkt proportional zum zellulären Gehalt an Calbindin-D_{9k} verhält. Dagegen waren Calbindin D_{9k}-*knockout* Mäuse in einer Studie von LEE et al. (2007) in der Lage, die physiologischen Calcium-Konzentrationen im Blut aufrecht zu erhalten. Daraus schlussfolgernd nahmen die Autoren an, dass Calbindin-D_{9k} ein wichtiger Faktor des aktiven Calcium-Transports darstellt, dessen Defizienz jedoch durch eine gesteigerte Expression anderer Calcium-transportierender Strukturen wie TRPV6 oder PMCA kompensiert werden könnte. Fraglich bleibt dabei, auf welche alternative Art und Weise Calcium durch die Zelle transportiert werden könnte (LEE et al. 2007).

Ausschleusung von Calcium über die basolaterale Membran

Der Austritt der Calcium-Ionen aus den Enterozyten wird hauptsächlich durch die *plasma membrane Calcium-ATPase* (PMCA) vermittelt. Diese Calcium-Pumpe hat eine hohe Affinität zu Calcium und transportiert dieses in einem Verhältnis von 1:1 Ca^{2+}/ATP (BRINI u. CARAFOLI 2009). Es existieren mehrere Isoformen, wobei

PMCA1b die dominante Form im Darm darstellt (HOENDEROP et al. 2005). Circa 80% der Calcium-Ionen verlassen auf diese Weise die Zelle, die verbleibenden 20% werden durch den intestinalen Na^+/Ca^{2+}-Austauscher 1 (NCX1) mit einer Stöchiometrie von 3:1 transportiert (HINATA u. KIMURA 2004).

2.3.2.2. Transzellulärer Phosphat-Transport

Beim Wiederkäuer wird die endogene Sekretion von Phosphat, welches unter anderem mit dem Speichel in das Vormagensystem gelangt, neben der Reabsorption in den renalen proximalen Tubuli vor allem durch Absorption von Phosphat aus dem Gastrointestinaltrakt ausgeglichen. Eine Möglichkeit des intestinalen Phosphat-Transports besteht durch den im Duodenum von Schafen nachgewiesenen protonenabhängigen Phosphat-Transporter (H^+-P_i-Transporter), welcher durch die Menge des alimentären Phosphats beeinflusst werden kann (SHIRAZI-BEECHEY et al. 1991). Auch im Duodenum der Ziege konnten HUBER et al. (2002) die Präsenz eines solchen bisher noch nicht näher charakterisierten protonenabhängigen, Natrium-sensitiven Systems, das jedoch nicht durch alimentäres Phosphat beeinflussbar ist, nachweisen.

Im Jejunum der Ziege wird die Aufnahme von Phosphat auch durch den apikal lokalisierten Natrium-Phosphat (NaPi) Kotransporter IIb vermittelt (HUBER et al. 2002). Er wird in die Familie der SLC 34 (*solute carrier 34*) eingeordnet. Ebenfalls zugehörig sind NaPi-IIa und NaPi-IIc, welche hauptsächlich in der Niere lokalisiert sind. Die Expression von NaPi-IIb wurde erstmals von BERNER et al. (1976) im Dünndarm von Ratten gezeigt, konnte nachfolgend im Dünndarm von Hühnern (FUCHS u. PETERLIK 1980) und schließlich auch im Jejunum der Ziege nachgewiesen werden (HUBER et al. 2002). Des Weiteren ist er ebenfalls unter anderem in der Lunge, den Milchdrüsen, den Hoden und der Leber exprimiert (WERNER u. KINNE 2001). Seine intestinale Expression wird hauptsächlich durch Calcitriol (KATAI et al. 1999) und einer alimentären Phosphat-Reduktion gesteigert (HATTENHAUER et al. 1999; HUBER et al. 2002).

Neben der vorherrschenden NaPi-IIb-vermittelten Route deuten Studien an Vitamin D-defizienten Mäusen auf die Präsenz eines weiteren alternativen Mechanismus der intestinalen Phosphat-Absorption hin. Nach der Behandlung mit Calcitriol zeigten diese einen signifikanten Anstieg der Phosphat-Absorption bei jedoch unverändertem Expressionslevel von NaPi-IIb. Im Gegensatz dazu konnte ein signifikanter Anstieg des NaPi-III Kotransporters (PiT-2) beobachtet werden (KATAI et al. 1999). Dieser wurde im Dünndarm von Mäusen nachgewiesen (BAI et al. 2000) und wird der Familie der SLC 20 Transportproteine zugeordnet. Entgegen der gegenwärtigen Ansicht einer basolateralen Expression dieses Transporters könnte er ebenfalls auf apikaler Seite exprimiert sein und auf diese Weise eine wichtige Rolle bei der intestinalen Phosphat-Absorption spielen. Experimentell konnte dies allerdings noch nicht bestätigt werden (COLLINS et al. 2004).

Nach der apikalen Aufnahme findet ein Transport von Phosphat entlang des Mikrotubuli-Systems zur basolateralen Membran statt, an der die Ausschleusung des Elektrolyts erfolgt. Das Transportsystem des basolateralen Austritt ist bisher nicht eindeutig bestimmt und mehrere Transportwege wie ein Natrium-Phosphat Kotransport, ein Anionen-Austausch System oder ein unspezifischer Phosphat-Kanal wurden bisher postuliert (MURER et al. 2000).

2.3.2.3. Besonderheiten der gastrointestinalen Calcium- und Phosphat-Absorption beim Wiederkäuer

Bei den Wiederkäuern konnte neben der Calcium- und Phosphat-Absorption im Dünn- und Dickdarm durch diverse *In-vitro* - und *In-vivo*-Studien (GRACE et al. 1974; RAYSSIGUIER u. PONCET 1980; HÖLLER et al. 1988; SCHRÖDER et al. 1999; SIDLER-LAUFF et al. 2010) eine prinzipielle Rolle des Vormagensystems bei der Calcium-Absorption belegt werden. Dabei scheint die quantitative Beteiligung der präintestinalen Abschnitte an der Calcium-Absorption abhängig von der alimentären Calcium-Versorgung zu sein. So kommt es bei einem hohen Calcium-Gehalt im Futter zu einer gesteigerten Calcium-Nettoabsorption im Vormagensystem

(SCHRÖDER u. BREVES 2006). In strukturellen Untersuchungen an Schafen konnte jedoch nur eine sehr geringe Expression von TRPV6 im Pansen nachgewiesen werden, so dass die Präsenz eines alternativen Mechanismus für den Calcium-Transport im Vormagensystem postuliert wurde. Möglich wären hier ein apikal lokalisierter $Ca^{2+}/2H^{+}$ Austauscher und ein basolaterales Calcium-ATPase-vermitteltes Ausschleusungssystem (SCHRÖDER et al. 1999).

Wie in einer Studie von BEARDSWORTH et al. (1989) demonstriert werden konnte, ist nicht nur die Absorption von Calcium in den präintestinalen Abschnitten sondern auch die Absorption von Phosphat aus dem Vormagensystem abhängig von dessen alimentärer Verfügbarkeit. So konnte bei adulten Schafen bei einer ruminalen Phosphat-Konzentration von > 4,1 $mmol \cdot l^{-1}$ eine Phosphat-Nettoabsorption nachgewiesen werden (BREVES et al. 1988; BEARDSWORTH et al. 1989). Bei niedrigeren Konzentrationen von Phosphat in der Pansenflüssigkeit (~1,85 $mmol \cdot l^{-1}$) fand dagegen eine Phosphat-Sekretion statt (BEARDSWORTH et al. 1989). Im Gegensatz zu diesen *In-vivo*-Studien konnte bei *In-vitro*-Versuchen keine aktive transzelluläre Phosphat-Absorption im Pansen nachgewiesen werden. Die kritische Evaluation der unidirektionalen Fluxraten ergab jedoch Hinweise darauf, dass zumindest ein Teil des Phosphats durch transzelluläre Absorption transportiert wird (BREVES et al. 1988). WADHWA und CARE (2002) konnten in einer Studie an fistulierten Schafen eine signifikante Reduktion der Phosphat-Absorption bei einer 50%igen Senkung der Natrium-Konzentration im Pansensaft zeigen und postulieren daher die Existenz eines NaPi Kotransporters, wie er auch schon im Jejunum von Ziegen gezeigt werden konnte (HUBER et al. 2002) (siehe 2.3.2.2). Da auch eine Steigerung der Phosphat-Absorption bei einem erniedrigten pH-Wert gezeigt werden konnte, wurde als eine weitere Möglichkeit des transzellulären ruminalen Phosphat-Transportes eine Absorption durch einen $H^{+}P_{i}$ Kotransporter in Betracht gezogen (HUBER et al. 2002).

Die intestinale Calcium-Absorption dominiert beim monogastrischen Tier vor allem im Duodenum (PANSU et al. 1981), wohingegen sich bei *In-vitro*-Versuchen an Ziegen und Schafen deutliche Speziesunterschiede zeigten. So konnten SCHRÖDER et al.

(1997) in Ussingkammer-Versuchen an wachsenden Ziegen Calcium-Nettofluxraten sowohl im Duodenum als auch im Jejunum nachweisen, wohingegen bei adulten, bedarfsgerecht mit Calcium versorgten Schafen unter gleichen Bedingungen Calcium-Nettofluxe ausschließlich im Jejunum bestimmt werden konnten (SCHRÖDER et al. 1997). Die Ergebnisse der Untersuchungen mit Hilfe der Ussingkammer-Technik an Schafen können mit Expressionsstudien von WILKENS et al. (2009), in denen bei Schafen eine im Vergleich zum Duodenum höhere Expression von TRPV6 im Jejunum detektiert werden konnte, in Einklang gebracht werden. Das Duodenum und Colon scheinen dagegen keine signifikanten Rolle bei der transzellulären intestinalen Calcium-Absorption zu spielen (WILKENS et al. 2011).

Prinzipiell konnte der klassische Calcium-Transportweg auch im Darm von Schafen und Ziegen nachgewiesen werden (siehe Tab. 2.1). Allgemein waren jedoch in den funktionellen Studien die ermittelten Calcium-Fluxraten von Schafen und Ziegen im Vergleich zu denen monogastrischer Tiere (JUNGBLUTH u. BINSWANGER 1989) viel niedriger (WILKENS et al. 2011; WILKENS et al. 2012). *In vivo* könnten diese niedrigen Calcium-Fluxraten durch die Beteiligung des Pansens am Calcium-Transport und durch die beim Wiederkäuer im Vergleich zu monogastrischen Tieren größere Darmlänge ausgeglichen werden.

Tab. 2.1: Expression der Calcium-transportierenden Strukturen im Gastrointestinaltrakt von Schafen und Ziegen (+ = Expression; (+) = schwache Expression; - = keine Expression); TRPV5/6 = *transient receptor potential vanilloid channel type 5/6*, PMCA = *plasma membrane Calcium-ATPase*.

		TRPV5	TRPV6	Calbindin -D_{9k}	PMCA	Quelle
Schaf	Duodenum	+[5]	+[4]	+[5]	+[5]	[2] Schröder et al. 2001 [3] Wilkens et al. 2006 [4] Wilkens et al. 2009 [5] Wilkens et al. 2011
	Jejunum	+[5]	+[4]	+[2]	+[5]	
	Colon	+[5]	+[5]	-[5]	+[5]	
	Pansen	(+)[3]	(+)[4]	-[2]	+[5]	
Ziege	Duodenum	+[6]	+[6]	+[1, 6]	+[6]	[1] Rittman et al. 1996 [6] Wilkens et al. 2012
	Jejunum	+[6]	+[6]	+[1, 6]	+[6]	
	Colon	+[6]	+[6]	-[6]	+[6]	
	Pansen	-[6]	-[6]	-[6]	+[6]	

2.4. Aufrechterhaltung und Regulation der Calcium- und Phosphat-Homöostase

Die strikte Regulation der Calcium- und Phosphat-Konzentration im Blutplasma ist essentiell für die Erhaltung der lebenswichtigen physiologischen Funktionen und muss trotz Variationen in der täglichen alimentären Aufnahme und unterschiedlichen Bedarfs des Organismus innerhalb eines physiologischen Bereiches aufrecht gehalten werden.

2.4.1. Regulation durch die klassischen Hormone

Die Aufrechterhaltung der Calcium- und Phosphat-Homöostase erfolgt hauptsächlich durch eine effiziente und enge Regulation durch die 3 Hormone Calcitonin, Parathormon (PTH) und Calcitriol, welche die intestinale Absorption, die renale Exkretion und Reabsorption sowie den Influx und Efflux von Calcium und Phosphat in bzw. aus dem Knochen kontrollieren (NEMETH 1990).

Eine wichtige Rolle im Regulationsprozess der Calcium-Homöostase nimmt der G-Protein gekoppelte *Calcium sensing receptor* (CaSR) in der Nebenschilddrüse ein, welcher Veränderungen der Calcium-Konzentrationen im Blutplasma detektiert (BROWN et al. 1993). Ein hypercalcämischer Zustand führt durch Bindung von Calcium zu seiner Aktivierung und nachfolgend zu einer Inhibition der PTH-Sekretion sowie zu einer Stimulation der Calcitonin-Freisetzung (KUMAR et al. 2010). Das aus den parafollikulären C-Zellen der Schilddrüse freigesetzte Calcitonin hat diverse physiologische Funktionen. Es reduziert unter anderem die Osteoklasten-vermittelte Knochenresorption (ZAIDI et al. 2002) und hat einen Effekt auf den fetomaternalen Calcium-Austausch (KOVACS et al. 2002). Obwohl lange Zeit angenommen wurde, dass eine seiner wichtigsten Funktionen die Senkung des Calcium-Spiegels im Blut ist, konnte gezeigt werden, dass dieser in Abwesenheit von Calcitonin unbeeinflusst blieb (HOFF et al. 2002). Ein Anstieg der Calcitonin-Plasma-Konzentration mit Beginn der Laktation von 1,9 $ng \cdot ml^{-1}$ auf 11,6 $ng \cdot ml^{-1}$ konnte von GAREL et al. (1974) in einer Studie an laktierenden Schafen nachgewiesen werden. Eine Ursache für die

erhöhten Calcitonin-Spiegel in der Laktation, einer Situation in der eigentlich mehr Calcium benötigt wird, könnte laut STEVENSON (1979) in einer möglichen Schutzfunktion des maternalen Skeletts durch Calcitonin vor zu exzessiver Resorption von Calcium aus dem Knochen liegen.

Bei einer Hypocalcämie wird der CaSR nicht aktiviert, was zu einer Freisetzung von PTH führt. Das in der Nebenschilddrüse gebildete PTH stimuliert beim Monogastrier die renale Phosphat-Exkretion (AURBACH et al. 1972) und die aktive renale, tubuläre Calcium-Reabsorption (AGUS et al. 1973). Dies ermöglicht eine Calcium-Retention im Organismus. Zusätzlich steigert es die Calcium- und Phosphat-Mobilisation aus dem Knochen (TALMAGE 1967) und fördert bei einer chronischen Hypocalcämie durch Stimulierung der renalen 1α-Hydroxylase (BRENZA u. DELUCA 2000) die Umwandlung des Vitamin D in seine biologisch aktive Form, das Calcitriol, wodurch eine gesteigerte enterale Calcium- und Phosphat-Absorption möglich ist.

Das Secosteroid Calcitriol oder 1,25-$(OH)_2D_3$ ist der physiologisch aktive Metabolit des Vitamins D_3 (DELUCA et al. 1971). Seine inaktive Vorstufe, das Prohormon Vitamin D_3 (Cholecalciferol) kann durch Exposition mit ultraviolettem Licht (270 – 315 nm) aus dem endogen produzierten 7-Dehydroxycholesterol (HOLICK et al. 1980) gebildet werden oder mit der Nahrung, beispielsweise durch den Verzehr von Lebertran oder Fettfischen, direkt aufgenommen werden. In Form von Vitamin D_2 (Ergocalciferol) ist es außerdem in pflanzlichen Quellen enthalten. Es bindet nachfolgend an ein Vitamin D-bindendes Protein in den Kapillaren der Haut und wird entweder im Fettgewebe gespeichert oder zur Leber transportiert (HOLICK 1981). Hier findet der erste Hydroxylierungsschritt zu 25-OHD_3 (Calcidiol) statt. Die zweite Hydroxylierung erfolgt in der Niere, katalysiert durch das renale Enzym 25-Hydroxyvitamin-1α-Hydroxylase (1α-Hydroxylase), nach der die nun biologisch aktive Form des Vitamins D_3, das Calcitriol, für den Organismus zur Verfügung steht (FRASER u. KODICEK 1970). Der zweite Hydroxylierungsschritt ist abhängig von der Calcium-Konzentration im Blutplasma. Ist die Konzentration erniedrigt, wird 25-OHD_3 zu Calcitriol hydroxyliert. Bei einer adäquaten Calcium-Konzentration findet eine 24-Hydroxylierung zu einem inaktiven Metaboliten statt (JONES et al. 1998).

Auch die Konzentration von Phosphat im Blut nimmt Einfluss auf die 1α-Hydroxylase. Geringe Konzentrationen induzieren eine von PTH und Calcium-Konzentrationen unabhängige renale Aktivität dieses Enzyms (TANAKA u. DELUCA 1973), während hohe Spiegel an Phosphat die Calcitriol-Bildung durch die Aktivität von Phosphatoninen und dem *Fibroblast growth factor 23* (FGF 23) inhibieren (BERNDT et al. 2005).

Die genomische Wirkungsweise von Calcitriol wird durch seine Bindung an den Vitamin D-Rezeptor, eines nuklearen Rezeptors für Steroidhormone, vermittelt. Durch eine Heterodimerisation mit einem Retinoid X Rezeptor (RXR) steigert dieser seine Affinität für Calcitriol (GLASS 1994). Im Zellkern bindet der VDR-RXR-Calcitriol-Komplex an spezifische Sequenzen, so genannte Vitamin D-abhängige Elemente (*vitamin D responsive elements*, VDREs), in der Promoterregion der Zielgene und kann dort ihre Transkription inhibieren oder steigern (HAUSSLER et al. 1998).

Im Darm fördert Calcitriol die aktive Aufnahme und den transzellulären Transport von Calcium und Phosphat durch Steigerung der Expression Calcium- und Phosphat-transportierender Strukturen (siehe 2.3.2.1 und 2.3.2.2). Im Skelettsystem treibt Calcitriol, in Zusammenarbeit mit PTH, die Mobilisation des Vorrats an Calcium aus dem Knochen durch Induktion der Osteoklastengenese voran (BALDOCK et al. 2006). In der Niere kontrolliert Calcitriol indirekt seine eigene Produktion durch Inhibierung der renalen 1α-Hydroxylase und Stimulierung der 24-Hydroxylase (MURAYAMA et al. 1999).

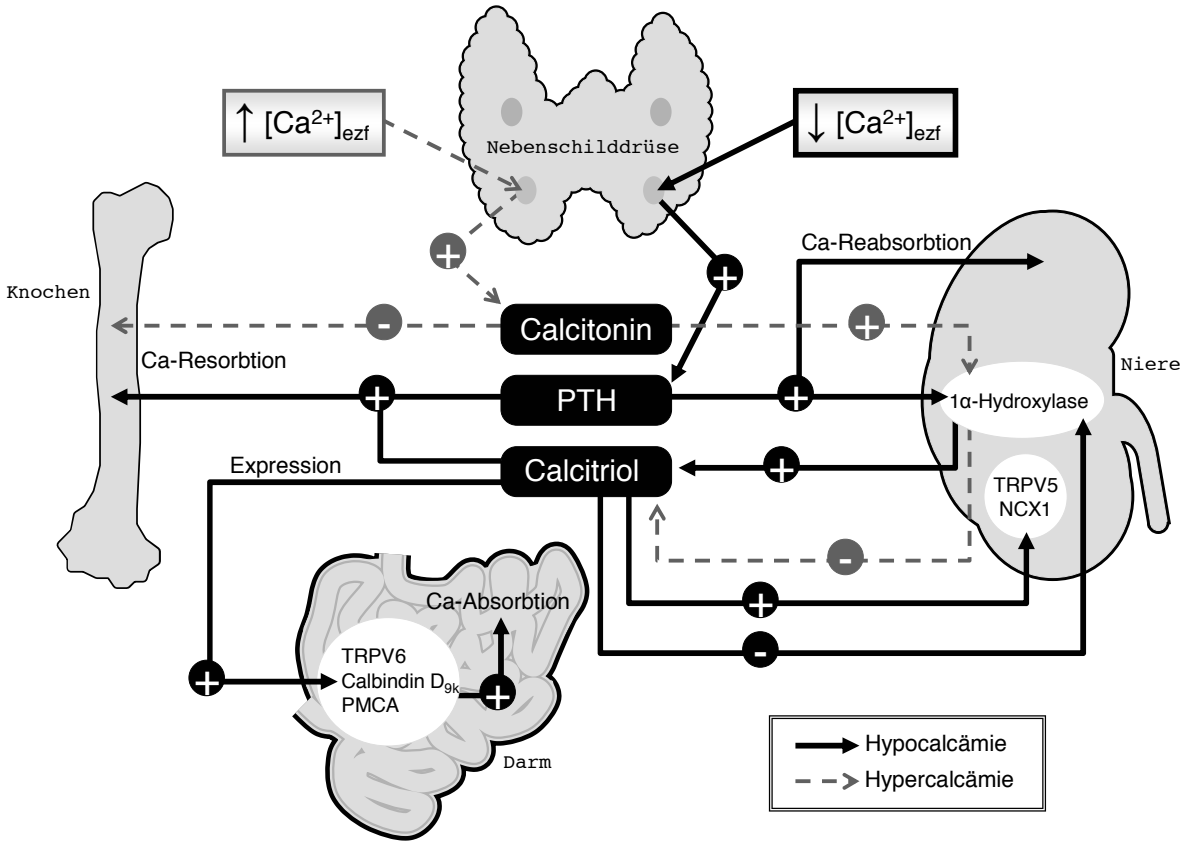

Abb. 2.4: Schema der Regulation der Calcium-Homöostase durch die klassischen Hormone; Ca^{2+} = ionisiertes Calcium, ezf = extrazelluläre Flüssigkeit, NCX1 = Natrium/Calcium-Austauscher 1, TRPV5/6 = *transient receptor potential vanilloid channel type 5/6*, PMCA = *plasma membrane Calcium-ATPase*, PTH = Parathormon.

2.4.2. Regulation der Calcium-Homöostase bei Wiederkäuern in der Trächtigkeit und der Laktation

Beim monogastrischen Tier ist die intestinale Calcium-Absorption während der Trächtigkeit und der Laktation gesteigert (HALLORAN u. DELUCA 1980). Diese gehen mit einer steigenden Konzentration von Calcitriol im Plasma einher, welche die intestinale Calcium-Absorption durch entsprechende Regulationsmechanismen (siehe 2.4.1) stimuliert (BOASS et al. 1997). Dass Calcitriol auch bei Wiederkäuern einen Effekt auf den intestinalen Calcium-Transport hat, konnte BRAITHWAITE (1978) in Bilanzversuchen an laktierenden Mutterschafen durch eine Behandlung mit 1α-Hydroxycholecalciferol, eines synthetischen Vorläufers des aktiven Metaboliten Calcitriol, zeigen. So stieg bei 1-α-Hydroxycholecalciferol-behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe die intestinale Calcium-Absorptionsrate um mehr als das Doppelte (Kontrollgruppe (n = 5): 41,1 $mg \cdot Tag^{-1} \cdot kg^{-1}$ KGW; Versuchsgruppe (n = 5): 86,6 $mg \cdot Tag^{-1} \cdot kg^{-1}$ KGW). Da analog zum Monogastrier auch bei Wiederkäuern mit Einsetzen der Laktation ein Anstieg der im Plasma zirkulierenden endogenen Calcitriol-Konzentration beobachtet wurde (YAMAGISHI et al. 2005), könnte bei diesen Tieren ein ähnlicher Effekt vorliegen.

Obwohl Calcitriol wahrscheinlich das hauptsächlich regulierende Hormon der intestinalen Calcium-Absorption darstellt, konnte in Studien an Vitamin D-defizienten trächtigen und laktierenden Ratten ein gesteigerter intestinaler Calcium-Transport beobachtet werden (HALLORAN et al. 1979). Des Weiteren konnten LIESEGANG et al. (2007a) bei laktierenden Schafen und Ziegen zeigen, dass die Menge an intestinalem VDR mit Beginn der Laktation bei gleichzeitiger Zunahme der Calcium-Absorption abfällt. Diese Ergebnisse zeigen, dass neben Calcitriol noch andere Regulatoren bei der Erhaltung der Calcium-Homöostase von Bedeutung sein könnten. Eines dieser zusätzlichen Calcium-regulierenden Hormone könnte das laktogene Polypeptidhormon Prolaktin darstellen. Ein Effekt von Prolaktin konnte bereits in einer Studie an Vitamin D-defizienten, trächtigen bzw. laktierenden Mäusen nachgewiesen werden. Hierbei induzierte die trächtigkeits- und laktationsbedingte Hyperprolaktinämie eine etwa 2fache Steigerung des Calcium-Fluxes durch

Expressionssteigerung der Calcium-transportierenden Strukturen TRPV5, TRPV6 und Calbindin-D_{9k} (CHAROENPHANDHU et al. 2010). Weiterhin spricht die Tatsache, dass Prolaktin in Kombination mit Calcitriol im Vergleich zu einer alleinigen Wirkungsweise zu einem signifikanten Anstieg des Calcitriol-induzierten Transportes führt, für einen möglichen synergistischen Effekt bei der Regulation des intestinalen Calcium-Transportes (AJIBADE et al. 2010).

Da bei Schafen ein Anstieg der Konzentration von Prolaktin von 2-6 $ng \cdot ml^{-1}$ vor der Gestation auf 60-350 $ng \cdot ml^{-1}$ mit dem Einsetzen der Laktation beobachtet werden konnte (DAVIS et al. 1971), könnte Prolaktin als zusätzlicher Modulator der Calcium-Homöostase auch bei Wiederkäuern eine Rolle spielen.

2.5. Zielsetzung

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen inwiefern die Geburt, das Einsetzen der Laktation sowie das Trockenstellen von Schafen und Ziegen einen Effekt auf die die Calcium-Homöostase beschreibenden Parameter im Plasma haben und ob sich diese Effekte spezies-spezifisch unterscheiden. Hierfür wurden die Konzentrationen der jeweiligen Parameter im Blutplasma bestimmt und Verlaufsprofile der relevanten Makromineralien und Knochenmarker sowie von Calcitriol erstellt.

Ein weiteres Ziel war es zu ermitteln, in welcher Art und Weise die Laktation einen Einfluss auf die gastrointestinale Calcium- und intestinale Phosphat-Absorption von Schafen und Ziegen hat. Da sich aus früheren Untersuchungen zum gastrointestinalen Transport von Calcium unter einer alimentären Calcium-Restriktion bereits Hinweise auf spezies-spezifische Unterschiede ergeben haben (WILKENS et al. 2011; WILKENS et al. 2012), sollte dieser Aspekt ebenfalls in die Untersuchungen miteinbezogen werden.

Zur strukturellen Untersuchung der beteiligten Mechanismen wurde die Expression der Calcium-transportierenden Strukturen (TRPV6, Calbindin-D_{9k} und PMCA) mit Hilfe von quantitativer RT-PCR und Western-Blot-Analysen auf Transkriptions- und Translationsebene sowie die Protein-Expression des apikalen Natrium-Phosphat-Kotransporters (NaPi-IIb) bestimmt. Eine funktionelle Charakterisierung der gastrointestinalen Epithelien erfolgte mit Hilfe der Ussingkammer-Technik, mit welcher Calcium-, Phosphat- und Mannit-Fluxraten am Duodenum und Jejunum sowie die Calcium- und Mannit-Fluxraten am Pansen bestimmt wurden.

Mittels der beschriebenen Untersuchungsmethoden sollen neue Erkenntnisse sowohl über das klassische System des Calcium-Transportes über die 3 Calcium-transportierenden Strukturen TRPV6, Calbindin-D_{9k} und PMCA als auch alternative Mechanismen oder einer möglichen synergistischen Wirkungsweise mehrerer Mechanismen in der Laktation gewonnen werden. Ein Vergleich zwischen Schafen

und Ziegen erfolgt in diesem Zusammenhang auch in Hinblick auf eine mögliche Nutzung des kleinen Wiederkäuers als Modell für entsprechende Untersuchungen der Regulationsmechanismen der Calcium- und Phosphat-Homöostase bei der Milchkuh.

3 Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Tiere

Die in dieser Studie verwendeten Tiere wurden in einem kommerziellen Schaf- bzw. Ziegenzuchtbetrieb erworben und im Stall des Physiologischen Instituts der Tierärztlichen Hochschule Hannover gruppenweise (n_{Schafe} = 5; n_{Ziegen} = 6) eingestallt. Es wurden 10 weibliche Schafe, 2 bis 6 Jahre alt, mit einem Gewicht zwischen 55 und 81 kg der Rasse „Ostfriesisches Milchschaf“ in die Studie einbezogen. Weiterhin standen 12 weibliche Ziegen im Alter von etwa 2 Jahren, zwischen 37 und 53 kg der Rasse „Weiße Deutsche Edelziege“ zur Verfügung.

Fünf bzw. sechs der Schafe und Ziegen der Versuchsgruppe der „laktierenden Schafe und Ziegen“ waren zum Zeitpunkt der Einstallung nachweislich trächtig. Der Trächtigkeitsnachweis fand durch eine sonographische Untersuchung statt und der Geburtszeitpunkt wurde anhand des ungefähren Bedeckungszeitraumes kalkuliert. Die Versuchsperiode erstreckte sich über einen Zeitraum von 10 Tagen vor der Geburt bis 21 Tage *post partum*. Die Tiere wurden zum Einen für die Ermittlung der peripartalen Plasmaparameter (Ca^{2+}, Ca_t, P_i, Calcitriol, OC, CrossLaps®) sowie zum Vergleich von laktierenden und trockengestellten Tieren auf analytischer, struktureller und funktioneller Ebene verwendet und im Anschluss durch Bolzenschuss und Entbluten durch einen Kehlschnitt geschlachtet. Die übrigen 5 bzw. 6 Schafe und Ziegen befanden sich zum Zeitpunkt der Einstallung seit circa 3 Monaten in der Laktation. Als Gruppe der „trockengestellten Schafe und Ziegen“ wurden sie durch Ausbleiben des Melkens trockengestellt. Sieben Wochen nach dem Trockenstellen wurden die Tiere geschlachtet.

3.1.2. Fütterung und Melken

Sowohl die Schafe als auch die Ziegen wurden in Laufboxen auf Stroh gehalten und mit Ausnahme von individuellen Kraftfutterrationen während des Melkens gruppenweise gefüttert. Die Fütterung der laktierenden als auch der trockengestellten Tiere wurde bedarfsgerecht angepasst. Zur Deckung des Erhaltungsbedarfs erhielten sie Heu *ad libitum*. Die trächtigen Schafe und Ziegen erhielten zur Aufwertung des Grundfuttermittels zusätzlich ein an ihren Leistungsbedarf angepasstes Mineralfuttermittel, das bis 4 Wochen *ante partum* zugesetzt wurde, und ein Kraftfuttermittel, welches in der Laktation entsprechend ihrer Milchleistung (siehe 4.1) gegeben wurde.

Die laktierenden Schafe und Ziegen wurden 3mal pro Tag gemolken und die Milchmenge [$ml \cdot Tag^{-1}$] bestimmt und dokumentiert. Die nachfolgenden Kraftfuttergaben wurden entsprechend der Milchmenge des vorherigen Melkens berechnet. Zur Deckung des Leistungsbedarfs wurde dabei 800 g $Kraftfutter \cdot kg^{-1}$ ermolkene Milch gefüttert (siehe Tab. 3.1).

Tab. 3.1: Zusammensetzung der Pellets [in % der ursprünglichen Substanz bzw. in I.E.·kg^{-1}] und Bedarf von Rohprotein, Calcium und Phosphat pro kg Milch sowie die in 800 g Pellets enthaltene Menge zur Deckung des Leistungsbedarfs.

Nährstoffgehalte je kg Futter		**Leistungsbedarf pro kg Milch**	**In 800 g Kraftfutter enthaltene Nährstoffgehalte**
Rohprotein	20 %	140 g	160 g
Rohfett	2,6 %		
Rohfaser	11 %		
Rohasche	8,7 %		
Calcium	0,9 %	5,3 g	7,2 g
Phosphor	0,55 %	1,9 g	4,4 g
Natrium	0,20 %		
Vitamin A	10 000 I.E./kg		
Vitamin D_3	1 000 I.E./kg		

3.1.3. Entnahme der Blutproben

Blutproben wurden durch eine Punktion der *Vena jugularis* über eine 1,20 x 40 mm Kanüle (B. Braun Melsungen AG, 34212 Melsungen) in Lithium-Heparin- und EDTA-Monovetten (Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., 51588 Nümbrecht) entnommen. Bei den trächtigen Tieren erfolgten die Blutentnahmen alle 2 Tage, vom 10. Tag vor der Geburt bis 10 Tage p.p. und bei den Schafen zusätzlich am Tag der Schlachtung. Die Blutprobenentnahme-Zeitpunkte sind in Abbildung 3.1 dargestellt. Die trockengestellten Tiere wurden 6 Wochen regelmäßig im Abstand von 7 Tagen beprobt.

Das Blutplasma wurde nach der Entnahme durch eine Zentrifugation für 10 min bei 2000 *g* bei 20°C (Minifuge 2; Heraeus Instruments, 63450 Hanau bzw. Sorvall® RC-5C, Rotor SM 24; Sorvall Instruments, Du Pont Company, Wilmington, USA) separiert und bis zur weiteren Analyse der Plasmaparameter (siehe 3.2.1) bei -20°C in 1,5 ml-Eppendorf-Tubes (Eppendorf AG, 22331 Hamburg) eingefroren.

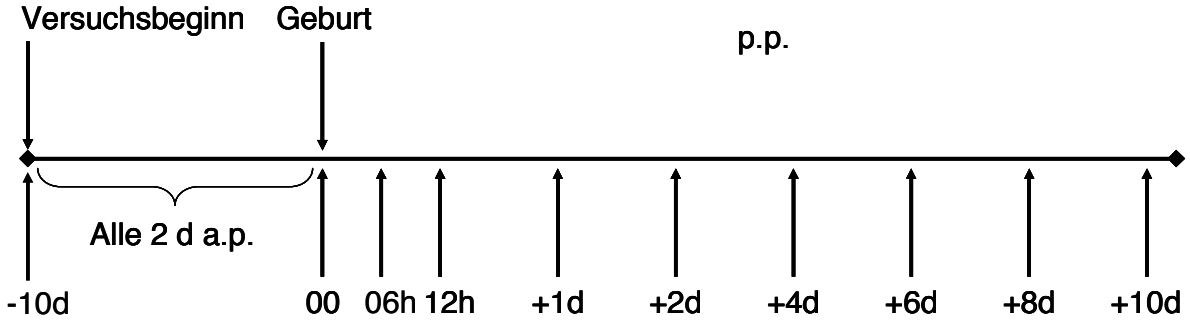

Abb. 3.1: Zeitachse der Blutprobenentnahmen vor, während und nach der Geburt; a.p. = *ante partum,* d = Tage , h = Stunde, p.p. = *post partum*.

3.1.4. Entnahme von Gewebeproben

Einundzwanzig Tage p.p. bzw. 7 Wochen nach dem Trockenstellen wurden die Tiere mittels Bolzenschuss betäubt und durch einen Kehlschnitt entblutet. Anschließend wurde die Bauchhöhle eröffnet und Proben des ventralen Pansensacks, des Duodenums, des Jejunums und des Colons entnommen.

Weiterhin wurden Pansen- und Labmagenflüssigkeit mit Hilfe eines Entnahmestabes mit aufgesetzter Spritze entnommen und der pH mit einer pH-Elektrode (Metler Toledo Inlab®, 8606 Greifensee) bestimmt.

Für die RNA-Isolierung (siehe 3.4.1) und Gewinnung von apikalen- und Gesamtmembranen sowie Cytosol (siehe 3.4.3 bis 3.4.5) zur Western-Blot-Analyse (siehe 3.5.3) wurde ein circa 5 cm x 5 cm großes Stück des ventralen Pansensacks und etwa 30 cm der oben genannten Darmabschnitte entnommen. Die intestinalen Abschnitte wurden mesenterial aufgeschnitten und zur Entfernung der enthaltenden Ingesta in eiskalter physiologischer Kochsalzlösung gespült. Mittels eines

Objektträgers wurde nun die *Lamina epithelialis* und die *Lamina propria* der *Tunica mucosa* von der *Lamina muscularis mucosae* separiert und in kleinen Teilen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Beim Pansen erfolgte die Trennung der *Lamina propria mucosae* von den darunter liegenden Schichten mit Hilfe einer gebogenen Pinzette. Die Lagerung der Gewebeproben in Minivials (Polyethylen Vial, 6 ml; PerkinElmer) bis zur weiteren Präparation erfolgte bei -80°C.

Ein zusätzliches Stück des ventralen Pansensacks sowie weitere 30 cm des Duodenums und des Jejunums wurden für die unmittelbar nach Probenentnahme stattfindende Messung der gastrointestinalen Fluxraten entnommen. Die Aufbewahrung bis zum Einspannen der Epithelien in die Ussingkammern erfolgte im Falle des Pansens in einer 37°C warmen, carbogenbegasten Puffer-Lösung und für die entnommenen Darmabschnitte in eisgekühlter mit Carbogen begaster serosaler Pufferlösung (siehe Anhang A) . Die weiteren funktionellen Untersuchungen in der Ussingkammer (siehe 3.3) erfolgten an der *Lamina propria mucosae*, die unmittelbar vor dem Einspannen mit Hilfe einer gebogenen Pinzette von der *Tunica serosa* und der *Tunica muscularis* getrennt wurde.

3.2. Analytische Methoden

3.2.1. Konzentrationsbestimmung von Parametern der Makromineral-Homöostase im Vollblut bzw. im Plasma

3.2.1.1. Ionisiertes Calcium (Ca^{2+})

Die Konzentrationen an Ca^{2+} wurden bei den laktierenden Schafen und Ziegen mit Hilfe einer Ionen-sensitiven Elektrode (Rapidlap™ 348; Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, 65760 Eschborn) unmittelbar nach der Blutprobenentnahme im Vollblut gemessen.

3.2.1.2. Gesamtcalcium (Ca_t)

Zur Bestimmung der Konzentrationen von Ca_t im Blutplasma diente die o-Kresolphthalein-Komplexon-Methode (SARKAR u. CHAUHAN 1967). Hierbei wird ein violetter Komplex aus Calcium und o-Kresolphthalein-Komplexon in alkalischer Lösung gebildet. Die Farbintensität des gebildeten Komplexes ist direkt proportional zu der zu ermittelnden Ca_t-Konzentration.

Durchführung

Jeweils 25 µl Plasma bzw. 25 µl einer Standardreihe (0,5 mmol·l^{-1}, 1,5 mmol·l^{-1}, 2 mmol·l^{-1}, 3 mmol·l^{-1} $CaCl_2$) wurden mit 500 µl einer 2-Amino-2-Methylpropanol-Lösung (3,5 mmol·l^{-1}, pH 10,8) und 500 µl einer Farbstofflösung (0,16 mmol·l^{-1} o-Kresolphthalein-Komplexon und 6,89 mmol·l^{-1} 8-Hydroxychinolin in 0,06 mmol·l^{-1} HCl) versetzt. Zur Qualitätssicherung wurde als Kontrolle 25 µl unverdünntes Precinorm (Bio-Rad Laboratories GmbH, 80939 München) verwendet und in der Folge analog zu den Proben behandelt. Nach einer 10minütigen Inkubation wurde

die Extinktion mit einem Photometer (DU® 640 Spectrophotometer; Beckman Coulter GmbH, 47807 Krefeld) bei einer Wellenlänge von 570 nm gegen einen Leerwert, der nur die beiden Lösungen enthielt, gemessen. Alle Proben sowie die Standardreihe wurden im Doppelansatz ermittelt und der jeweilige Mittelwert für die weitere Berechnung der Konzentration an Ca_t verwendet.

Berechnung der Ca_t-Konzentrationen

Aus den Extinktions- und Konzentrationswerten der Standardreihe wurde eine lineare Regression erstellt, aus welcher anhand der ermittelten Extinktionsmittelwerte der Plasmaproben die Konzentrationen an Ca_t in den Proben berechnet werden konnten.

3.2.1.3. Anorganisches Phosphat (P_i)

Die colorimetrische Messung beruht auf der Bildung eines gelben Farbkomplexes aus P_i mit Molybdat und Vanadat in salpetersaurer Lösung, dessen Farbintensität proportional zur P_i-Konzentration ist (PETER 1982).

Durchführung

Vorab wurden die Proben einer Enteiweißung unterzogen. Dazu wurden die Plasmaproben im Verhältnis von 1:11 mit TCA (1,2 $mmol \cdot l^{-1}$) versetzt und 10 min bei 714 *g* und 4°C zentrifugiert (GS-15R Centrifuge; Beckman Coulter GmbH, 47807 Krefeld). Anschließend wurden jeweils 400 μl des Überstandes bzw. 400 μl der Lösungen einer Standardreihe (0,5 $mmol \cdot l^{-1}$, 1,5 $mmol \cdot l^{-1}$, 2 $mmol \cdot l^{-1}$, 3 $mmol \cdot l^{-1}$ KH_2PO_4) mit dem gleichen Volumen Ammoniumvanadat (21 $mmol \cdot l^{-1}$) und Ammoniummolybdat-Lösung (40 $mmol \cdot l^{-1}$) vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 405 nm gegen den Leerwert, der ausschließlich die beiden zugesetzten Lösungen und TCA in gleichen Volumina enthielt, gemessen. Alle Messungen wurden im Doppelansatz durchgeführt.

Berechnung der Konzentrationen an P_i

Die Berechnung der P_i-Konzentrationen erfolgte in Analogie zu der Kalkulation der Ca_t-Werte (siehe 3.2.1.1).

3.2.1.4. Calcitriol

Die Konzentrationen von Calcitriol im Blutplasma wurden von der Firma Immundiagnostik AG (64625 Bensheim) mit Hilfe eines e*nzym-linked-immuno-sorbent-assays* (ELISA) bestimmt.

3.2.1.5. Osteocalcin (OC)

Osteocalcin (OC) ist ein im Knochen vorhandenes nicht-kollagenes Peptid, welches aufgrund seiner Bildung von Osteoblasten und seiner Bindung an Hydroxylapatit und Calcium als Marker für Knochenformation dient (GUNDBERG et al. 1984). Zur quantitativen Bestimmung von intaktem OC in Plasmaproben wurde der MicroVue Osteocalcin Enzym-Immunassay (EIA) (Quidel Corporation, CA 95051 Santa Clara, USA) verwendet. Hierbei handelt es sich um einen kompetitiven Immunassay. Das Kit enthält Teststreifen, die mit OC beschichtet sind, einen Anti-OC-Antikörper aus Mäusen, ein alkalisches Anti-Maus-IgG-Phosphatasekonjugat und ein para-Nitrophenylphosphat (pNPP)-Substrat.

Vorbereitung der verwendeten Reagenzien

Vorab wurden alle Reagenzien des Kits auf eine Temperatur von 20 bis 25°C erwärmt. Die Herstellung des benötigten Volumens eines 1fachen Waschpuffers, erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers. Etwa 2 h vor Gebrauch wurden alle benötigten Fläschen des Enzymkonjugats mit 10 ml des 1fach konzentrierten Waschpuffers versetzt und gewartet bis sich alle Tabletten vollständig gelöst hatten. Die OC-Standardlösungen und Kontrollen wurden vor dem Gebrauch innerhalb einer Stunde mit 0,5 ml 1fach konzentriertem Waschpuffer hergestellt, wobei sich die

Tabletten wiederum in einem Zeitraum von mindestens 15 min vollständig auflösten. Der nicht benötigte Teil der Standardlösungen und Kontrollen wurde bei -20°C gelagert. Innerhalb 1 h vor Gebrauch wurde nachfolgend die Substratlösung angesetzt, wobei in jede benötige Substratflasche eine Substrattablette gegeben wurde.

Durchführung

Nach dem Auftauen der zu messenden Plasmaproben in einem 37°C warmen Wasserbad und einer Verdünnung der Proben mit destilliertem Wasser in einem Verhältnis von 1:4 wurden innerhalb von 30 min je 25 µl Standardlösung, Kontrolle oder Probe in die Vertiefung der beschichteten, vorher beschrifteten Teststreifen gegeben. Anschließend wurden je 125 µl Anti-OC in die Vertiefungen gegeben und für 2 h ± 10 min bei 20 – 25°C inkubiert. Die Teststreifen wurden danach automatisch entleert und nachfolgend jeweils 3mal mit mindestens 300 µl des 1fach konzentrierten Waschpuffers, der in jede Vertiefung gegeben wurde, gewaschen (Tecan Reader, Nanoquant Infinite M-200, Tecan Group Ltd, 8708 Männedorf, Schweiz). Danach wurden die Teststreifen manuell kräftig ausgeschlagen um eine Trocknung zu erzielen. Je 150 µl des Enzymkonjugats wurden nachfolgend in die Vertiefungen gegeben und bei 20 – 25°C für 60 ± 5 min inkubiert und die Teststreifen anschließend in oben beschriebener Weise gewaschen und getrocknet. Es folgte eine 35 – 40minütige Inkubation mit dem vorher in die Vertiefungen gegebenen 150 µl Substratlösung bei 20 – 25°C. Zum Stoppen der Reaktion wurde anschließend je 50 µl Stopplösung in die Vertiefungen gegeben. Nachfolgend konnte innerhalb von 15 min die Extinktion bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen werden. Zum Analysieren der Ergebnisse des MicroVue Osteocalcin EIA wurde eine Quantifizierungssoftware (Magellan™ Data Analysis Software) verwendet.

3.2.1.6. CrossLaps®

Die CrossLaps® stellen Abbauprodukte C-terminaler Telopeptide des Typ-I Kollagens dar, welches mehr als 90% der organischen Matrix des Skelettsystems ausmacht

und vorwiegend im Knochen synthetisiert wird. Im Zuge des Knochenresorptionsprozesses wird das Typ-I Kollagen abgebaut und die CrossLaps® gelangen als Peptidfragmente in den Blutstrom und können dort als Knochenresorptionsmarker quantitativ bestimmt werden. Hierfür wurde der Serum CrossLaps® ELISA Test (Immundiagnostic Systems GmbH, 60329 Frankfurt am Main) verwendet. Dieser basiert auf 2 hochspezifischen monoklonalen Antikörpern gegen die Aminosäurensequenz EKAHD-β-GGR. Um ein spezifisches Signal in dem Serum CrossLaps® ELISA messen zu können, müssen 2 Ketten des EKAHD-β-GGR vernetzt werden. Durch Zugabe eines Gemisches von biotinyliertem Antikörper und einem Peroxidase-konjugiertem Antikörper zu den Plasmaproben bildet sich ein Komplex, welcher an der Streptavidinoberfläche über dem biotinylierten Antikörper bindet. Zur Messung der Absorption in Form einer Farbreaktion wird ein chromogenes Substrat hinzugefügt. Die Farbreaktion wird abschließend mit Schwefelsäure gestoppt und die Extinktion kann bei einer definierten Wellenlänge gemessen werden.

Durchführung

Der Serum CrossLaps® ELISA Test wurde bei einer Temperatur von 18 – 22°C durchgeführt werden. Neben den Proben wurden zusätzlich eine Standardreihe (Standard 0-5) sowie 2 Kontrollen gemessen. Zunächst wurden die Lösungen des biotinylierten Antikörpers, des Peroxidase-konjugierten Antikörpers und der Inkubationspuffer in einem Volumenverhältnis von 1:1:100 unter Vermeidung von Schaumbildungen vermischt. Nachfolgend wurden je 50 µl des Standards, der Kontrollen und der zu messenden Plasmaproben in die dafür vorgesehenen Vertiefungen pipettiert und mit je 150 µl Antikörperlösung versetzt. Die Immunostrips wurden anschließend mit einem Klebestreifen bedeckt und für 120 ± 5 min bei 18 – 22°C auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler (300 rpm) inkubiert und danach 3mal mit einem automatischen Plattenwäscher (Tecan Reader, Nanoquant Infinite M-200, Tecan Group Ltd, 8708 Männedorf, Schweiz) gewaschen. Danach wurden jeweils 100 µl Substratlösung in jede Vertiefung pipettiert und für 15 ± 2 min bei 18 – 22°C im Dunklen auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler (300 rpm) inkubiert. Die einsetzende

Farbreaktion wurde mit 100 μl Stopplösung, die in jede Vertiefung pipettiert wurde, gestoppt. Abschließend konnte die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm mit 650 nm als Referenz innerhalb von 2 h gemessen werden. Zum Analysieren der Ergebnisse des Serum CrossLaps® ELISA Tests wurde eine Quantifizierungssoftware (Magellan™ Data Analysis Software) verwendet.

3.2.2. Konzentrationsbestimmung von Gesamtcalcium und anorganischem Phosphat in Pansen- und Labmagenflüssigkeit

Die Bestimmung der Konzentrationen von Gesamtcalcium (Ca_t) und anorganischem Phosphat (P_i) in der Pansen- und Labmagenflüssigkeit erfolgte analog zur Vorgehensweise der Bestimmung in Plasmaproben (siehe 3.2.1.1 und 3.2.1.2). Vorab jedoch fand je nach Konzentration der Probe eine Verdünnung mit destilliertem Wasser im Verhältnis von 1:5 oder 1:10 statt.

3.2.3. Bestimmung der Proteinkonzentration in Gewebepräparationen

Zur Quantifizierung der in den Western-Blot-Analysen eingesetzten Gesamt- und Bürstensaummembranpräparationen sowie die des Cytosols wurden die entsprechenden Proteinkonzentrationen mit Hilfe des Bio-Rad Proteinassays (Bio-Rad Laboratories GmbH, 80939 München) bestimmt. Das Absorptionsmaximum des enthaltenden Farbstoffes, Coomassie-Brilliant-Blau G-250, verschiebt sich in saurer Lösung durch Bindung an Proteinstrukturen von 465 nm nach 595 nm (BRADFORD 1976). Hierbei wird der zuvor als rotes Kation vorliegende Farbstoff in seine anionische Form überführt und färbt sich blau. Durch zeitgleiche Messung einer Standardreihe bekannter Konzentrationen an gamma-Globulin (Bio-Rad Protein Standard; Bio-Rad Laboratories GmbH, 80939 München) ist dadurch die Ermittlung unbekannter Probenwerte möglich. Die Inkubation mit oberflächenaktivem Saponin vor der Zugabe des Farbreagenz verbessert die Darstellung der Proteinbindungsstellen.

Durchführung

Nach dem Auftauen der Proben wurden diese durch mehrmaliges Aufziehen mit einer 1 ml-Einmalspritze und einer 0,45 x 0,23 mm Kanüle homogenisiert und anschließend in einem Verhältnis von 1:20 für Gesamtmembranen und cytosolische Präparationen oder 1:10 für intestinale Bürstensaummembranen mit destilliertem Wasser verdünnt. 50 μl der verdünnten Probe beziehungsweise 50 μl destilliertes Wasser als Leerwert wurden mit gleicher Menge an 1%iger Saponinlösung vermischt. Nach einer 20minütigen Inkubationszeit erfolgte die Zugabe von 2,5 ml des zuvor in einem Verhältnis von 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnten Bio-Rad-Farbreagenz zu allen Proben. Nach weiteren 10 min konnte die Extinktion im Photometer (DU® 640 Spectrophotometer; Beckman Coulter GmbH, 47807 Krefeld) bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen den Leerwert gemessen werden. Parallel dazu wurde die Extinktion von 4 verschiedenen Konzentrationen (0,147 $\mu g \cdot \mu l^{-1}$, 0,294 $\mu g \cdot \mu l^{-1}$, 0,441 $\mu \cdot \mu l^{-1}$, 0,588 $\mu g \cdot \mu l^{-1}$) eines gamma-Globulin-Standards (Bio-Rad Laboratories GmbH, 80939 München) ermittelt. Alle Messungen wurden jeweils im Doppelansatz durchgeführt. Aus den Extinktions- und Konzentrationswerten des Standardproteins wurde eine lineare Regression erstellt, aus welcher die Proteinwerte der Proben [$mg \cdot ml^{-1}$] berechnet werden konnten.

3.3. Funktionelle Studien zum Calcium- und Phosphat-Transport in Ussingkammern

Die funktionellen Untersuchungen an Dünndarm- und Pansenpräparaten wurden mit Hilfe der Ussingkammer-Technik durchgeführt, welche ein System zur *Ex-vivo* Messung des transepithelialen Transports von Elektrolyten, Nährstoffen oder Pharmaka darstellt. Diese Technik wurde von USSING und ZERAHN (1951) ursprünglich zur Charakterisierung des aktiven Natriumchlorid-Transports in der Haut von Fröschen entwickelt. Heute wird sie für viele Epithelien des Tierkörpers, wie z.B. den Reproduktionstrakt, den Darm oder für kultivierte epitheliale Zellen des Darmes und der Niere verwendet.

3.3.1. Prinzip der Ussingkammer-Technik

Unmittelbar nach der Tötung des Tieres wurden die Darm- und Pansensegmente entnommen und die Epithelien entsprechend präpariert (siehe 3.1.4). Anschließend wurden die Mukosa-Proben unter ständiger Befeuchtung mit entsprechender Pufferlösung (Pufferzusammensetzung siehe Anhang A) zwischen 2 Hälften einer Plexiglaskammer eingespannt, so dass 2 voneinander getrennte Kompartimente entstanden. Diese entsprachen der mukosalen, ehemals luminalen- und der serosalen, ehemals blutseitigen Gewebeseite (siehe Abb. 3.2) (Pufferzusammensetzung siehe Anhang A). Zur Abdichtung und Vermeidung von Randdruckstellen am Gewebe wurden 2 Silikonringe auf die Kammerhälften gelegt. Es konnten je Versuch 24 Ussingkammern (Eigenbauten des Physiologischen Instituts der Stiftung der Tierärztlichen Hochschule Hannover) verwendet werden, die jeweils über 4 Plastikschläuche an ein beheiztes Gasliftsystem, welches aus 2 doppelwandigen Glassäulen bestand, angeschlossen wurden. Die Temperatur der sich in den Glassäulen befindlichen Pufferlösungen wurde durch ein Wasserbad konstant auf 37°C gehalten. Die Vitalität des eingespannten Epithels, ein konstanter pH-Wert von 7,45 sowie die ständige Umwälzung der Inkubationslösungen wurden

durch eine kontinuierliche Carbogen-Begasung (95% Sauerstoff, 5% Kohlendioxid) gewährleistet. Die jeweilige Fläche der Kammern betrug für die Darmabschnitte 1,13 cm^2 und für Pansengewebe 2 cm^2. Durch 2 gewebenahe KCl-Agar-Gel-Brücken und 2 gewebefernen Ag-AgCl-Bezugselektroden (Mettler Toledo Prozessanalytik GmbH, 35390 Gießen) wurden die Kammern an eine computergesteuerte Strom-/Spannungsklemmeinrichtung (AC Microclamp Dipl.-Ing. K. Mussler, 52066 Aachen) angeschlossen. Die sich durch den gerichteten Nettoionentransport über das Gewebe ausgebildete Potentialdifferenz (PD_t) zwischen mukosaler und serosaler Gewebeseite wurde alle 6 s mit der Computer-Software „CLAMP“ (Dipl.-Ing. K. Mußler, Aachen) erfasst. Des Weiteren wurden von den gewebefernen Elektroden bipolare Stromimpulse von 100 μA und einer Dauer von 200 ms in einem Intervall von 6 s auf das Epithel geleitet. Durch eine dadurch bedingte kurzfristige Veränderung der Potentialdifferenz wurde gemäß des Ohm’schen Gesetzes der Gewebewiderstand (R [Ω]) berechnet, dessen reziproker Wert der Gewebeleitfähigkeit (G_t [$mS \cdot cm^{-2}$]) entspricht. Im Unterschied dazu wurde beim „*Short-circuit*“-Verfahren über die gewebefernen Elektroden ein so genannter „Klemmstrom“ ($-I_c$) in die Kammer geleitet, der das transepitheliale Potential (PD_t) auf 0 mV reduzierte. Bei $PD_t = 0$ ist der Klemmstrom $-I_c$ gerade so groß, dass er den Kurzschlussstrom I_{sc} (Angabe in Ionenäquivalent als Ladungstransfer pro Zeit und Gewebefläche: $\mu Eq \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$) aufhebt ($I_c = -I_{sc}$) und kein elektrischer Gradient mehr vorhanden ist. Folglich konnten unter diesen Bedingungen gemessene elektrogene Ionentransporte als aktive transzelluläre Prozesse eingeordnet werden. Der Netto-Ladungstransport erhält dabei ein positives Vorzeichen, wenn er von der mukosalen zur serosalen Seite verläuft. Dies kann als Kationenresorption und/oder Anionensekretion interpretiert werden.

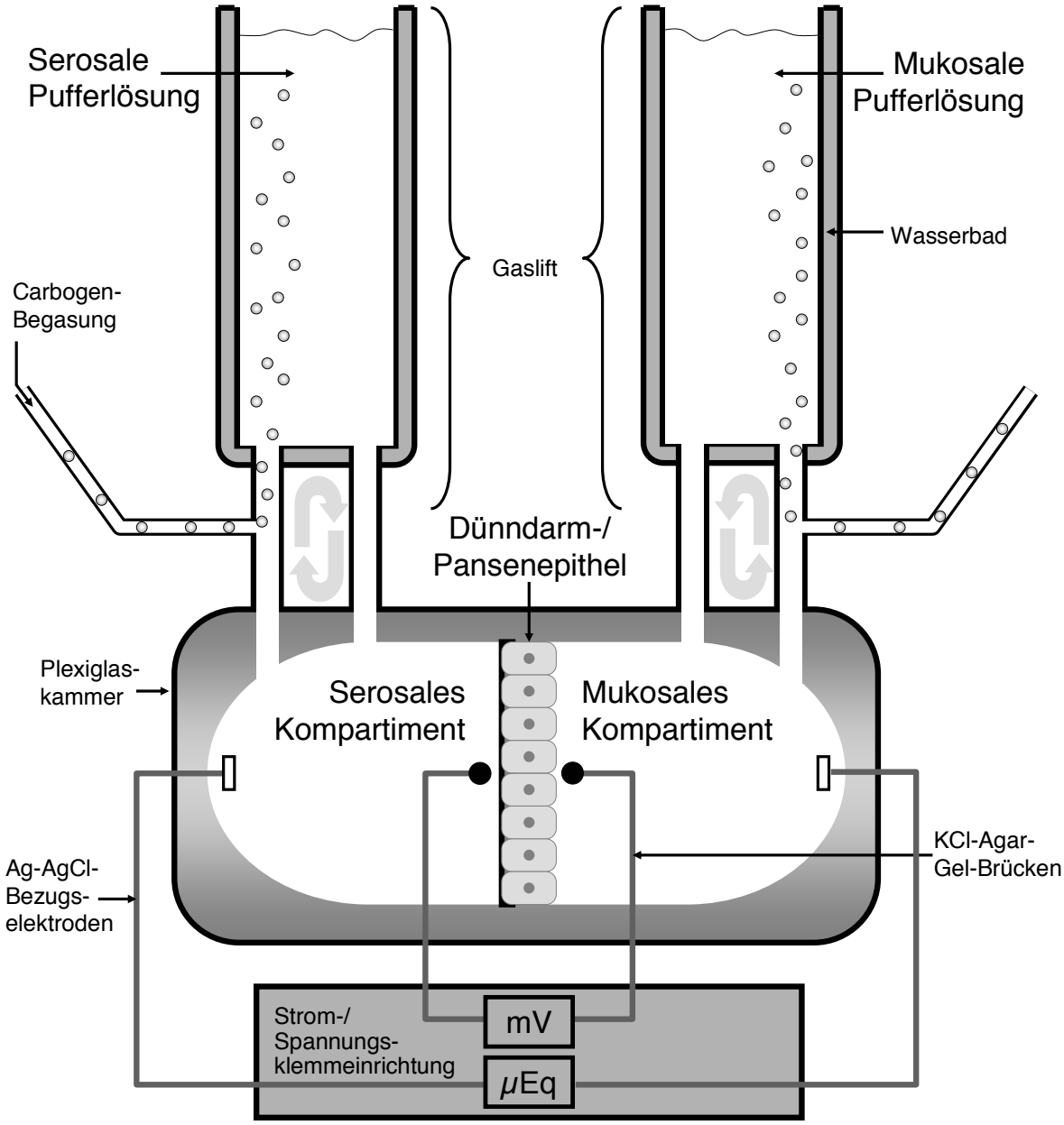

Abb. 3.2: Schematische Darstellung der Versuchsapparatur (Ussingkammer mit Gaslift und Strom-/Spannungsklemmeinrichtung), AgCl = Silberchlorid.

3.3.2. Durchführung der Untersuchungen

3.3.2.1. Eichperiode

Für die Eichung wurden die Ussingkammern ohne Gewebe in die Halteapparaturen eingebaut und mit für die entsprechenden Versuche vorgesehenen serosalen Pufferlösungen (siehe Anhang A) befüllt. Anschließend wurden der Lösungswiderstand und die Eigenpotentialdifferenz bestimmt. Die nachfolgend am Gewebe erfassten Messwerte wurden um diese Eichung jeweils automatisch korrigiert.

3.3.2.2. Messperiode

Nach Abschluss der Eichung wurde ein circa 2 x 2 cm großes Stück der zuvor präparierten Mukosa des Pansen und der respektiven Darmabschnitte (siehe 3.1.4) mit der mukosalen Seite nach oben gerichtet auf einer Kammerhälfte kreisförmig über die Öffnung gespannt und mittels Präpariernadeln fixiert. Nach dem Zusammensetzen beider Kammerhälften wurden sie in das Haltegestell gesetzt und über Silikonschläuche mit den Gasliften als auch mit den Elektroden verbunden. Nach dem Einspannen aller Gewebe fand eine 10minütige Adaptationsperiode an die Versuchsbedingungen im „S*hort-circuit*“-Verfahren bei einer Potentialdifferenz von 0 mV statt. Es erfolgte die Zugabe der Radioisotope und eine sich anschließende 20minütige Äquilibrierungsphase, nach deren Abschluss die erste Probe entnommen wurde (siehe Tab 3.2 und Tab 3.3).

3.3.2.3. Unidirektionale Calcium-, Phosphat- und Mannit-Fluxraten

Zunächst wurden beide Kompartimente der Ussingkammern mit je 10 ml mit der vorgesehenen Pufferlösung (serosal, mukosal) bei Darm- bzw. je 13 ml bei Pansenpräparaten befüllt. Nach Entnahme der P1- bis P8-Proben (siehe Tab. 3.2

und 3.3) wurden die Volumina jeweils zur Verhinderung einer kontinuierlichen Volumenabnahme infolge der Probenentnahmen durch Auffüllen mit der entsprechenden Pufferlösung wiederhergestellt. Nach Entnahme der P4-Probe (siehe Tab. 3.2 und 3.3) erfolgte im Rahmen der Ussingkammer-Versuche sowohl bei den Schafen als auch bei den Ziegen das Hinzufügen verschiedener Zugaben zu den eingespannten Darm- und Pansenepithelien. Da diese jedoch zwischen Schaf und Ziege differieren und somit nicht zu einer vergleichenden Betrachtung der beiden Spezies beitragen, sind sie im Weiteren nicht Bestandteil der im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse und daher ebenfalls nicht in dem Protokoll des Versuchsablauf (siehe Tab. 3.2 und Tab. 3.3) erläutert. Die Auswertung erfolgte aufgrund dessen nur mit den basal gemessenen Werten, die vor den Zugaben ermittelt wurden.

Pro Tag wurde ein Tier geschlachtet, so dass für die Darmsegmente Duodenum und Jejunum in jeweils 6 Kammern unidirektionale Calcium-, Phosphat- und Mannit-Fluxraten gemessen werden konnten. Analog wurden im Pansen die Calcium- und Mannit-Fluxraten mit 6 Pansenpräparaten erfasst.

Laktierende und trockengestellte Schafe

Bei den Ussingkammer-Versuchen an laktierenden bzw. trockengestellten Schafen wurden die gewünschten Radioisotope (^{45}Ca, ^{32}P oder ^{3}H-Mannit; PerkinElmer, Rodgau) in die serosalen bzw. mukosalen Pufferlösungen (im Folgenden „heiße“ Seite) gegeben und die Proben in definierten Zeitabständen (siehe Tab. 3.2) entnommen. Die jeweils andere Seite der Kammer wird als „kalte“ Seite bezeichnet. Zur Vitalitätskontrolle der Epithelien wurde am Versuchsende das Sekretagogum Forskolin (10 $\mu mol \cdot l^{-1}$, serosal) hinzugegeben. Als Aktivator der Adenylatcyklase stimuliert es die cAMP-vermittelte Chloridsekretion (SEAMON et al. 1981) und sorgt daher bei vitalem Gewebe für einen spontanen Anstieg des Kurzschlussstroms. Für das Pansengewebe diente die Zugabe von Ouabain (1 $mmol \cdot l^{-1}$, serosal), ein Inhibitor der Na^{+}/K^{+}-ATPase als Vitalitätskontrolle (FERREIRA et al. 1966). Durch die Zugabe sinkt die Potentialdifferenz und der vorhandene Kurzschlussstrom wird gehemmt.

Tab. 3.2: Versuchsablauf der Messung der unidirektionalen Calcium-, Phosphat- und Mannit-Fluxraten der Präparate von Schafen; ^{45}Ca = radioaktiv markiertes Calcium, ^{3}H-Mannit = Tritium-markiertes Mannit, ^{32}P = radioaktiv markiertes Phosphat, J_{sm} Fluxrate von serosal nach mukosal, J_{ms} Fluxrate von mukosal nach serosal, P = Probenentnahme, PD_t = Potentialdifferenz.

Duodenum, Jejunum			**Pansen**		
Zeit [min]	**Calcium/Phosphat/Mannit**		**Zeit [min]**	**Calcium/Mannit**	
	J_{sm} Kammer 1, 3, 5, 7, 9, 11	**J_{ms} Kammer 2, 4, 6, 8, 10, 12**		**J_{sm} Kammer 13, 15, 17, 19, 21, 23**	**J_{ms} Kammer 14, 16, 18, 20, 22, 24**
0	PD_t auf 0 mV „geklemmt“		0	PD_t auf 0 mV „geklemmt”	
10	Aktivitätszugabe (4 μCi ^{45}Ca, 2,7 μCi ^{32}P, 2,7 μCi ^{3}H-Mannit)		10	Aktivitätszugabe (4 μCi ^{45}Ca, 2,7 μCi ^{3}H-Mannit)	
20	1. „heiße Probe“ (50 μl)		20	1. „heiße” Probe (50 μl)	
	P1 „kalte“ Probe (500 μl)			P1 „kalte“ Probe (500 μl)	
15	P2		20	P2	
15	P3		20	P3	
15	P4		20	P4	
15	P5		20	P5	
15	P6		20	P6	
15	P7		20	P7	
15	P8		20	P8	
	2. „heiße“ Probe			2. „heiße“ Probe	
Forskolin (10 μmol·l^{-1}, serosal)			Ouabain (1mmol·l^{-1}, serosal)		

Laktierende und trockengestellte Ziegen

Die Zugabe der Radioisotope und die Entnahmen der Proben erfolgten bei den Ziegen in Analogie zu den Angaben für die Präparate von Schafen. Auch die Vitalitätskontrolle der Gewebe wurde entsprechend der Verfahrensweise bei den Präparaten der Schafe ausgeführt.

Tab. 3.3: Versuchablauf zur Messung der unidirektionalen Calcium-, Phosphat- und Mannit-Fluxraten der Präparate von Ziegen; ^{45}Ca = radioaktiv markiertes Calcium, ^{3}H-Mannit = Tritium-markiertes Mannit, ^{32}P = radioaktiv markiertes Phosphat, J_{sm} Fluxrate von serosal nach mukosal, J_{ms} Fluxrate von mukosal nach serosal, P = Probenentnahme, PD_t = Potentialdifferenz.

Duodenum, Jejunum			**Pansen**		
Zeit [min]	**Calcium/Phosphat/Mannit**		**Zeit [min]**	**Calcium/Mannit**	
	J_{sm} Kammer 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17	**J_{ms} Kammer 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18**		**J_{sm} Kammer 19, 21, 23**	**J_{ms} Kammer 20, 22, 24**
0	PD_t auf 0 mV „geklemmt“		0	PD_t auf 0 mV „geklemmt”	
10	Aktivitätszugabe (4,8 μCi ^{45}Ca, 5 μCi ^{32}P, 4,8 μCi ^{3}H-Mannit)		10	Aktivitätszugabe (6,2 μCi ^{45}Ca, 6,2 μCi ^{3}H-Mannit)	
20	1. „heiße“ Probe (50 μl)		20	1. „heiße” Probe (50 μl)	
	P1 „kalte“ Probe (500 μl)			P1 „kalte“ Probe (500 μl)	
15	P2		20	P2	
15	P3		20	P3	
15	P4		20	P4	
15	P5		20	P5	
15	P6		20	P6	
15	P7		20	P7	
15	P8		20	P8	
15	P9		20	P9	
	2. „heiße“ Probe			2. „heiße“ Probe	
Forskolin (10 μmol·l^{-1}, serosal)			Ouabain (1mmol·l^{-1}, serosal)		

3.3.3. Auswertung der elektrophysiologischen Parameter

Aus den erhobenen Daten wurden arithmetische Mittelwerte für jedes Tier berechnet, aus denen arithmetische Werte auf Gruppenbasis bestimmt werden konnten. Durch das Überlagern aller Kurven konnte für jeden erfassten Messpunkt ein Mittelwert aus

allen Kammern bzw. aus allen Tieren errechnet werden und zu einer Messkurve transformiert werden. Die Teilstücke der einzelnen Kurven wurden dabei so überlagert, dass die Zugabezeitpunkte exakt in Deckung kamen. Bei ungleichen Nachlaufzeiten wurde die Überlagerung nur bis zum Ende des am kürzesten auftretenden Zeitabschnitts durchgeführt und weitere Messpunkte der anderen Kammern nicht berücksichtigt. Die Mittelwertskurven der Kurzschlussströme und der Gewebeleitfähigkeiten wurden stets identisch erstellt, so dass jedem Punkt auf der Verlaufskurve der Kurzschlussströme der zugehörige Punkt auf der Kurve der Leitfähigkeiten zugeordnet werden konnte.

3.3.4. Berechnung der Calcium-, Phosphat- und Mannit-Fluxraten

Die Bestimmung der unidirektionalen Calcium-, Phosphat- und Mannit-Fluxraten erfolgte mit der Radioisotopen-Tracer-Technik. Hierbei wurde die Aktivität in definierter Menge auf derjenigen Seite zugegeben, von der aus der Transport in das andere Kompartiment bestimmt werden sollte. Von dieser „heißen“ Seite wurden zu Beginn und am Ende der Messperiode zur Bestimmung der spezifischen Aktivität Proben entnommen (siehe Tab. 3.2 und Tab. 3.3). Aus dem anderen Kompartiment („kalte“ Seite) wurden im Laufe der Messperiode alle 15 min bzw. alle 20 min Proben entnommen (siehe Tabelle 3.2 und 3.3). Alle entnommenen Proben wurden in Minivials (Polyethylen Vial, 6 ml; PerkinElmer) pipettiert und mit 4,3 ml Szintillationsflüssigkeit (Lumasafe™ Plus; Luma LSC B.V.; PerkinElmer) versetzt. Zur Zählratenbestimmung (*decays per minute*, Zerfälle pro Minute, dpm) wurde ein Flüssigkeitsszintillationsmessgerät verwendet (Wallac 1410, Pharmacia, Uppsala, Schweden). Jede Probe wurde 10 min gemessen. Die Isotopendiskriminierung erfolgte nach Quenchkorrektur mittels einer im Wallac-Gerät implementierten Software, die auf einer geeigneten Isotopen-Eichkurven-Bibliothek basierte.

Die Berechnung der unidirektionalen Fluxraten J_{sm} und J_{ms} erfolgte mittels einer modifizierten Form der von SCHULTZ und ZALUSKY (1964) eingeführten Gleichung:

$$\mathbf{J = [dpm_n - (V_{ges} - V_p)\cdot(V_{ges})^{-1}\cdot dpm_{n-1}]\cdot[(V_{ges}\cdot M_i)\cdot(dpm_h\cdot t\cdot A)^{-1}]}$$ mit:

J =	unidirektionale Fluxrate $J_{ms(sm)}$ in [nmol·cm^{-2}·h^{-1}],
dpm_n, $dpmn_{-1}$ =	Aktivität in der „kalten“ Probe bezogen auf ein Volumen von 1 ml,
dpm_h =	Mittelwert der Aktivität in den „heißen“ Proben bezogen auf ein Volumen von 1 ml,
V_{ges} =	Volumen der Pufferlösung in der Säule [ml],
V_p =	Volumen der entnommenen Probenlösung [ml],
M_i =	Konzentration der unmarkierten, untersuchten Substanz im Puffer [nmol·l^{-1}],
t =	Zeitintervall zwischen den Probennahmen [h],
A =	serosale Fläche des transportierenden Epithels in [cm^2].

Zur Ermittlung der Nettofluxraten (J_{net}) wurden die Fluxe von der serosalen zur mukosalen Seite (J_{sm}) von den entsprechenden Fluxen von mukosal nach serosal (J_{ms}) subtrahiert. Die Mannit-Fluxraten dienten zur Unterscheidung zwischen parazellulärem- und transzellulärem Transport (siehe 5.2.1).

3.4. Präparative Methoden

3.4.1. RNA-Isolierung

Die Gesamt-RNA aus Mukosa-Proben des Darmes sowie des Pansens wurde unter Verwendung des RNeasy® Mini-Kit (QIAGEN GmbH, 40724 Hilden) isoliert.

Durchführung

Die enthaltenen Puffer RLT, RW1 und RPE wurden gemäß den Herstellerangaben eingesetzt. Zur Spaltung der Disulfidbrücken wurde der RLT-Puffer vor Präparationsbeginn mit 1% β-Mercaptoethanol versetzt.

Die Präparationsschritte mit Ausnahme des anfänglichen Zerkleinerns und des letzten Schrittes erfolgten bei Raumtemperatur. Zunächst wurde die jeweilige Gewebeprobe in flüssigem Stickstoff in einem Mörser zu einem feinen Pulver zerkleinert. Circa 20 bis maximal 30 mg wurden anschließend in einem, in flüssigem Stickstoff vorgekühlten Eppendorf-Tube (Eppendorf AG, 22331 Hamburg) eingewogen und mit 600 µl RLT-Puffer versetzt. Eine Homogenisierung des Proben-Puffer-Gemisches erfolgte durch 10maliges Aufziehen mit einer Einmalspritze und einer 0,45 x 23 mm Kanüle. Eine anschließende Zentrifugation bei 12 846 *g* (Biofuge pico; Heraeus Instruments, 63450 Hanau) für 3 min diente zur Isolierung der zu verwerfenden Zelltrümmer, die sich als Zellpellet am Boden des Eppendorf-Tubes sammelten. Der Überstand wurde abpipettiert und auf eine gDNA-Eliminationssäule gegeben, die nachfolgend bei 12 846 *g* für 1 min zentrifugiert wurde. Die nun DNA-haltige Eliminationssäule wurde verworfen und der durch die Zentrifugation durch die DNA-Säule durchgetriebene Durchfluss wurde zur Fällung der RNA mit 550 µl an 70%igem Ethanol vermischt und in 2 Pipettierschritten auf eine RNeasy®-Säule überführt. Die im Ethanol ausgefällten Nukleinsäuren wurden durch eine weitere 1minütige Zentrifugation bei 12 846 *g* ins Innere der Säule verbracht, wo sie sich an eine Kieselgelmembran anlagerten.

Anschließend erfolgte ein Waschschritt mit 700 µl RW1-Puffer. Nach einer erneuten Zentrifugation für 1 min bei 12 846 *g* wurden 2 weitere Waschungen mit jeweils 500 µl ethanolhaltigem RPE-Puffer durchgeführt, nach denen die Säulen 1 min und nachfolgend 2 min bei 12 846 *g* zur vollständigen Trocknung zentrifugiert wurden. Nach jedem Zentrifugationsschritt wurde der Durchfluss verworfen.

Nach Abschluss der Waschschritte und anschließender Trocknung wurde die RNeasy®-Säule in ein neues 1ml Eppendorf-Tube verbracht. Die Eluierung der gebundenen Gesamt-RNA erfolgte durch Zugabe von 50 µl RNAse-freiem Wasser und anschließender 1minütiger Zentrifugation bei 12 846 *g*. Die Quantifizierung der Gesamt-RNA erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm (Eppendorf Biophotometer; Eppendorf AG, 22331 Hamburg). Bis zur weiteren Verwendung (siehe 3.4.2) wurden die Präparationen bei -80°C in 1,5 ml-Eppendorf-Tubes (Eppendorf AG, 22331 Hamburg) gelagert.

3.4.2. Synthese von cDNA

Zur Synthese von cDNA aus der isolierten Gesamt-RNA wurden *TaqMan-Reverse Transcription Reagents* (Applied Biosystems, Roche Diagnostics GmbH, 68298 Mannheim) verwendet, aus denen zunächst ein Master-Mix angesetzt wurde. Dieser enthielt je Probe 2,5 µl 10fach Puffer, 5,5 µl $MgCl_2$ (25 mmol·l^{-1}), 5 µl dNTPs (10 mmol·l^{-1}), 0,625 µl Random-Hexamere, 0,625 µl Oligo (dT)-Primer, 0,5 µl RNase-Inhibitor sowie 0,68 µl Reverse Transkriptase. Von den Gesamt-RNA-Präparationen wurden je 200 ng mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 9,6 µl aufgefüllt, zu dem nachfolgend 15,4 µl des Master-Mixes gegeben wurde. Es folgte eine Inkubation in einem Thermocycler (MyCycler; Bio-Rad Laboratories GmbH, 80939 München) unter folgenden Bedingungen: 10 min 25°C, 45 min 48°C, 5 min 95°C. Am Anschluss wurden die Reaktionsgefäße auf 4°C heruntergekühlt. Nach Entnahme aus dem Thermocycler wurde die nun synthetisierte cDNA bei -20°C bis zur weiteren Verwendung (siehe 3.5.2) in 0,5 ml-Eppendorf-Tubes (Eppendorf AG, 22331 Hamburg) gelagert.

3.4.3. Präparation von Gesamtmembranen (GM)

Die GM, die sowohl den apikalen als auch den basolateralen Anteil der Zellmembran einschließt, wurde nach einer modifizierten Methode nach OSSWALD et al. (2005) präpariert (siehe Abb. 3.3). Hierbei wurden circa 1 g gastrointestinale Mukosa (Pansen, Duodenum, Jejunum oder Colon) mit 10 ml Homogenisierungspuffer (siehe Anhang B) und 50 µl PMSF versetzt und nachfolgend in einem Elvehiem-Potterglas (Potter S30; B. Braun Melsungen AG, 34212 Melsungen) homogenisiert. Anschließend erfolgte die Überführung der homogenen Flüssigkeit in ein vorgekühltes Zentrifugenröhrchen (Kendro Laboratory Products, Sorvall®, CT 06470 Newtown, USA) sowie eine erste Zentrifugation für 20 min bei 2000 *g* und 4°C (Sorvall® RC-5C, Rotor SM 24; Sorvall Instruments, Du Pont Company, Wilmington, USA), wodurch die sich in einem Pellet gesammelten Zelltrümmer, Zellkerne und Zellorganellen anschließend verworfen werden konnten. Der Überstand wurde in ein neues vorgekühltes Zentrifugenröhrchen gegeben und ein weiteres Mal für 60 min bei 40 000 *g* und 4°C zentrifugiert. Der aus cytosolischen Proteinen bestehende Überstand wurde im nächsten Schritt verworfen. Das gewonnene Pellet bestand nun aus den zu isolierenden GM. Es wurde nachfolgend je nach Größe mit eisgekühltem Resuspensionspuffer (siehe Anhang B) (1500 µl pro 1 cm Pellet-Durchmesser) und 15 µl Protease-Inhibitoren (Protease Inhibitor Cocktail; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) resuspendiert. Das Pellet und der Resuspensionspuffer wurden hierbei mit einer 1 ml-Einmalspritze und einer 1,20 x 40 mm Kanüle und nachfolgend mit einer 0,45 x 23 mm Kanüle aufgezogen bis sich eine homogene Flüssigkeit ergab und keine Pelletreste mehr sichtbar waren. Die resuspendierten GM wurden anschließend in ein 1,5 ml-Eppendorf-Tube verbracht und nach der Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe 3.2.3) und Herstellung entsprechender Aliquots für die Western-Blot-Analyse (siehe 3.5.3) bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.4.4. Präparation intestinaler Bürstensaummembranen (BSM)

Das Präparationsprotokoll zur Isolierung apikaler intestinaler Membranen ist in Abb. 3.3 dargestellt. Zunächst wurde circa 1 g intestinale Mukosa eingewogen und mit 9 ml Homogenisierungspuffer (siehe Anhang B) und 50 µl PMSF versetzt. Anschließend erfolgte analog der Präparation der GM eine Homogenisierung in einem Elvehiem-Potterglas (Potter S30; B. Braun Melsungen AG, 34212 Melsungen). Die Homogenate wurden anschließend je in ein Becherglas überführt, in das 1 ml einer 100 mmolaren $CaCl_2$-Lösung tropfenweise unter langsamem Rühren mit einer 1 ml-Einmalspritze dazugegeben wurde. Es folgte eine Inkubation von 30 min, bei der die Proben in Eis kühl gehalten wurden. Während dieser Zeit aggregierten Ca^{2+}-Ionen in unterschiedlichem Maße mit den Membranfragmenten. Aufgrund der geringeren Oberflächenladung binden die Ca^{2+}-Ionen weniger stark an die apikalen Membranfragmente, wodurch deren Separation durch die sich anschließende Differenzialzentrifugation für 20 min bei 2000 *g* und 4°C (Sorvall® RC-5C, Rotor SM 24; Sorvall Instruments, Du Pont Company, Wilmington USA) ermöglicht wurde. Das entstandene Pellet, das nun neben Zelltrümmern, Zellkernen und Mitochondrien auch die hier nicht benötigten basolateralen Membranen enthielt, wurde verworfen. Der Überstand wurde in neue Zentrifugenröhrchen überführt und für 30 min bei 25 000 *g* und 4°C zentrifugiert. Ein wiederum entstandenes Pellet mit einer 6 bis 10fachen Anreicherung apikaler Membranen wurde mit 500 µl Resuspensionspuffer (siehe Anhang B) aufgeschwemmt und nach Zugabe von 15 µl eines Proteaseinhibitor-Mixes (Protease Inhibitor Cocktail; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) analog zu den GM (siehe 3.4.3) resuspendiert. Die entstandene, mit Bürstensaummembranfraktionen angereicherte Präparation wurde anschließend in ein 1,5 ml-Eppendorf-Tube (Eppendorf AG, 22331 Hamburg) verbracht und nach Bestimmung der Proteinkonzentrationen (siehe 3.2.3) und anschließender Anfertigung von Aliquots entsprechend der weiteren Analyse durch Western-Blots (siehe 3.5.3) bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

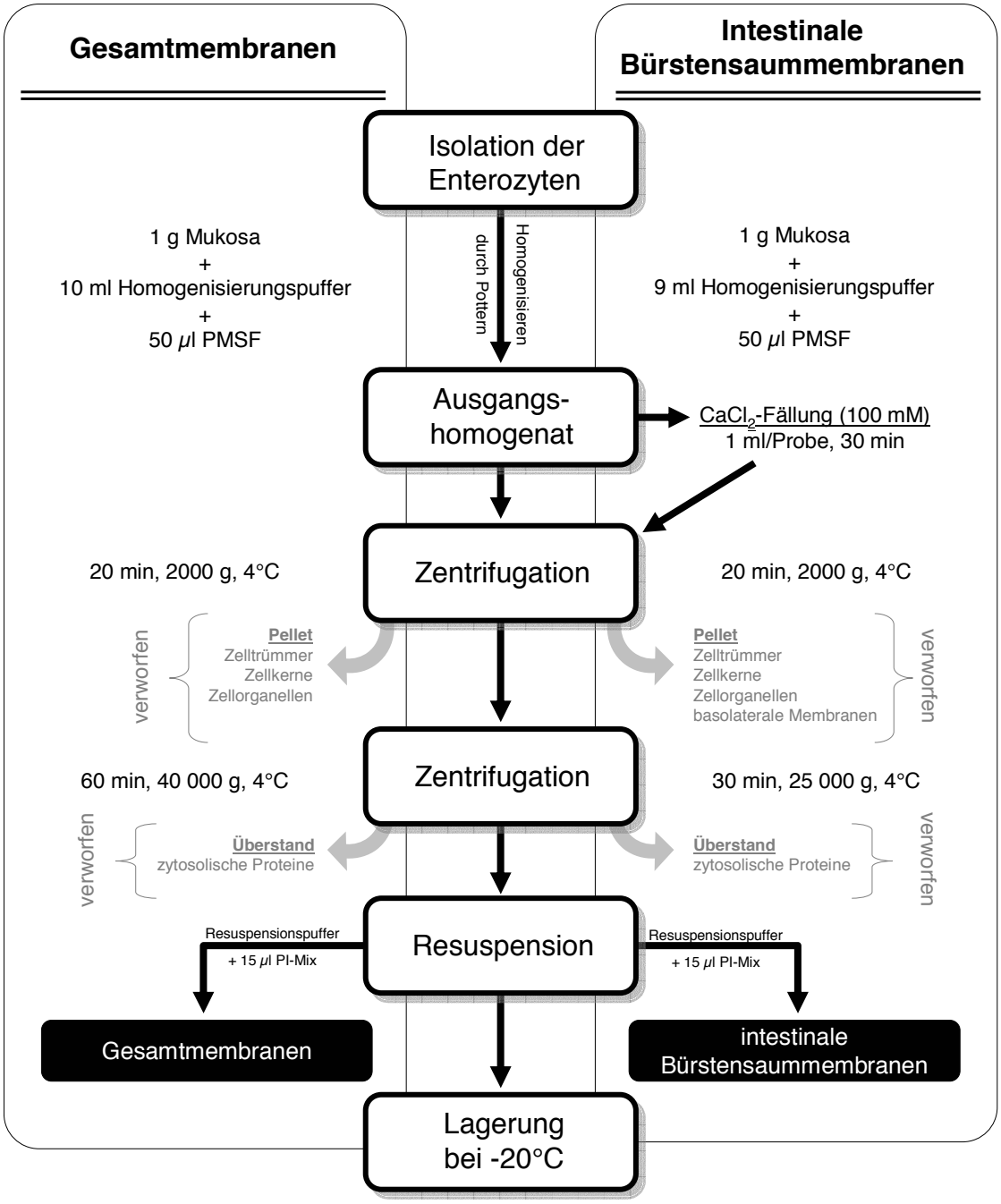

Abb. 3.3: Schematische Darstellung der Präparation intestinaler Gesamtmembranen und intestinaler Bürstensaummembranen, $CaCl_2$ = Calciumchlorid, PMSF = Phenylmethylsulfoxylfluoride, PI-Mix = Proteaseinhibitor-Mix.

3.4.5. Präparation von Cytosol

Die Präparation von Cytosol erfolgte mittels der etablierten Methode nach SCHRÖDER et al. (2001).

Zunächst wurden etwa 0,2 g intestinale Mukosa in einem Elvehiem-Potterglas (Potter S319; B. Braun AG, 34212 Melsungen) eingewogen und mit Präparationspuffer (siehe Anhang B), der zuvor mit 20 mmol PMSF bis zu einer Endkonzentration von 0,1 mmol versetzt wurde, in einem Verhältnis von 1:10 vermischt. Zur Homogenisierung des Gewebe-Puffer-Gemisches wurde es mit 10 bis 15 Schüben auf höchster Stufe gepottert, nachfolgend in ein 2 ml-Eppendorf-Tube verbracht und durch Aufziehen mit einer 1 ml-Einmalspritze mit einer 1,20 x 40 mm Kanüle weiter homogenisiert. Anschließend wurden das Homogenat bei 17 500 *g* für 30 min bei 4°C zentrifugiert (GS-15R Zentrifuge; Beckman Coulter GmbH, 47807 Krefeld). Durch diesen Zentrifugationsschritt konnten sich Zelltrümmer, Zellkerne und andere Zellorganellen sowie die Zellmembranen am Grund des Eppendorf-Tubes in Form eines Pellet sammeln. Der Überstand, der das zu isolierende Cytosol enthielt, wurde vorsichtig abpipettiert und in ein 2 ml-Eppendorf-Tube verbracht. Abschließend wurden Aliquots zu je 30 μg für die weitere Analyse durch Western-Blots (siehe 3.5.3) angefertigt und diese sowie die Homogenate bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.5. Expressionsstudien

Expressionsstudien der Calcium-Strukturen wurden sowohl auf Transkriptions- als auch auf Translationsebene bzw. die von NaPi-IIb auf Translationsebene durchgeführt. Die Expression der mRNA wurde mit Hilfe von quantitativer RT-PCR ermittelt. Zur Untersuchung der Proteinexpression der Calcium-transportierenden Strukturen sowie von NaPi-IIb wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt.

3.5.1. Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR)

3.5.1.1. Prinzip der PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein sich wiederholender Prozess, bei dem DNA bzw. cDNA in jedem Schritt amplifiziert und die Anzahl der vorhandenen Kopien verdoppelt wird. Die Vervielfältigung wird mit Hilfe spezifischer kurzer DNA-Sequenzen, den Primern, die die zu amplifizierenden Regionen flankieren, erreicht. Jeder Zyklus besteht aus 3 Teilschritten: Im Denaturierungsschritt werden durch Erhitzung die DNA-Doppelstränge durch Zerstörung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen voneinander getrennt. Durch eine sich anschließende Reduktion der Temperatur je nach Zusammensetzung der Primer können diese sich an die komplementären Einzelstränge anlagern (*annealing*). Schließlich kann in dem Elongationsschritt die Synthese des komplementären Strangs aus den zugegebenen dNTPs durch die DNA-Polymerase erfolgen. Die Standard-PCR besteht aus 20-50 Zyklen der Denaturierung, des Primer-*Annealings* und der DNA-Synthese. Eine sich wiederholende Serie dieser Zyklen resultiert in einer exponentiellen Akkumulation eines spezifischen DNA-Fragments. Da die synthetisierten Primerprodukte im nächsten Zyklus als Templates dienen, verdoppelt sich theoretisch die Anzahl der

spezifischen DNA-Fragmente (Amplifikate) in jedem Zyklus. Aufgrund dessen kann mit nur 20 Zyklen eine millionenfache DNA-Amplifikation erreicht werden.

3.5.2. Quantitative RT-PCR

Prinzip der quantitativen RT-PCR

Die quantitative RT-PCR erlaubt im optimalen Fall eine sensitive, spezifische und reproduzierbare Quantifizierung von DNA-Fragmenten. Hierfür wurde der Gen-spezifische TaqMan®-Assay (Applied Biosystems Deutschland GmbH, 64293 Darmstadt) verwendet. Durch eine fluoreszierende TaqMan®-Sonde, die zu dem zu vervielfältigenden DNA-Fragment komplementär ist, ist es möglich, durch das Mitführen einer Standardreihe mit bekannter Anzahl an DNA-Fragmenten, auf die amplifizierte Menge an cDNA zu schließen. Die TaqMan®-Sonde stellt dabei ein mit einem Reporter-Farbstoff (FAM, 6-Carboxy-Flurescein) am 5'-Ende und mit einem Quencher-Farbstoff (TAMRA, 6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin) am 3'-Ende markiertes Oligonukleotid dar. Solange eine räumliche Nähe zwischen der TaqMan®-Sonde und dem Quencher besteht, wird die Fluoreszenz unterdrückt. Zunächst bindet die Sonde mit den Primern an den Matrizenstrang, wird aber während der Elongationsphase durch die Polymerase hydrolysiert, wodurch die Verbindung von Reporter und Quencher aufgelöst wird. Infolge dessen wird die Fluoreszenz nicht länger inhibiert. Der Anstieg der Fluoreszenz ist dabei direkt proportional zur Anreicherung des Amplifikats.

Durchführung

Die Standardreihen mit bekannter Anzahl an DNA-Fragmenten sowie die Primer und Sonden für die Quantifizierung der Expression von GAPDH, TRPV6 und PMCA (WILKENS et al. 2009; MROCHEN 2010; WILKENS et al. 2011) lagen der Arbeitsgruppe bereits vor. Die Sequenzen der Primer und der Sonden sind der Tabelle 3.5 zu entnehmen.

Ursprünglich wurden die Gen-spezifische TaqMan®-Assays für aus dem Schaf entstammenden Gewebe hergestellt. In nachfolgenden Untersuchungen konnte die Verwendung der Schaf TaqMan®-Assays auch für die Bestimmung der mRNA-Expression in Proben von der Ziege etabliert werden (WILKENS et al. 2012).

Neben den Proben im Doppelansatz und den genomischen Standards wurde noch ein Leerwert, der destilliertes Wasser anstelle von cDNA enthielt, mitgemessen.

Für die TaqMan®-PCR wurde der TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems Deutschland GmbH, 64293 Darmstadt) verwendet. Der Inkubationsansatz ist der Tabelle 3.4 zu entnehmen. Die PCR Produkte wurden nachfolgend mit einem *Real-Time* PCR-Cycler (Cycler Stratagene Mx3005PTM; Agilent Technologies Stratagene Products Division, Amsterdam, Niederlande) entsprechend den Angaben in Tabelle 3.6 amplifiziert und analysiert.

Tab. 3.4: Pipettierschema der TaqMan®-PCR.

	Reaktionsansatz [μl]	**Konzentration der Gebrauchslösung**	**Konzentration der Ansatzlösung**
Wasser	6		
10-fach Mix	2	10-fach	1-fach
Primer sense		3 μmol·l^{-1}	0,3 μmol·l^{-1}
Primer antisense		3 μmol·l^{-1}	0,3 μmol·l^{-1}
Sonde		1 μmol·l^{-1}	0,1 μmol·l^{-1}
Universal Mastermix	10		
cDNA	2		
Gesamtvolumen	20		

Tab. 3.5: Für die RT-PCR verwendete Primer und Sonden.

Gen	Primer		Sonde
GAPDH	GAPDH sense	5'-CAAGGTCATCCA TGACCACTTT-3'	5'-FAM-CTGTCCACGCCA TCACTGCCACCC-TMR-3'
	GAPDH antisense	5'-CGGAAGGGCCAT CCACA-3'	
TRPV6	TRPV6 sense	5'-TGATGGGAGACA CTCACTGG-3'	5'-FAM-TGGCTACAACCT GCGCCCT-TMR-3'
	TRPV6 antisense	5'-GCAGCTTCTTCT CCAGCATC-3'	
PMCA	PMCA sense	5'-GGTATTGCTGGA ACTGATGTAGCTAA-3'	5'-FAM-CAATGCTTGTAAAATTGT CATCCGTGAGA-TMR-3'
	PMCA antisense	5'-CGTCCCCACATA ACTGCTTT-3'	

Tab. 3.6: Amplifizierungsprotokoll der TaqMan®-PCR.

Reaktionsvorgang	Inkubationsbedingungen
Denaturierung	• 2 min 50°C • 10 min 95°C
Annealing und Elongation	40 x: • 15 s 95°C • 1 min 60°C
Abkühlung	• ∞ 4°C

<u>Auswertung der quantitativen RT-PCR</u>

Für die Auswertung der gemessenen Werte wurde die Computer-Software „MxProQPCR" verwendet. Dabei beschreiben die C_t-Werte (*threshold cycle*) den Zyklus, bei dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt und damit der Schwellenwert (*threshold*) überschritten wird. Aus den C_t-Werten und der bekannten Anzahl der Kopien der

Standardreihen wurde eine lineare Regression erstellt, mittels derer die C_t-Werte einer Anzahl von Kopien zugeordnet werden konnten. Die Expression von TRPV6 und PMCA wurde mit der Expression von GAPDH normalisiert (siehe 5.2.2).

3.5.3. Western-Blot-Analysen

3.5.3.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Vor der eigentlichen Gel-Elektrophorese wurden die verwendeten GM-, BSM- oder cytosolischen Isolate je nach zu detektierendem Antigen vorbereitet. Die unterschiedlichen Probenmengen [*µ*g], die initialen Zentrifugationszeiten zur Herstellung eines Pellets, sowie die unterschiedlichen Zusätze zur Proteindenaturierung der Proben sind der nachstehenden Tabelle 3.7 zu entnehmen. Bei der Probenvorbereitung zum Nachweis von TRPV6 wurden die GM zusätzlich einer Hitzedenaturierung unterzogen.

Tab. 3.7: Probenart und –vorbehandlung für die Gel-Elektrophorese; TRPV6 = *transient receptor potential vanilloid type 6*, PMCA = *plasma membrane Calcium-ATPase*, NaPi-IIb = Natrium/Phosphat-Kotransporter IIb, GM = Gesamtmembran, BSM = Bürstensaummembran, β-ME = β-Mercaptoethanol, DTT = Dithiothreitol, *: nach MUSCHER (2006).

Nachweis	Isolat	Proteinmenge	Zentrifugation	Zusätze zum DNP
TRPV6	GM	50 *µ*g	5 min, 16 000 *g*	5% β-ME; 5 min, 95°C
Calbindin-D_{9k}	Cytosol	30 *µ*g	-	2% β-ME
PMCA	GM	40 *µ*g	5 min, 16 000 *g*	10% DTT
NaPi-IIb*	BSM	25 *µ*g	35 min, 4°C, 15 558 *g*	-

Mit Ausnahme der cytosolischen Proben wurden die aliquotierten Isolate wie in Tabelle 3.7 angegeben zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das verbleibende Pellet wurde nachfolgend in 8 μl Denaturierungspuffer (DNP) (siehe Anhang C) resuspendiert. Zu den cytosolischen Aliquots wurde die gleiche Menge an Präparationspuffer sowie die 2fache Menge an Lämmli-Puffer (siehe Anhang C) gegeben.

Das Proben-Puffer-Gemisch wurde in die Taschen eines SDS-Gels aufgetragen. Dieses besteht aus einem 4,75%igen Sammelgel, welches einem 8,5%igen Trenngel aufliegt. Im Gegensatz zu dem großporigen Sammelgel tritt ein Siebeffekt und damit eine Trennung der Proteine nach ihrer Größe erst im engporigen Trenngel auf. Im Falle der cytosolischen Proben wurde ein Tricin-SDS-Gel (4% Sammelgel, 16% Trenngel) verwendet. Die erste Tasche wurde mit einem, an die erwartete Größe der zu detektierenden Bande angepassten Größenmarker beladen (Page Ruler™ Prestained Protein Ladder Plus #1811 und 0671, Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder # 1841, Fermentas GmbH Thermo Fisher Scientific, 68789 St. Leon-Rot). Die Auftrennung der Gele erfolgte nach dem Verfahren von SCHÄGGER (1987). Die Gel-Elektrophorese lief zunächst auf 60 V bis alle Proteine im Sammelgel dieselbe Höhe erreicht hatten. Für die elektrophoretische Auftrennung wurde nachfolgend eine Spannung von 120 V angelegt.

3.5.3.2. Tank-Blot-Verfahren

Nach der elektrophoretischen Auftrennung erfolgte ein Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (NC-Membran; Amersham™-Hybond™-ECL, GE Healthcare, 80807 München). Die Blotapparatur (Bio-Rad Laboratories GmbH, 80939 München) war während des Transfers mit Transferpuffer (siehe Anhang C) gefüllt und wurde während der Zeitdauer des Blottens von 90 min bei 100 V zur Verhinderung einer eventuellen Überhitzung mit Eis gekühlt. Zur Überprüfung des Transfererfolgs sowie des gleichmäßigen Verlaufs der einzelnen Spuren wurden die NC-Membranen nach Abschluss des Blottens in einem reversiblen Verfahren für 5 min unter Schwenken

mit Ponceau 2R-Lösung (5% Ponceau (Serva Feinbiochemica GmbH & Co. KG, 69115 Heidelberg) in 3% Essigsäure) gefärbt. Eine Entfärbung fand durch mehrmaliges Waschen mit PBS (0,1%) (siehe Anhang C) statt.

3.5.3.3. Antikörper-Inkubation

Die NC-Membran wurde nach Bestätigung des Transfererfolgs zur Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen über Nacht bei 4°C in PBST (0,1%) (siehe Anhang C), welches für den Nachweis von TRPV6 und PMCA 5% und für Calbindin-D_{9k} und NaPi-IIb 10% Magermilchpulver enthielt, inkubiert.

Nach Abschluss der Blockierung über Nacht erfolgte die eigentliche Antikörper-Inkubation bei Raumtemperatur. Die Konzentrationen der verwendeten primären und sekundären Antikörper sowie die Inkubationszeiten sind in Tabelle 3.8 angegeben. Nach Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper auf einem Schüttler wurde die Membran 4mal je 10 min in PBST (0,1%) gewaschen. Danach wurde die NC-Membran mit einem passenden Sekundärantikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wurden die entsprechenden sekundären Antikörper für Calbindin-D_{9k} in PBST (0,1%) mit 5% bzw. für TRPV6 und PMCA mit 2% Magermilchpulver versetzt. Im Anschluss an 4 weitere Waschschritte der NC-Membran in PBST (0,1%) erfolgte die Detektion der Banden. Als Substrat zur Visualisierung des Bandensignals diente Pierce (SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate; Thermo Scientific, 3747 N. Meridian Rd., USA), welches an die Peroxidase des Sekundärkörpers bindet und so eine Chemilumineszenz bewirkt, die mit Hilfe eines ChemiDoc-System (ChemiDoc-System 220-240, Bio-Rad Laboratories GmbH, 80939 München) sichtbar gemacht werden kann. Eine Auswertung der detektierten Banden erfolgte mit der Quantifizierungs-Software „Quantity One“ (Bio-Rad Laboratories GmbH, 80939 München) für Windows98. Dabei wurde jede Bande einzeln vermessen, wobei die erhaltende dimensionslose Zahl das Produkt aus Fläche unter der Kurve (mm) multipliziert mit der Pixeldichte (Intensität) darstellt. Da die Quantifizierung der Proteine abhängig von der aufgetragenen Menge und der Integrität der Proteine ist,

wurden Villin bzw. β-Actin als interne Standards (siehe 5.2.3) zur Korrektur der gemessenen Werte verwendet.

Tab. 3.8: Verwendete Antikörper und Inkubationsbedingungen für den spezifischen Proteinnachweis, HRP = *horseradish peroxidase*, IgG = Immunglobulin G, TRPV6 = *transient receptor potential vanilloid type 6*, PMCA = *plasma membrane Calcium-ATPase*, NaPi-IIb = Natrium/Phosphat Kotransporter IIb.

Antikörper	Verdünnung	Inkubationszeit
Rabbit anti-**TRPV6**, polyklonal H-90; Santa Cruz	1:400	2 h
Sekundärantikörper (anti-rabbit IgG-HRP) A9169; Sigma	1:10 000	1 h
Rabbit anti-**Calbindin-D_{9k}**, polyklonal CB9; Swant	1:2500	1 h
Sekundärantikörper (anti-rabbit IgG-HRP) siehe oben	1:20 000	1 h
Mouse anti-**PMCA 1/4**, monoklonal 5F10, Santa Cruz	1:400	2 h
Sekundärantikörper (anti-mouse IgG-HRP) A2304; Sigma	1:10 000	1h
Rabbit anti-**NaPi-IIb** Eigenherstellung der Universität Zürich	1:2000	4 h
Sekundärantikörper (anti-rabbit IgG-HRP) siehe oben	1:6000	1h
Mouse anti-**Villin**, monoklonal CTS2192; Labgen	1:4000	30 min
Sekundärantikörper (anti-mouse IgG-HRP) siehe oben	1:25 000	20 min
Mouse anti-**β-Actin**, monoklonal A5441; Sigma	1:5000	10 min
Sekundärantikörper (anti-mouse IgG-HRP) siehe oben	1:100 000	20 min

2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse aus den analytischen, strukturellen sowie funktionellen Untersuchungen erfolgte mit Hilfe der Computer-Software GraphPad Prism® Version 5.00 (GraphPad Software, San Diego, USA).

Die Vollblut- bzw. Plasmaparameter der trächtigen bzw. laktierenden und trockengestellten Schafe und Ziegen wurden mit einer 2faktoriellen Varianzanalyse für sich wiederholende Messungen (*repeated measurements* (RM) 2-way ANOVA) und den Faktoren „Zeit“ und „Spezies“ sowie ihre Interaktion ausgewertet. Zur Bestimmung von signifikanten Unterschieden im Verlaufsprofil der trächtigen bzw. laktierenden Schafe und Ziegen wurde der Dunnett’s Multiple Comparison-Test als Post-Test angewendet. Bei der Gruppe der trockengestellten Schafe und Ziegen wurde die Konzentration der jeweiligen Plasmaparameter, die unmittelbar vor dem Trockenstellen ermittelt wurde mit der Konzentration, die nach 7 Wochen Trockenstehen gemessen wurde mit Hilfe des Student’s t-Tests für gepaarte Stichproben bzw. bei nicht normal verteilten Daten mit dem Mann-Whitney-Test verglichen. Die Ergebnisse sind in Form von Säulendiagrammen (Mittelwerte ± SEM) dargestellt.

Die Auswertung der in der Pansen- und Labmagenflüssigkeit gemessenen Ca_t- und P_i-Konzentrationen erfolgte mit Hilfe des Student’s t-Tests für nicht verbundene Stichproben. Die Ergebnisse sind auch hier in Form von Säulendiagrammen (Mittelwerte ± SEM) dargestellt.

Bei der Auswertung der bei den trockengestellten und laktierenden Schafen und Ziegen ermittelten elektrophysiologischen Parameter wurden mögliche Effekte des Reproduktionsstatus sowie der Einfluss von Forskolin bzw. Ouabain auf das Darm- bzw. Pansenepithel mit Hilfe des Student’s t-Tests für nicht verbundene Stichproben für den Zeitpunkt 30 min nach Entnahme der P1-Probe ermittelt.

Die Auswertung und Berechnung der in den Ussingkammer-Versuchen ermittelten Fluxraten ist im Abschnitt 3.3.4 beschrieben. Die Ergebnisse sind in Form von Säulendiagrammen (Mittelwerte ± SEM) abgebildet.

Bei der Auswertung der strukturellen Untersuchungen wurden die Einzelwerte einer Gruppe (laktierende oder trockengestellte Tiere) zunächst auf das Vorliegen einer Gauß'schen Normalverteilung überprüft und dann mit dem Student's t-Test für nicht verbundene Stichproben verglichen. Waren die Einzelwerte einer Gruppe nicht normalverteilt, wurde anstelle des Student's t-Tests der Mann-Whitney-Test angewendet. Stellten sich bei der Auswertung die Varianzen als signifikant unterschiedlich dar, wurden die Werte mit Hilfe der Welch's Correction adaptiert. Die Ergebnisse der mRNA-Expression Calcium-transportierender Strukturen sind in Form von Säulendiagrammen (Mittelwerte ± SEM) abgebildet. Bei der Darstellung der Ergebnisse der Protein-Expression der Calcium-transportierenden Strukturen bzw. von NaPi-IIb in Form von Säulendiagrammen sind die Mittelwerte der trockenstehenden Schafe und Ziegen gleich 100% gesetzt. Die Standardfehler beider Gruppen sowie die Expression der laktierenden Tiere (Mittelwerte ± SEM) wurden in Relation zu diesen aufgetragen.

In den Tabellen und Abbildungen werden die Ergebnisse als arithmetische Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (SEM) angegeben.

Für die Angabe von Signifikanzen bzw. Tendenzen gilt:

n.s.: nicht signifikant;

$P < 0{,}1$: Tendenz , (*);

$P < 0{,}05$: schwach signifikant,* ;

$P < 0{,}01$: signifikant, **;

$P < 0{,}001$: hoch signifikant, ***.

4 Ergebnisse

4.1. Milchleistung

In Abb. 4.1 ist die Entwicklung der Milchleistung der Schafe und Ziegen beginnend ab Tag 2 p.p. bis zum Tag der Schlachtung graphisch dargestellt. Zur Vergleichbarkeit der individuellen Milchleistung wurde eine Korrektur der ermittelten Milchmenge [ml·Tag^{-1}] mit dem jeweiligen Körpergewicht des Tieres [kg] durchgeführt. Aus den erhobenen Daten (Milchleistung·Tag^{-1}·kg^{-1} KGW) wurden arithmetische Mittelwerte der jeweiligen Spezies gebildet und nachfolgend graphisch aufgetragen.

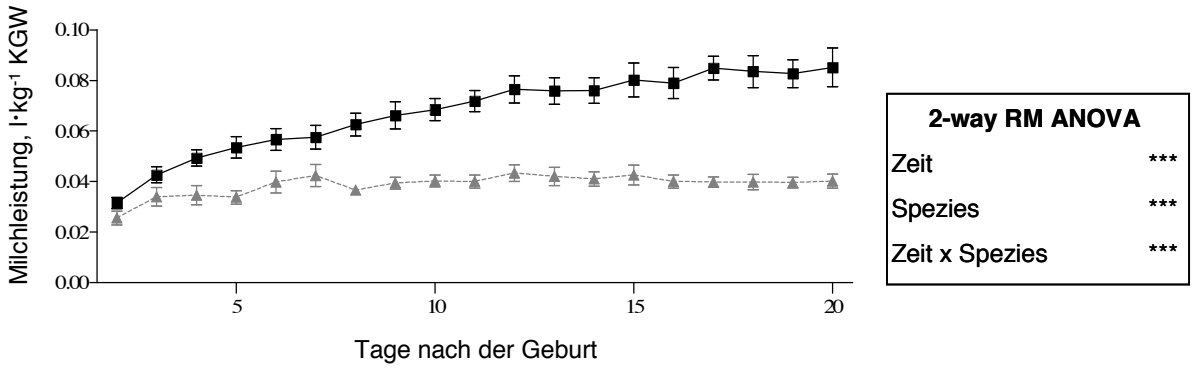

Abb. 4.1: Graphische Darstellung der auf das Körpergewicht korrigierten Milchleistung [l·kg^{-1} KGW] laktierender Schafe (▲) und Ziegen (■) ab Tag 2 bis Tag 20 p.p. (Mittelwerte ± SEM, n_{Schafe} = 5, n_{Ziegen} = 6); Ergebnisse der 2-way RM ANOVA (***: $P < 0{,}001$).

Die Auswertung der Ergebnisse mit einer 2-faktoriellen Varianzanalyse für sich wiederholende Messungen (2-way RM ANOVA) mit den Faktoren „Zeit“ und „Spezies“ zeigte sowohl einen hochsignifikanten Effekt beider Faktoren als auch ihre Interaktion auf die Milchleistung beider Spezies. Zu Beginn der Laktation befanden sich sowohl die Schafe als auch die Ziegen mit circa 0,025 - 0,03 l·kg^{-1} KGW auf demselben Milchleistungsniveau. Während diese sich bei den Schafen ab Tag 10 auf

einem gleich bleibenden Level von circa 0,04 $l \cdot kg^{-1}$ KGW einpendelte, stieg sie bei den laktierenden Ziegen konstant an bis sie am Versuchende (Tag 20) einen im Vergleich zu der Milchleistung der Schafe doppelt so hohen Wert von etwa 0,085 $l \cdot kg^{-1}$ KGW erreichte.

4.2. Einfluss der Geburt und des Einsetzens der Laktation auf die die Makromineral-Homöostase beschreibenden Vollblut- bzw. Plasmaparameter

4.2.1. Effekt der Geburt und des Einsetzens der Laktation auf die Konzentrationen von ionisiertem Calcium, Gesamtcalcium und anorganischem Phosphat im Vollblut bzw. Plasma

Die innerhalb der Versuchsperiode auftretenden Veränderungen der Konzentrationen von ionisiertem Calcium (Ca^{2+}), Gesamtcalcium (Ca_t) und anorganischem Phosphat (P_i) im Vollblut bzw. im Blutplasma der trächtigen bzw. laktierenden Schafe und Ziegen sind in Tab 4.1 sowie in Abb. 4.2 und Abb. 4.3 dargestellt.

Tab. 4.1: Konzentrationen von ionisiertem Calcium (Ca^{2+}), Gesamtcalcium (Ca_t) und anorganischem Phosphat (P_i) [mmol·l^{-1}] im Vollblut bzw. Blutplasma von trächtigen bzw. laktierenden Schafen und Ziegen 2 Tage a.p. bis 10 Tage p.p. (Mittelwerte ± SEM, n_{Schafe} = 5, n_{Ziegen} = 6); Ergebnisse des Dunnett's Multiple Comparison Tests: Signifikante Unterschiede der Messzeitpunkte p.p. zu Tag -2 (Ca^{2+}, Ca_t) bzw. zu Tag 0 (P_i) sind mit Sternchen markiert (*: $P < 0{,}05$; **: $P < 0{,}01$, ***: $P < 0{,}001$).

Tag	Ca^{2+} [mmol·l^{-1}]		Ca_t [mmol·l^{-1}]		P_i [mmol·l^{-1}]	
	Schaf	Ziege	Schaf	Ziege	Schaf	Ziege
-2	1,17 ± 0,04	1,32 ± 0,02	2,42 ± 0,07	2,53 ± 0,08	1,45 ± 0,16	1,29 ± 0,15
0	1,23 ± 0,02	1,18 ± 0,04**	2,34 ± 0,08	2,39 ± 0,11	1,07 ± 0,08	1,07 ± 0,09
0,25	1,27 ± 0,03	1,26 ± 0,05	2,37 ± 0,05	2,48 ± 0,10	1,58 ± 0,19	1,17 ± 0,08
0,5	1,26 ± 0,03	1,30 ± 0,01	2,29 ± 0,18	2,44 ± 0,05	1,36 ± 0,14	1,19 ± 0,15
1	1,23 ± 0,04	1,28 ± 0,01	2,19 ± 0,06	2,38 ± 0,07	1,31 ± 0,10	1,26 ± 0,06
2	1,15 ± 0,05	1,25 ± 0,03	2,15 ± 0,08	2,47 ± 0,08	1,61 ± 0,17	1,53 ± 0,16
4	1,13 ± 0,06	1,24 ± 0,02	2,24 ± 0,10	2,51 ±0,06	1,74 ± 0,32	1,76 ± 0,10
6	1,19 ± 0,05	1,25 ± 0,03	2,28 ± 0,06	2,60 ± 0,10	2,04 ± 0,30**	2,13 ± 0,27*
8	1,16 ± 0,08	1,19 ± 0,03**	2,23 ± 0,12	2,50 ± 0,09	1,55 ± 0,09	2,55 ± 0,55***
10	1,13 ± 0,08	1,17 ± 0,04**	2,33 ± 0,08	2,50 ± 0,09	1,49 ± 0,17	2,69 ± 0,48***

Die Ergebnisse einer 2-faktoriellen Varianzanalyse mit sich wiederholenden Messungen (2-way RM ANOVA) mit den Faktoren „Zeit“ und „Spezies“ sind in den jeweiligen Abbildungen dargestellt.

Bei den Schafen stiegen die P_i-Konzentrationen in der frühen Laktation (Tag 6) im Blutplasma im Vergleich zu Tag 0 statistisch signifikant an. Im Gegensatz dazu konnten keine signifikanten Veränderungen der Ca^{2+}-Konzentrationen im Vollblut sowie der Ca_t-Plasma-Konzentrationen während des gesamten Versuchszeitraumes beobachtet werden.

Die zum Zeitpunkt der Geburt sowie an Tag 8 und Tag 10 im Vollblut gemessenen Ca^{2+}-Konzentrationen der Ziegen waren im Vergleich zu den ante partal ermittelten Konzentrationen (Tag -2) signifikant verringert. Die P_i-Plasma-Konzentrationen dagegen stiegen im Vergleich zum Zeitpunkt der Geburt ab Tag 6 bis Tag 10 an. Die Ca_t-Plasma-Konzentrationen blieben während der gesamten Versuchsdauer unverändert.

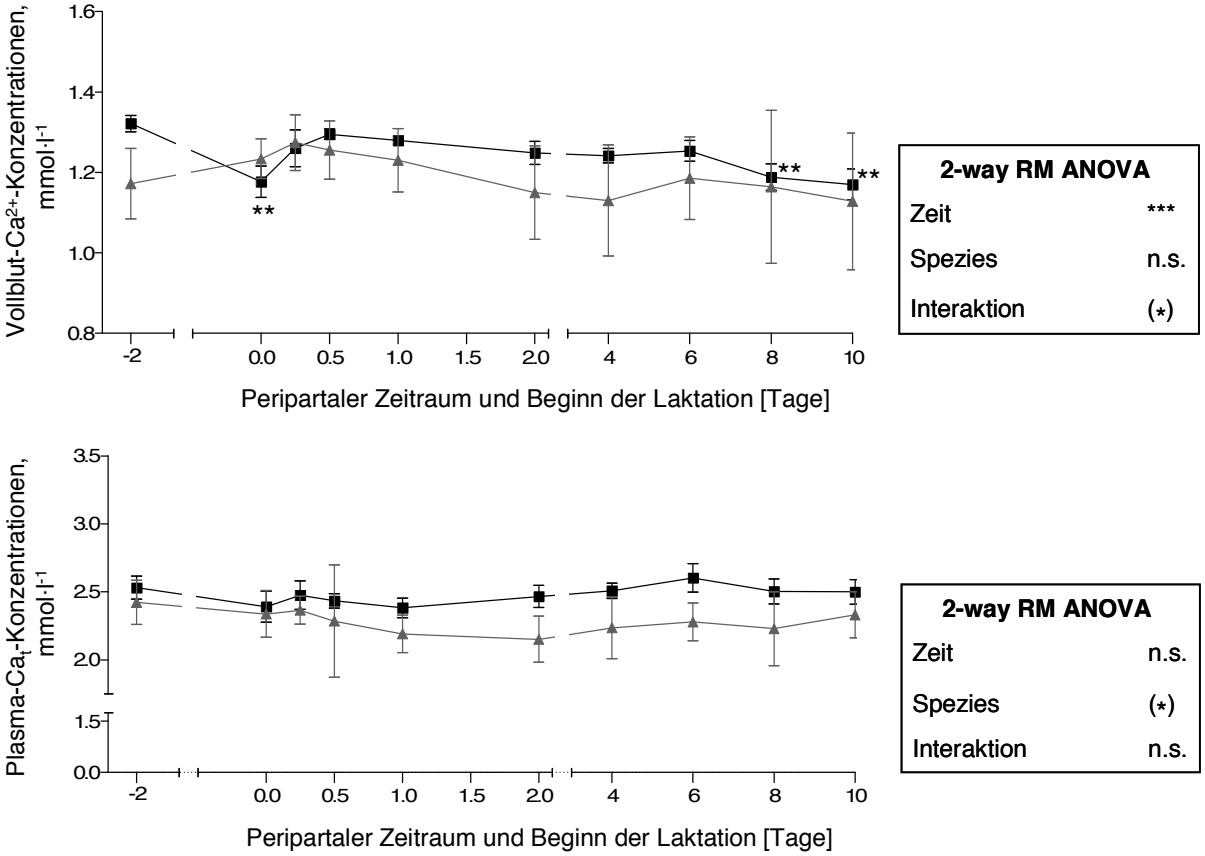

Abb. 4.2: Graphische Darstellung der Konzentrationen von ionisiertem Calcium (Ca^{2+}) und Gesamtcalcium (Ca_t) [$mmol \cdot l^{-1}$] im Vollblut bzw. Blutplasma von Schafen (▲) und Ziegen (■) 2 Tage a.p. bis 10 Tage p.p. (Mittelwerte ± SEM, $n_{Schafe} = 5$, $n_{Ziegen} = 6$); Ergebnisse der 2-way RM ANOVA ((*): $P < 0{,}1$, ***: $P < 0{,}001$); Ergebnisse des Dunnett's Multiple Comparison Tests: Signifikante Unterschiede der Messzeitpunkte p.p. zum Basalwert (Tag -2) sind mit Sternchen markiert (**: $P < 0{,}01$).

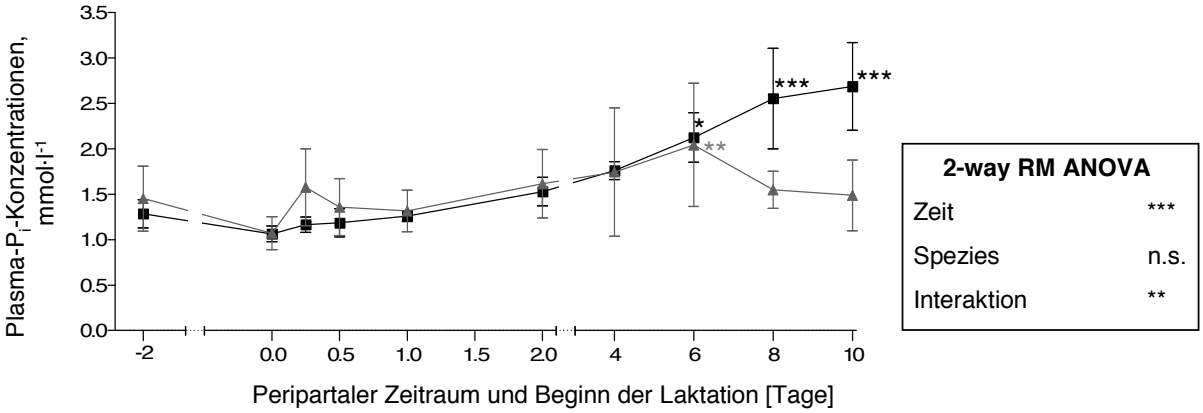

Abb. 4.3: Graphische Darstellung der Konzentrationen von anorganischem Phosphat (P_i) [mmol·l^{-1}] im Blutplasma von Schafen (▲) und Ziegen (■) 2 Tage a.p. bis 10 Tage p.p. (Mittelwerte ± SEM, $n_{Schafe} = 5$, $n_{Ziegen} = 6$); Ergebnisse der 2-way RM ANOVA (**: $P < 0{,}01$; ***: $P < 0{,}001$); Ergebnisse des Dunnett's Multiple Comparison Tests: Signifikante Unterschiede der Messzeitpunkte p.p. zum Zeitpunkt der Geburt (Tag 0) sind mit Sternchen markiert (*: $P < 0{,}05$, **: $P < 0{,}01$, ***: $P < 0{,}001$).

4.2.2. Einfluss der Geburt und des Einsetzens der Laktation auf die Plasmakonzentrationen von Calcitriol, Osteocalcin und CrossLaps®

Die Konzentrationen von Calcitriol, Osteocalcin (OC) und CrossLaps® im Plasma trächtiger bzw. laktierender Schafe und Ziegen sind nachfolgend in Tab. 4.2 sowie in Abb. 4.4 und Abb. 4.5 aufgetragen.

Tab. 4.2: Konzentrationen von Calcitriol [pg·ml^{-1}] sowie Osteocalcin (OC) und CrossLaps® [ng·ml^{-1}] im Blutplasma von trächtigen bzw. laktierenden Schafen und Ziegen 2 Tage bzw. 10 Tage a.p. bis 10 Tage bzw. 21 Tage p.p. (Mittelwerte ± SEM, n_{Schafe} = 5, n_{Ziegen} = 6); Ergebnisse des Dunnett's Multiple Comparison Tests: Signifikante Unterschiede der Messzeitpunkte p.p. zu Tag -2 (Calcitriol) bzw. zu Tag -10 (OC, CrossLaps®) sind mit Sternchen markiert (*: $P < 0{,}05$, **: $P < 0{,}01$, ***: $P < 0{,}001$).

	Calcitriol [pg·ml^{-1}]		**OC** [ng·ml^{-1}]		**CrossLaps®** [ng·ml^{-1}]	
	Schaf	**Ziege**	**Schaf**	**Ziege**	**Schaf**	**Ziege**
- 10			14,2 ± 2,96	35,2 ± 5,98	2,51 ± 0,63	0,83 ± 0,14
- 8						
- 6						
- 4						
- 2	10,2 ± 0,67	13,7 ± 1,22	14,9 ± 3,73	30,5 ± 4,19	1,93 ± 0,43	0,95 ± 0,13
0	15,3 ± 2,57	24,0 ± 2,82*	10,8 ± 2,26	16,7 ± 3,14***	2,70 ± 0,67	0,85 ± 0,12
0,25			11,3 ± 1,64	13,2 ± 2,79***	3,03 ± 0,74	0,83 ± 0,12
0,5	11,5 ± 1,61	21,1 ± 3,12	10,5 ± 1,48	13,5 ± 2,54***	2,82 ± 0,64	0,90 ± 0,13
1			11,9 ± 1,54	16,7 ± 2,75***	3,45 ± 0,45	1,28 ± 0,21***
2	14,1 ± 2,54	20,8 ± 2,98	12,3 ± 2,44	19,3 ± 4,02***	3,51 ± 0,38	1,18 ± 0,20**
4						
6						
8						
10	12,0 ± 0,87	18,6 ± 2,81	17,8 ± 3,61	35,3 ± 6,20	2,40 ± 0,38	0,72 ± 0,07
21			35,7 ± 6,16***			

Die Ergebnisse einer 2-faktoriellen Varianzanalyse mit sich wiederholenden Messungen (2-way RM ANOVA) und den Faktoren „Zeit“ und „Spezies“ sind in den entsprechenden Abbildungen dargestellt.

Die statistische Auswertung der Veränderung gegenüber Tag -2 ergab bei den Schafen im Gegensatz zu den Ziegen keine signifikanten Veränderungen der Calcitriol-Konzentrationen im Plasma. Bei den Ziegen stiegen zum Zeitpunkt der Geburt (Tag 0) die Plasma-Calcitriol-Konzentrationen im Vergleich zu den im ante partalen Zeitraum gemessenen Konzentrationen (Tag -2) signifikant an.

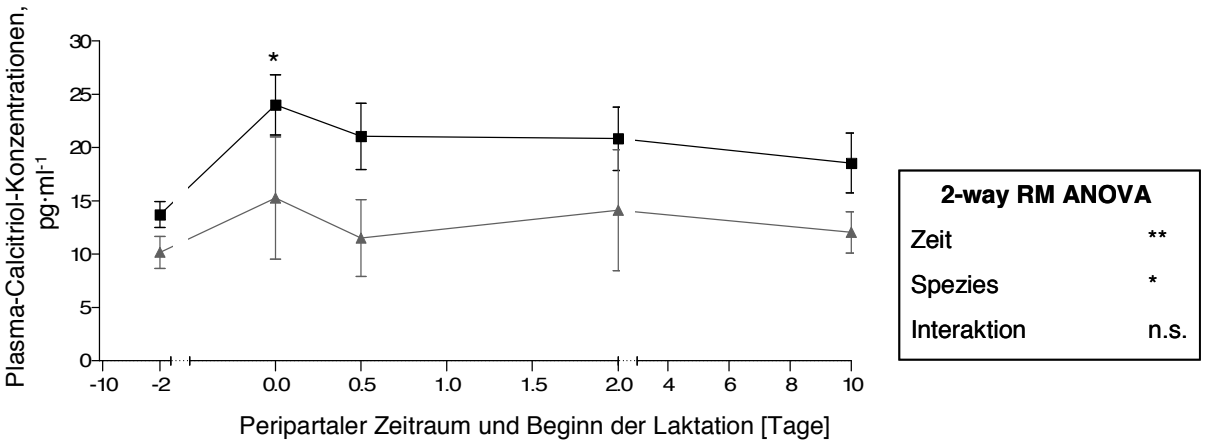

Abb. 4.4: Graphische Darstellung der Konzentrationen von Calcitriol [pg·ml^{-1}] im Blutplasma von Schafen (▲) und Ziegen (■) 2 Tage a.p. bis 10 Tage p.p. (Mittelwerte ± SEM, n_{Schafe} = 5, n_{Ziegen} = 6); Ergebnisse der 2-way RM ANOVA (*: $P < 0{,}05$, **: $P < 0{,}01$); Ergebnisse des Dunnett's Multiple Comparison Tests: Signifikante Unterschiede der jeweiligen Messzeitpunkte zum Basalwert (Tag -2) sind mit Sternchen markiert (*: $P < 0{,}05$).

Bei den Schafen konnte keine signifikante Veränderung der OC-Konzentrationen direkt vor, während und nach der Geburt nachgewiesen werden. Ein signifikanter Anstieg im Vergleich zu Tag -10 konnte jedoch in der Laktation 21 Tage p.p. beobachtet werden.

Im Gegensatz zu den Schafen verringerten sich bei den Ziegen die Plasma-OC-Konzentrationen zur Geburt (Tag 0) und im sich anschließenden postpartalen Zeitraum (Tag 0,25 – Tag 2) signifikant im Vergleich zu Tag -10.

Aufgrund der hohen Varianz der CrossLaps®-Konzentrationen (siehe Abb. 4.5) konnte bei den Schafen keine signifikante Veränderung innerhalb der Versuchsperiode beobachtet werden. Im Gegensatz dazu konnte bei den Ziegen ein signifikanter Anstieg der CrossLaps®-Plasma-Konzentrationen mit Beginn der Laktation an Tag 1 p.p. und an Tag 2 p.p. ermittelt werden.

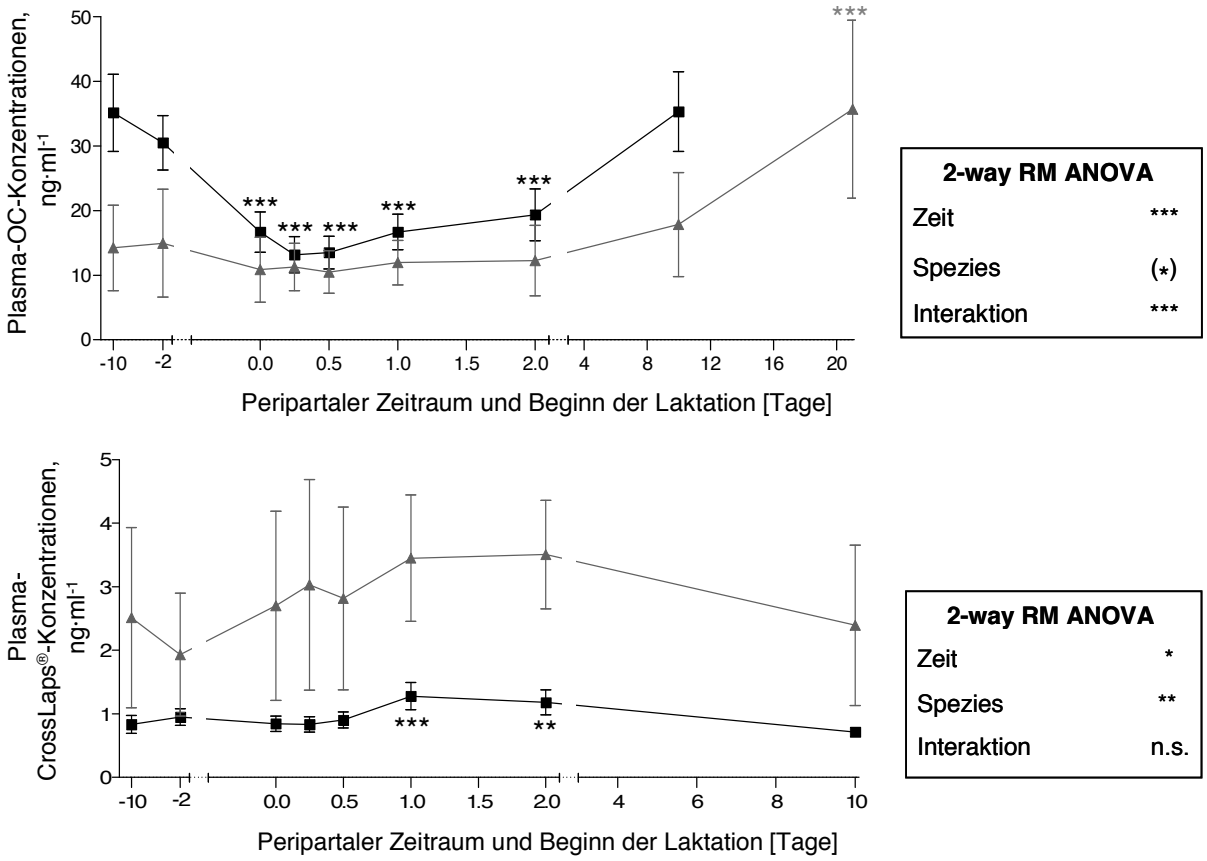

Abb. 4.5: Graphische Darstellung der Konzentrationen von Osteocalcin (OC) und CrossLaps® [ng·ml^{-1}] im Blutplasma von Schafen (▲) und Ziegen (■) 10 Tage a.p. bis 10 Tage bzw. 21 Tage p.p. (Mittelwerte ± SEM; n_{Schafe} = 5, n_{Ziegen} = 6); Ergebnisse der 2-way RM ANOVA ((*): $P < 0{,}1$, *: $P < 0{,}05$; **: $P < 0{,}01$; ***: $P < 0{,}001$); Ergebnisse des Dunnett's Multiple Comparison Tests: Signifikante Unterschiede der jeweiligen Messzeitpunkte zum Basalwert (Tag -10) sind mit Sternchen markiert (**: $P < 0{,}01$, ***: $P < 0{,}001$).

4.3. Einfluss des Trockenstellens auf die Plasmaparameter der Makromineral-Homöostase

4.3.1. Einfluss des Trockenstellens auf die Plasma-Konzentrationen von Gesamtcalcium und anorganischem Phosphat

Die Konzentrationen von Gesamtcalcium (Ca_t) und anorganischem Phosphat (P_i) im Blutplasma von Schafen und Ziegen nach 3 Monaten Laktation bzw. 7 Wochen nach dem Trockenstellen sind zusammen mit den Ergebnissen einer 2-faktoriellen Varianzanalyse mit sich wiederholenden Messungen (2-way RM ANOVA) mit den Faktoren „Zeit“ und „Spezies“ in Abb. 4.6 dargestellt.

Bei den Ziegen konnte kein Unterschied zwischen den vor dem Trockenstellen ermittelten Konzentrationen von Ca_t und P_i und den nach 7 Wochen gemessenen Levels im Plasma beobachtet werden, während die 7 Wochen trockengestellten Schafe im Vergleich zu den nach 3 Monaten Laktation gemessenen Werten tendenziell eine erhöhte P_i-Konzentration zeigten. Die Ca_t-Konzentrationen blieben bei diesen Tieren unverändert.

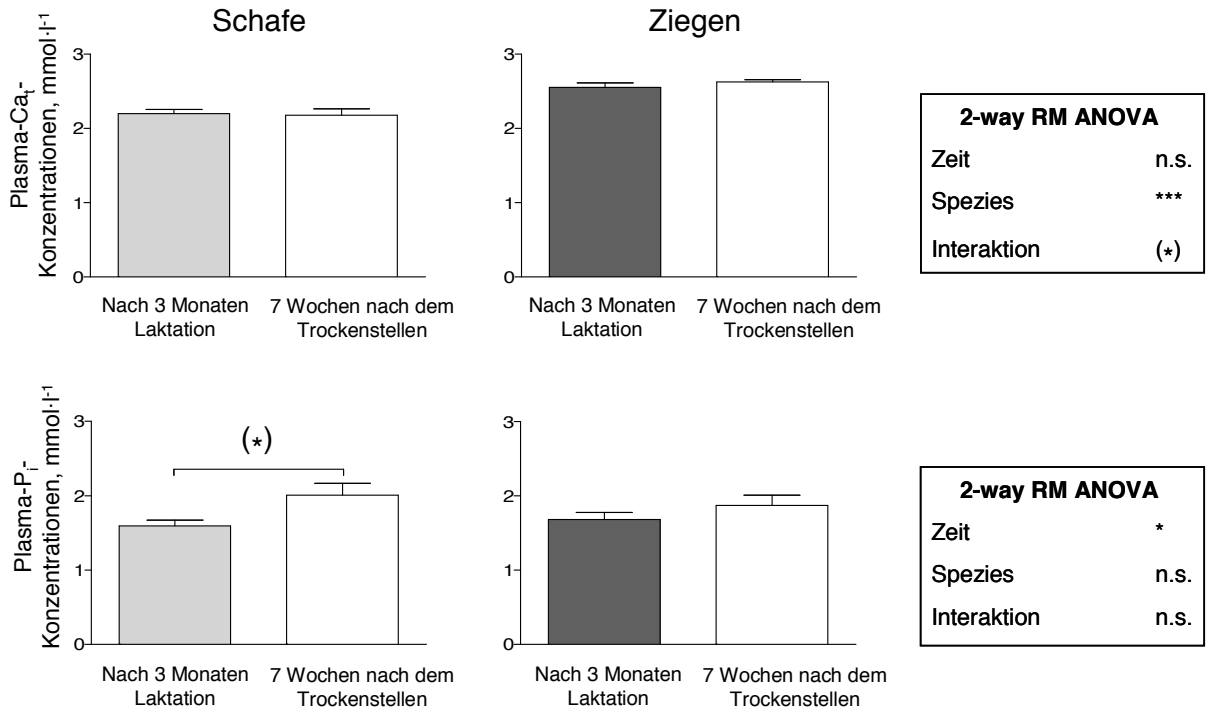

Abb. 4.6: Graphische Darstellung der Konzentrationen von Gesamtcalcium (Ca_t) und anorganischem Phosphat (P_i) [mmol·l^{-1}]im Blutplasma von Schafen (links) und Ziegen (rechts) nach 3 Monaten Laktation (hell- bzw. dunkelgraue Säulen) sowie 7 Wochen nach dem Trockenstellen (weiße Säulen) (Mittelwerte ± SEM, n_{Schafe} = 5, n_{Ziegen} = 6), Ergebnisse der 2-way RM ANOVA ((*): $P < 0{,}1$; *: $P < 0{,}05$; ***: $P < 0{,}001$); Ergebnisse des Student's t-Tests ((*): $P < 0{,}1$).

4.3.2. Einfluss des Trockenstellens auf die Plasma-Konzentrationen von Calcitriol, Osteocalcin und CrossLaps®

Die Konzentrationen von Calcitriol, Osteocalcin (OC) und CrossLaps® im Blutplasma von Schafen und Ziegen nach 3 Monaten Laktation bzw. 7 Wochen nach dem Trockenstellen sind zusammen mit den Ergebnissen einer 2-faktoriellen Varianzanalyse mit sich wiederholenden Messungen (2-way RM ANOVA) mit den Faktoren „Zeit" und „Spezies" in Abb. 4.7 und Abb. 4.8 dargestellt.

Die bei den Schafen und den Ziegen vor dem Trockenstellen ermittelten Konzentrationen von Calcitriol unterschieden sich nicht signifikant von den 7 Wochen nach dem Trockenstellen ermittelten Konzentrationen.

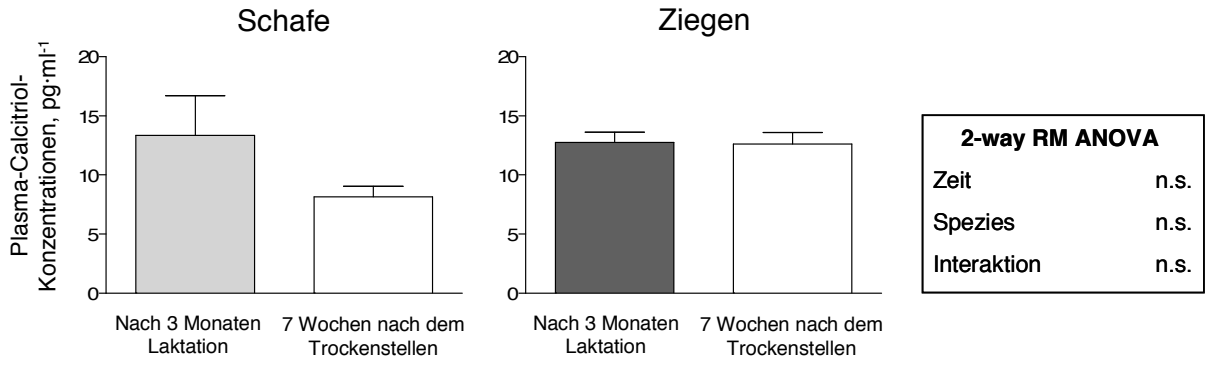

Abb. 4.7: Graphische Darstellung der Konzentrationen von Calcitriol [$pg \cdot ml^{-1}$] im Blutplasma von Schafen (links) und Ziegen (rechts) nach 3 Monaten Laktation (hell- bzw. dunkelgraue Säulen) sowie 7 Wochen nach dem Trockenstellen (weiße Säulen) (Mittelwerte ± SEM, $n_{Schafe} = 5$, $n_{Ziegen} = 6$); Ergebnisse der 2-way RM ANOVA; Ergebnisse des Mann-Whitney-Tests bzw. des Student's t-Tests.

Bei den Schafen waren die CrossLaps®-Plasma-Konzentrationen, die vor dem Trockenstellen ermittelt wurden, signifikant im Vergleich zu den 7 Wochen nach dem Trockenstellen gemessenen Werten verringert. Bei den Ziegen konnten keine Veränderungen der CrossLaps®-Plasma-Konzentrationen ermittelt werden, jedoch waren die Plasma-Konzentrationen von OC, die 7 Wochen nach dem Trockenstellen gemessen wurden im Vergleich zu den vor dem Trockenstellen ermittelten Konzentrationen signifikant erhöht.

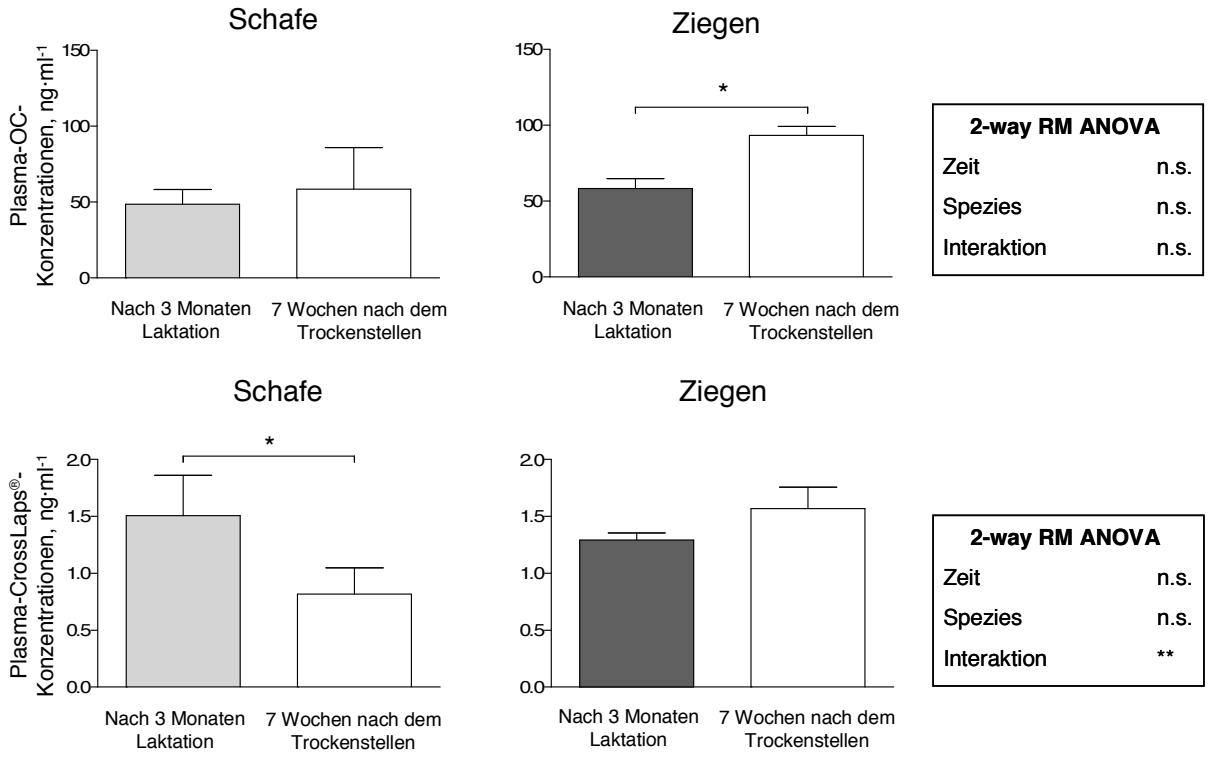

Abb. 4.8: Graphische Darstellung der Konzentrationen von Osteocalcin (OC) und CrossLaps® [ng·ml^{-1}] im Blutplasma von Schafen (links) und Ziegen (rechts) nach 3 Monaten Laktation (hell- bzw. dunkelgraue Säulen) sowie 7 Wochen nach dem Trockenstellen (weiße Säulen) (Mittelwerte ± SEM, n_{Schafe} = 5, n_{Ziegen} = 6), Ergebnisse der 2-way RM ANOVA (**: $P < 0{,}01$); Ergebnisse des Student's t-Tests (*: $P < 0{,}05$).

4.4. Konzentrationen von Calcium und Phosphat in der Pansen- sowie Labmagenflüssigkeit von trockengestellten und laktierenden Schafen und Ziegen

Die Konzentrationen von Gesamtcalcium (Ca_t) und anorganischem Phosphat (P_i) in der Pansen- bzw. Labmagenflüssigkeit trockengestellter und laktierender Schafe und Ziegen sind in Abb. 4.9 und Abb. 4.10 dargestellt. Ein signifikanter Unterschied der Ca_t-Konzentrationen konnte in den Pansenflüssigkeiten von laktierenden Schafen und Ziegen im Vergleich zu den trockengestellten Tieren und zwischen trockengestellten Schafen und Ziegen nachgewiesen werden. Die Konzentrationen von Ca_t in der Labmagenflüssigkeit sowie von P_i in der Pansen- und der Labmagenflüssigkeit von laktierenden Schafen und Ziegen wiesen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den trockengestellten Tieren auf. Allerdings konnte ein signifikanter Unterschied der P_i-Konzentrationen in der Pansenflüssigkeit zwischen trockengestellten Schafen und Ziegen sowie zwischen laktierenden Schafen und Ziegen gemessen werden. Dieser Unterschied konnte dagegen nicht in der Labmagenflüssigkeit ermittelt werden.

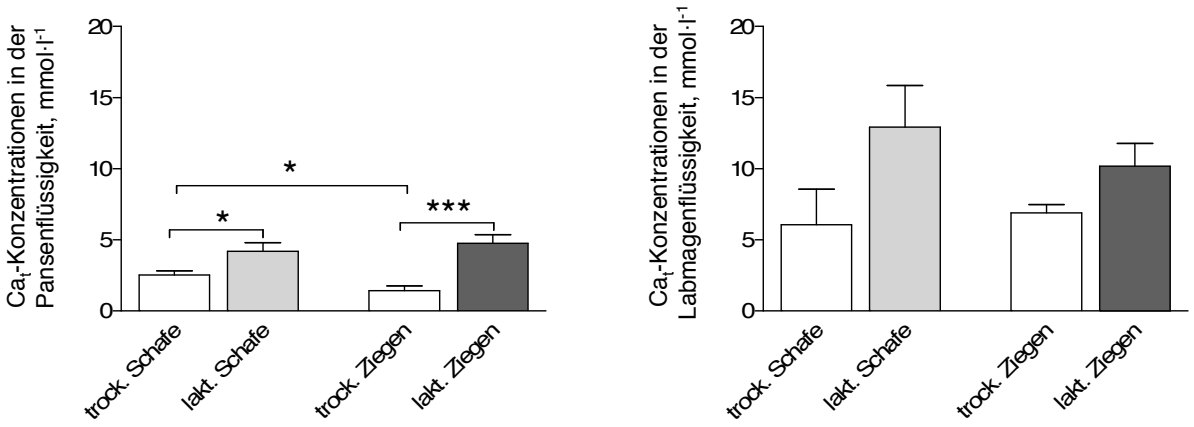

Abb. 4.9: Graphische Darstellung der Konzentrationen von Gesamtcalcium (Ca_t) [mmol·l^{-1}] in der Pansen- (links) und Labmagenflüssigkeit (rechts) trockengestellter (= trock.) (weiße Säulen) und laktierender (= lakt.) Schafe und Ziegen (hell- bzw. dunkelgraue Säulen) (Mittelwerte ± SEM, n_{Schafe} = 5, n_{Ziegen} = 6); Ergebnisse des Student's t-Tests (*: $P < 0{,}05$; ***: $P < 0{,}001$).

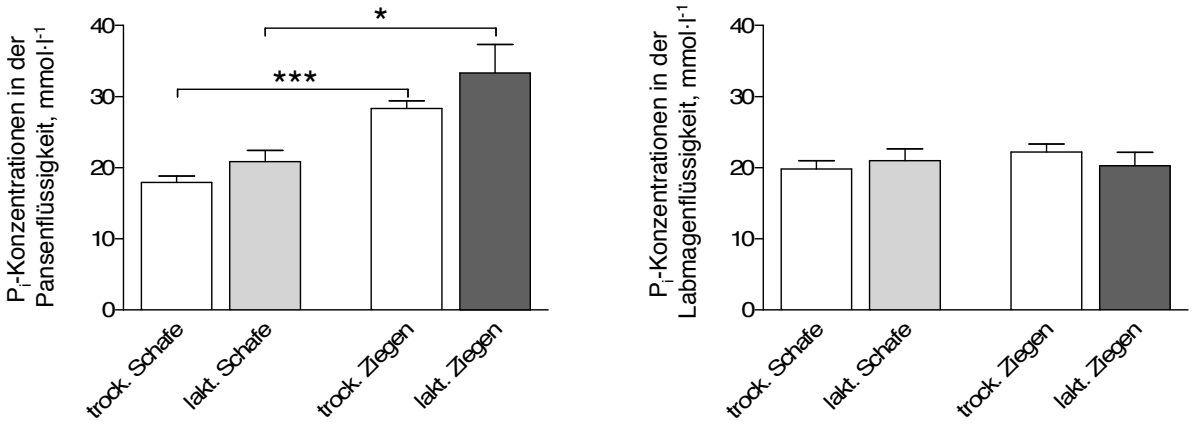

Abb. 4.10: Graphische Darstellung der Konzentrationen von anorganischem Phosphat (P_i) [mmol·l^{-1}] in der Pansen- (links) und Labmagenflüssigkeit (rechts) trockengestellter (= trock.) (weiße Säulen) und laktierender (= lakt.) Schafe und Ziegen (hell- bzw. dunkelgraue Säulen) (Mittelwerte ± SEM, n_{Schafe} = 5, n_{Ziegen} = 6); Ergebnisse des Student's t-Tests (*: $P < 0{,}05$; ***: $P < 0{,}001$).

4.5. Einfluss der Laktation auf elektrophysiologische Gewebeparameter und transepitheliale Fluxraten

4.5.1. Elektrophysiologische Parameter von trockengestellten und laktierenden Schafen und Ziegen

4.5.1.1. Duodenum

Die im Duodenum ermittelten Gewebeleitfähigkeiten (G_t) sowie die Kurzschlussströme (I_{sc}) 30 min nach Entnahme der P1-Probe (siehe Tab. 3.2 und Tab. 3.3) trockengestellter und laktierender Schafe und Ziegen sind in Tab. 4.3 dargestellt.

Sowohl bei den Schafen als auch bei den Ziegen war der I_{sc} der laktierenden Tiere im Vergleich zu den trockengestellten signifikant verringert. Bei den laktierenden Ziegen war zudem auch die G_t im Vergleich zu den trockengestellten Tieren signifikant verringert.

Nach Zugabe von Forskolin stieg der I_{sc} sowohl bei den trockengestellten als auch bei den laktierenden Schafen um 0,64 ± 0,38 $\mu Eq \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$ bzw. um 0,52 ± 0,23 $\mu Eq \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$ (nicht dargestellt). Ein signifikant höheres Ansteigen des I_{sc} um 0,86 ± 0,16 $\mu Eq \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$ konnte bei den trockengestellten Ziegen im Vergleich zu den laktierenden Tieren mit einem Anstieg um 0,32 ± 0,01 $\mu Eq \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$ ($P < 0,05$) beobachtet werden (nicht dargestellt).

Tab. 4.3: Elektrophysiologische Parameter des Duodenums trockengestellter und laktierender Schafe und Ziegen; Gewebeleitfähigkeiten (G_t) [mS·cm^{-2}] 30 min nach Entnahme der P1-Probe; Kurzschlussströme (I_{sc}) [μEq·cm^{-2}·h^{-1}] 30 min nach Entnahme der P1-Probe (Mittelwerte ± SEM; n_{Schafe} = 5; n_{Ziegen} = 6); Ergebnisse des Student's t-Tests.

G_t [mS·cm^{-2}] **I_{sc}** [μEq·cm^{-2}·h^{-1}]		**Trockengestellt**	**Laktierend**	**Student's t-Test**
Schafe	G_t	17,5 ± 2,2	12,3 ± 1,8	n.s.
	I_{sc}	0,53 ± 0,06	0,05 ± 0,08	$P < 0{,}01$
Ziegen	G_t	15,38 ± 0,78	8,08 ± 0,63	$P < 0{,}001$
	I_{sc}	0,50 ± 0,07	0,05 ± 0,02	$P < 0{,}001$

4.5.1.2. Jejunum

Die im Jejunum ermittelten Gewebeleitfähigkeiten (G_t) sowie die Kurzschlussströme (I_{sc}) 30 min nach Entnahme der P1-Probe (siehe Tab. 3.2 und Tab. 3.3) trockengestellter und laktierender Schafe und Ziegen sind in Tab. 4.4 dargestellt.

Bei den Schafen waren die G_t sowie der I_{sc} der laktierenden Tiere im Vergleich zu den trockengestellten signifikant verringert.

Nach Zugabe von Forskolin stieg der I_{sc} sowohl bei den trockengestellten als auch bei den laktierenden Schafen um 1,11 ± 0,30 μEq·cm^{-2}·h^{-1} bzw. um 0,77 ± 0,18 μEq·cm^{-2}·h^{-1} (nicht dargestellt). Ein signifikant höheres Ansteigen des I_{sc} um 1,23 ± 0,21 μEq·cm^{-2}·h^{-1} konnte bei den trockengestellten Ziegen im Vergleich zu den laktierenden Tieren mit einem Anstieg um 0,49 ± 0,11 μEq·cm^{-2}·h^{-1} ($P < 0{,}01$) beobachtet werden (nicht dargestellt).

Tab. 4.4: Elektrophysiologische Parameter des Jejunums trockengestellter und laktierender Schafe und Ziegen; Gewebeleitfähigkeiten (G_t) [mS·cm^{-2}] 30 min nach Entnahme der P1-Probe; Kurzschlussströme (I_{sc}) [μEq·cm^{-2}·h^{-1}] 30 min nach Entnahme der P1-Probe (Mittelwerte ± SEM; n_{Schafe} = 5; n_{Ziegen} = 6); Ergebnisse des Student's t-Tests.

G_t [mS·cm^{-2}] **I_{sc}** [μEq·cm^{-2}·h^{-1}]		**Trockengestellt**	**Laktierend**	**Student's t-Test**
Schafe	G_t	23,7 ± 3,2	14,3 ± 1,3	$P < 0,05$
	I_{sc}	0,68 ± 0,13	0,03 ± 0,06	$P < 0,01$
Ziegen	G_t	19,82 ± 1,24	18,97 ± 2,43	n.s.
	I_{sc}	-0,15 ± 0,07	-0,08 ± 0,08	n.s.

4.5.1.3. Pansen

Die im Pansen ermittelten Gewebeleitfähigkeiten (G_t) sowie die Kurzschlussströme (I_{sc}) 30 min nach Entnahme der P1-Probe (siehe Tab. 3.2 und Tab. 3.3) trockengestellter und laktierender Schafe und Ziegen sind in Tab. 4.5 dargestellt.

Bei den Schafen und Ziegen konnten keine wesentlichen Effekte des Reproduktionsstatus auf die elektrophysiologischen Parameter im Pansen beobachtet werden.

Nach Zugabe von Ouabain sank der I_{sc} sowohl bei den trockengestellten als laktierenden Schafen um -0,53 ± 0,08 μEq·cm^{-2}·h^{-1} bzw. um -0,84 ± 0,08 μEq·cm^{-2}·h^{-1} (nicht dargestellt). Eine signifikante Verringerung des I_{sc} um -0,91 ± 0,03 μEq·cm^{-2}·h^{-1} konnte bei den trockengestellten Ziegen im Vergleich zu den laktierenden Tieren mit einer Verringerung von -0,56 ± 0,05 μEq·cm^{-2}·h^{-1} ($P < 0,001$) beobachtet werden (nicht dargestellt).

Tab. 4.5: Elektrophysiologische Parameter des Pansens trockengestellter und laktierender Schafe und Ziegen; Gewebeleitfähigkeiten (G_t) [$mS \cdot cm^{-2}$] 30 min nach Entnahme der P1-Probe; Kurzschlussströme (I_{sc}) [$\mu Eq \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$] 30 min nach Entnahme der P1-Probe (Mittelwerte ± SEM; $n_{Schafe} = 5$; $n_{Ziegen} = 6$); Ergebnisse des Student's t-Tests.

G_t [$mS \cdot cm^{-2}$] **I_{sc}** [$\mu Eq \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$]		**Trockengestellt**	**Laktierend**	**Student's t-Test**
Schafe	G_t	2,7 ± 0,2	3,5 ± 0,7	n.s.
	I_{sc}	0,88 ± 0,11	0,56 ± 0,15	n.s.
Ziegen	G_t	2,43 ± 0,24	2,92 ± 0,20	n.s.
	I_{sc}	0,91 ± 0,08	0,84 ± 0,04	n.s.

4.5.2. Intestinale Calcium-, Phosphat- und Mannit-Fluxraten sowie ruminale Calcium- und Mannit-Fluxraten trockengestellter und laktierender Schafe und Ziegen

4.5.2.1. Duodenum

Die Calcium-, Phosphat- und Mannit-Fluxraten im Duodenum trockengestellter und laktierender Schafe und Ziegen sind in Abb. 4.11 und Abb. 4.12 sowie in Tab. 4.6 dargestellt. Weder bei den trockenstehenden noch bei den laktierenden Schafen konnten im Duodenum signifikante Calcium- oder Phosphat-Nettofluxraten nachgewiesen werden. Auch die ermittelten Mannit-Fluxraten im Duodenum unterschieden sich nicht signifikant von 0.

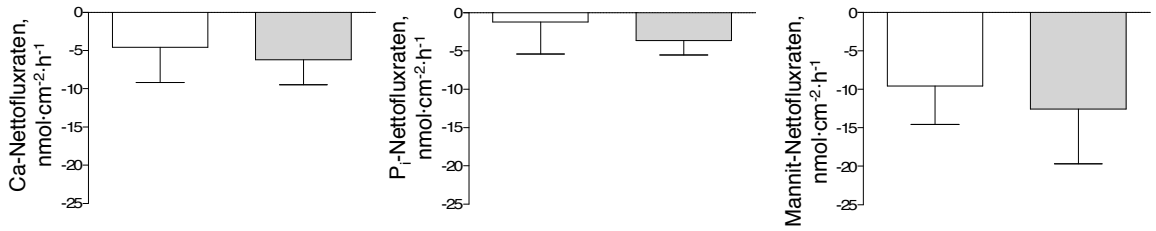

Abb. 4.11: Calcium-, Phosphat- und Mannit-Nettofluxraten [$nmol \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$] im Duodenum trockengestellter (weiße Säulen) und laktierender Schafe (hellgraue Säulen) (Mittelwerte ± SEM, n = 5); Ergebnisse des Student's t-Tests.

Auch im Duodenum der Ziegen konnten weder bei den trockengestellten noch bei den laktierenden Tieren signifikante Calcium-Nettofluxraten nachgewiesen werden. Jedoch konnte ein tendenzieller Unterschied der beiden Gruppen ermittelt werden. Im signifikanten Unterschied zu den laktierenden Ziegen konnte eine signifikante Phosphat-Nettoabsorption bei den trockengestellten Tieren ermittelt werden. Für die Mannit-Fluxraten wurde bei den laktierenden Ziegen eine sich signifikant von 0 unterscheidende Sekretion beobachtet während bei den trockenstehenden Ziegen keine signifikanten Mannit-Fluxraten nachgewiesen werden konnten.

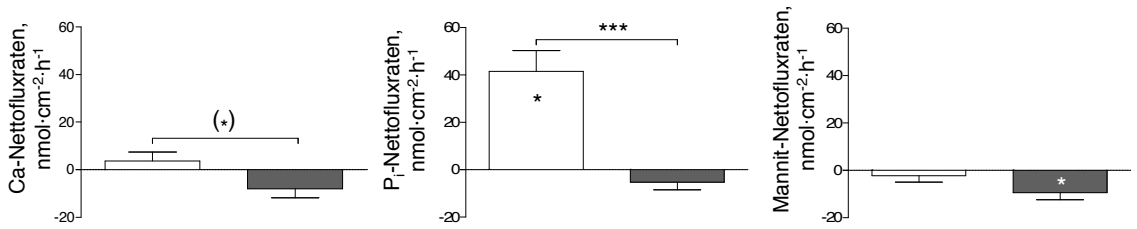

Abb. 4.12: Calcium- (Ca), Phosphat- (P_i) und Mannit-Nettofluxraten [$nmol \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$] im Duodenum trockengestellter (weiße Säulen) und laktierender Ziegen (dunkelgraue Säulen); (Mittelwerte ± SEM, n = 6); Ergebnisse des Student's t-Tests ((*): $P < 0{,}1$, ***: $P < 0{,}001$); Sternchen außerhalb der Säulen stehen für signifikante Unterschiede der Fluxraten trockenstehender vs. laktierender Tiere; Sternchen innerhalb der Säulen stehen für signifikant von 0 verschiedene Fluxraten.

Tab. 4.6: Unidirektionale sowie Calcium-, Phosphat- und Mannit-Nettofluxraten [$nmol \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$] im Duodenum trockengestellter und laktierender Schafe und Ziegen; J_{ms} = Fluxrate von mukosal nach serosal, J_{sm} = Fluxrate von serosal nach mukosal, J_{net} = Nettofluxrate; $J_{net} = J_{ms} - J_{sm}$; n.s. = nicht signifikant; signifikante von 0 verschiedene Fluxraten sind mit Sternchen markiert; Ergebnisse des Student's t-Tests.

[$nmol \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$]			**trockengestellt**	**laktierend**	**Student's t-Test**
Schafe (n = 10)	**Calcium**	J_{ms}	20,33 ± 5,03*	8,36 ± 2,50*	$P < 0{,}1$
		J_{sm}	24,91 ± 3,53*	14,55 ± 5,70	n.s.
		J_{net}	-4,58 ± 4,60	-6,19 ± 3,28	n.s.
	Phosphat	J_{ms}	24,46 ± 5,10*	11,15 ± 2,85*	$P < 0{,}1$
		J_{sm}	25,65 ± 5,29*	14,77 ± 4,56*	n.s.
		J_{net}	-1,19 ± 4,20	-3,62 ± 1,89	n.s.
	Mannit	J_{ms}	19,76 ± 5,82*	18,47 ± 8,04	n.s.
		J_{sm}	29,34 ± 4,53*	31,03 ± 11,26	n.s.
		J_{net}	-9,58 ± 5,00	-12,56 ± 7,12	n.s.
Ziegen (n = 12)	**Calcium**	J_{sm}	32,05 ± 4,32*	6,60 ± 1,69*	$P < 0{,}001$
		J_{sm}	28,39 ± 2,62*	14,58 ± 3,79*	$P < 0{,}05$
		J_{net}	3,66 ± 3,83	-7,99 ± 3,82	$P < 0{,}1$
	Phosphat	J_{sm}	58,96 ± 6,86*	8,01 ± 2,05*	$P < 0{,}001$
		J_{ms}	17,43 ± 3,24*	13,29 ± 3,14*	n.s.
		J_{net}	41,53 ± 8,71	-5,28 ± 3,20	$P < 0{,}001$
	Mannit	J_{ms}	24,63 ± 3,88*	6,14 ± 1,13*	$P < 0{,}01$
		J_{sm}	26,87 ± 3,06*	15,60 ± 3,10*	$P < 0{,}05$
		J_{net}	-2,25 ± 2,71	-9,46 ± 2,95*	n.s.

4.5.2.2. Jejunum

Die Calcium-, Phosphat- und Mannit-Fluxraten, die im Jejunum trockengestellter und laktierender Schafe und Ziegen ermittelt wurden, sind in Abb. 4.13 und Abb. 4.14 sowie in Tab. 4.7 dargestellt.

Im Unterschied zu den Präparationen der trockengestellten Tiere konnte im Jejunum der laktierenden Schafe eine signifikante Calcium- sowie Phosphat-Nettoabsorption nachgewiesen werden. Letztere unterschied sich tendenziell zu den trockengestellten Tieren. Auch die Mannit-Fluxraten der laktierenden Tiere waren im Vergleich zu den trockengestellten Schafen signifikant höher und unterschieden sich signifikant von 0.

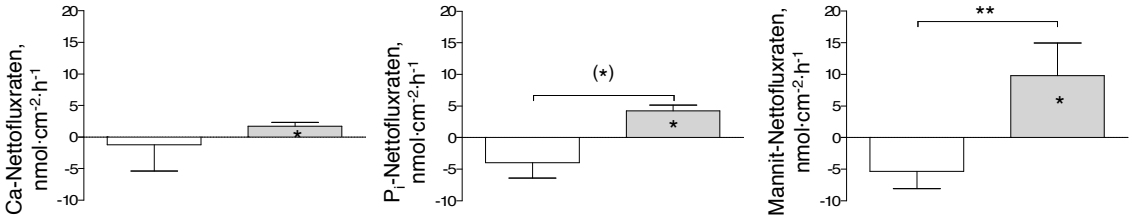

Abb. 4.13: Calcium- (Ca), Phosphat- (P_i) und Mannit-Nettofluxraten [$nmol \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$] im Jejunum trockengestellter (weiße Säulen) und laktierender Schafe (hellgraue Säulen) (Mittelwerte ± SEM, n = 5); Ergebnisse des Student's t-Tests; Ergebnisse des Mann-Whitney-Tests ((*): $P < 0{,}1$, **: $P < 0{,}01$), Sternchen außerhalb der Säulen stehen für signifikante bzw. tendenzielle Unterschiede der Fluxraten trockenstehender vs. laktierender Tiere; Sternchen innerhalb der Säulen stehen für signifikant von 0 verschiedene Fluxraten.

Signifikante, sich von 0 unterscheidende Calcium-Nettofluxraten konnten im Jejunum trockenstehender und laktierender Ziegen nicht beobachtet werden. Jedoch wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen nachgewiesen, bei dem die laktierenden Ziegen eher in Richtung einer Calcium-Absorption und die trockengestellten Tiere zu einer Sekretion von Calcium tendieren. Eine signifikante Absorption von Phosphat konnte im Jejunum der trockenstehenden Ziegen im signifikanten Unterschied zu den laktierenden Tieren ermittelt werden.

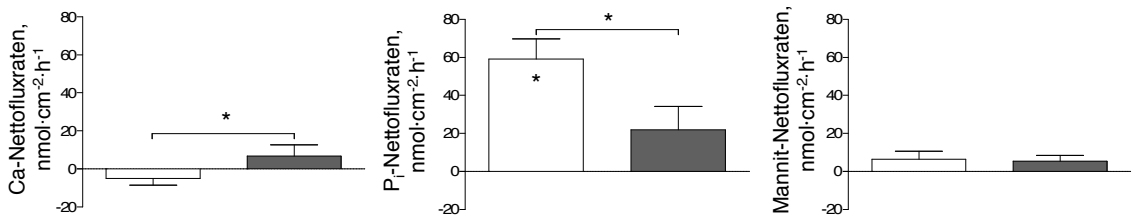

Abb. 4.14: Calcium- (Ca), Phosphat- (P_i) und Mannit-Nettofluxraten im Jejunum trockengestellter (weiße Säulen) und laktierender Ziegen (dunkelgraue Säulen) (Mittelwerte ± SEM, n = 6); Ergebnisse des Mann-Whitney-Tests (*: $P < 0{,}05$); Sternchen außerhalb der Säulen stehen für signifikante Unterschiede der Fluxraten trockenstehender vs. laktierender Tiere; Sternchen innerhalb der Säulen stehen für signifikant von 0 verschiedene Fluxraten.

Tab. 4.7: Unidirektionale sowie Calcium-, Phosphat- und Mannit-Nettofluxraten [$nmol \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$] im Jejunum trockengestellter und laktierender Schafe und Ziegen; J_{ms} = Fluxrate von mukosal nach serosal, J_{sm} = Fluxrate von serosal nach mukosal, J_{net} = Nettofluxrate; $J_{net} = J_{ms} - J_{sm}$; n.s. = nicht signifikant; signifikante von 0 verschiedene Fluxraten sind mit Sternchen markiert; Ergebnisse des Student's t-Tests bzw. des Mann-Whitney-Tests.

[$nmol \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$]			**trockengestellt**	**laktierend**	**Student's t-Test[1] bzw. Mann-Whitney-Test[2]**
Schafe (n = 10)	**Calcium**	J_{ms}	40,33 ± 5,88*	17,38 ± 3,87*	$P < 0{,}05^1$
		J_{sm}	41,55 ± 5,86*	15,64 ± 3,88*	$P < 0{,}01^1$
		J_{net}	-1,22 ± 4,13	1,74 ± 0,58*	n.s.
	Phosphat	J_{ms}	36,01 ± 6,25*	20,83 ± 3,23*	$P < 0{,}1^1$
		J_{sm}	39,99 ± 5,93*	16,58 ± 2,58*	$P < 0{,}05^1$
		J_{net}	-3,98 ± 2,43	4,25 ± 0,91*	$P < 0{,}1^2$
	Mannit	J_{ms}	40,85 ± 6,41*	41,46 ± 8,53*	n.s.
		J_{sm}	41,80 ± 6,01*	31,32 ± 6,87*	n.s.
		J_{net}	-0,95 ± 2,25	10,14 ± 2,08*	$P < 0{,}01^1$
Ziegen (n = 12)	**Calcium**	J_{sm}	31,41 ± 3,94*	41,43 ± 4,63*	n.s.
		J_{sm}	36,34 ± 2,10*	31,62 ± 4,34*	n.s.
		J_{net}	-4,93 ± 3,69	9,81± 5,16	$P < 0{,}05^2$
	Phosphat	J_{sm}	86,92 ± 11,86*	46,77 ± 10,68*	$P < 0{,}1^2$
		J_{ms}	27,76 ± 1,79*	24,79 ± 3,24*	n.s.
		J_{net}	59,16 ± 10,61*	21,98 ± 12,23	$P < 0{,}05^2$
	Mannit	J_{ms}	37,10 ± 4,23*	31,87 ± 3,60*	n.s.
		J_{sm}	30,72 ± 1,88*	26,38 ± 3,24*	n.s.
		J_{net}	6,38 ± 4,21	5,49 ± 2,94	n.s.

4.5.2.3. Pansen

Die Calcium- und Mannit-Fluxraten, die im Pansen trockengestellter und laktierender Schafe und Ziegen ermittelt wurden, sind in Abb. 4.15 und Abb. 4.16 sowie in Tab. 4.8 dargestellt.

Eine signifikante Nettoabsorption von Calcium konnte im Pansen aller Versuchstiere beobachtet werden. Diese war bei den laktierenden Ziegen signifikant höher als bei den trockengestellten Tieren. Bei den trockengestellten Schafen und Ziegen und bei den laktierenden Schafen konnte eine vergleichsweise geringe jedoch signifikante Sekretion von Mannit in den Pansen nachgewiesen werden.

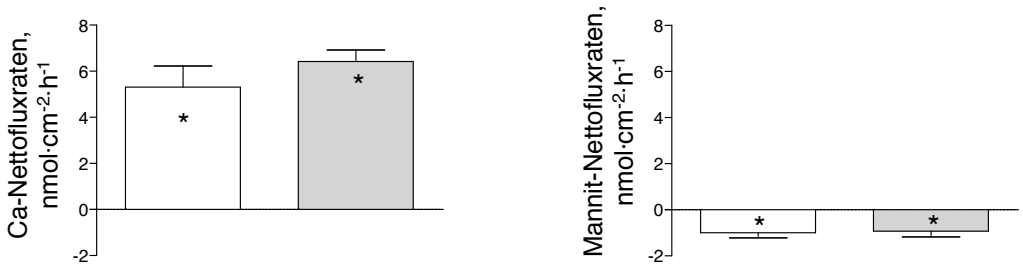

Abb. 4.15: Calcium- (Ca) und Mannit-Nettofluxraten im Pansen trockengestellter (weiße Säulen) und laktierender Schafe (hellgraue Säulen) (Mittelwerte ± SEM, n = 5); Ergebnisse des Mann-Whitney-Tests bzw. des Student's t-Tests; Sternchen innerhalb der Säulen stehen für signifikant von 0 verschiedene Fluxraten.

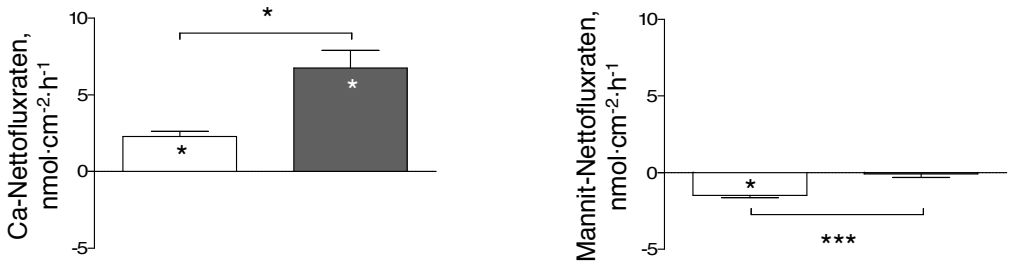

Abb. 4.16: Calcium- (Ca) und Mannit-Nettofluxraten im Pansen trockengestellter (weiße Säulen) und laktierender Ziegen (dunkelgraue Säulen) (Mittelwerte ± SEM, n = 6); Ergebnisse des Student's t-Tests (*: $P < 0{,}05$, ***: $P < 0{,}001$); Sternchen außerhalb der Säulen der Säulen stehen für signifikante Unterschiede der Fluxraten trockenstehender vs. laktierender Tiere; Sternchen innerhalb der Säulen stehen für signifikant von 0 verschiedene Fluxraten.

Tab. 4.8: Unidirektionale sowie Calcium- und Mannit-Nettofluxraten [nmol·cm^{-2}·h^{-1}] im Pansen trockengestellter und laktierender Schafe und Ziegen; J_{ms} = Fluxrate von mukosal nach serosal, J_{sm} = Fluxrate von serosal nach mukosal, J_{net} = Nettofluxrate; $J_{net} = J_{ms} - J_{sm}$; n.s. = nicht signifikant; signifikante von 0 verschiedene Fluxraten sind mit Sternchen markiert; Ergebnisse des Student's t-Tests.

[nmol·cm^{-2}·h^{-1}]			**trockengestellt**	**laktierend**	**Student's t-Test**
Schafe (n = 10)	**Calcium**	J_{ms}	6,72 ± 0,63*	8,30 ± 0,64*	n.s.
		J_{sm}	1,41 ± 0,31*	1,88 ± 0,24*	n.s.
		J_{net}	5,31 ± 0,91*	6,42 ± 0,50*	n.s.
	Mannit	J_{ms}	1,61 ± 0,40*	4,59 ± 1,02*	$P < 0,05$
		J_{sm}	2,60 ± 0,42*	5,54 ± 0,83*	$P < 0,05$
		J_{net}	-0,99 ± 0,23*	-0,95 ± 0,25*	n.s.
Ziegen (n = 12)	**Calcium**	J_{sm}	3,59 ± 0,29*	7,90 ± 1,04*	$P < 0,05$
		J_{sm}	1,31 ± 0,13*	1,15 ± 0,23*	n.s.
		J_{net}	2,28 ± 0,35*	6,75 ± 1,16*	$P < 0,05$
	Mannit	J_{ms}	2,64 ± 0,24*	1,69 ± 0,14*	$P < 0,01$
		J_{sm}	4,13 ± 0,34*	1,77 ± 0,21*	$P < 0,001$
		J_{net}	-1,49 ± 0,15*	-0,08 ± 0,24	$P < 0,001$

4.6. Einfluss der Laktation auf die mRNA-Expression Calcium-transportierender Strukturen

Mit Hilfe der TaqMan®-PCR (siehe 3.5.2) konnten die Transkripte für TRPV6 und PMCA quantifiziert werden. Eine Normalisierung ihrer Expression fand mit dem *Housekeeping gene* GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) statt (siehe auch 5.2.2).

4.6.1. Duodenum

Die für TRPV6 und PMCA codierenden Transkripte konnten im Duodenum beider Spezies nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.17). Die mRNA-Expression von PMCA blieb sowohl bei den Schafen als auch bei den Ziegen unverändert. Während bei den Schafen ebenfalls keine Veränderung der TRPV6-mRNA-Expression nachgewiesen werden konnte, war diese bei den laktierenden Ziegen im Vergleich zu den trockenstehenden Tieren signifikant erhöht. Des Weiteren fiel auf, dass bei den untersuchten Ziegen offenbar eine circa 10fach höhere mRNA-Expression von PMCA ermittelt werden konnte als bei den Schafen.

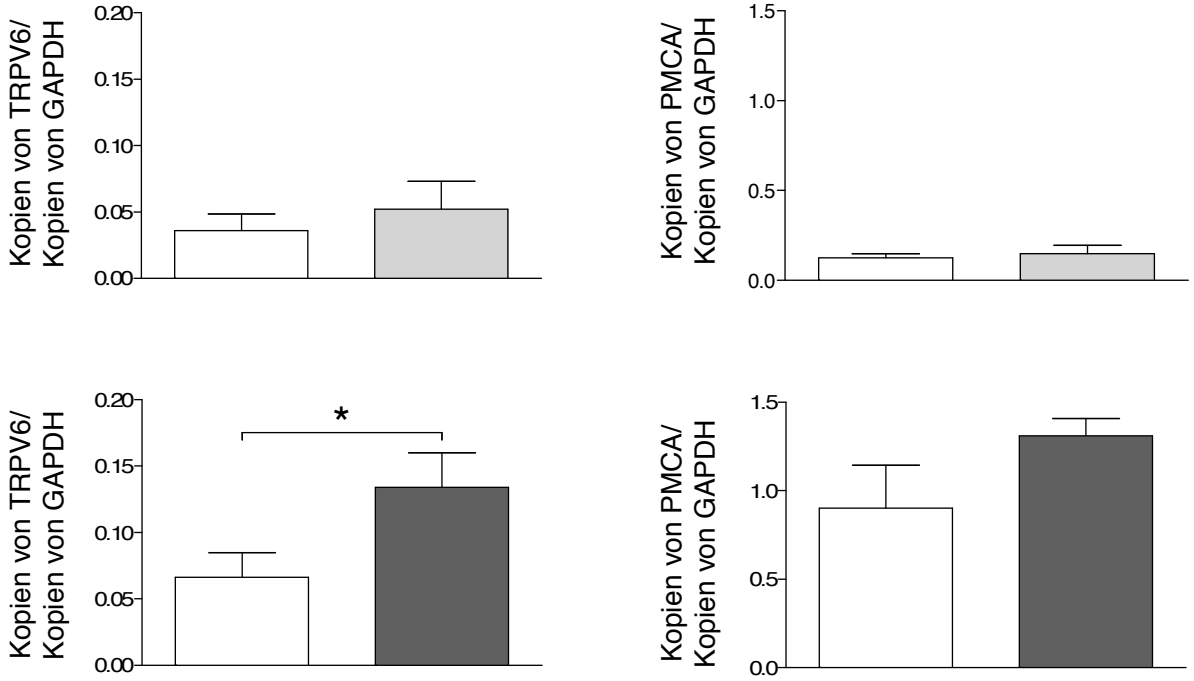

Abb. 4.17: Graphische Darstellung der mRNA-Expression von TRPV6 und PMCA relativ zur Expression von GAPDH im Duodenum von Schafen (oben) und Ziegen (unten) nach dem Trockenstellen (weiße Säulen) bzw. in der Laktation (hell- bzw. dunkelgraue Säulen) (Mittelwerte ± SEM, n_{Schafe} = 5, n_{Ziegen} = 6); Ergebnisse des Student's t-Tests bzw. des Mann-Whitney-Tests (*: $P < 0{,}05$).

4.6.2. Jejunum

Die mRNA-Expression von TRPV6 und PMCA im Jejunum trockengestellter und laktierender Schafe und Ziegen ist in Abb. 4.18 dargestellt.

Im Jejunum der trockengestellten und laktierenden Schafe konnte keine Veränderung der Expression der beiden Calcium-transportierenden Strukturen ermittelt werden. Dagegen war sowohl die mRNA-Expression von TRPV6 als auch die von PMCA der laktierenden Ziegen im Vergleich zu den trockengestellten Tieren signifikant erhöht. Wie auch im Duodenum konnte bei den laktierenden Ziegen eine deutlich höhere Expression von PMCA von in etwa dem 8fachen gegenüber den laktierenden Schafen nachgewiesen werden. Eine um das circa 20fach höhere

Expression von TRPV6 konnte dagegen bei den trockengestellten Schafen im Vergleich zu den trockengestellten Ziegen ermittelt werden.

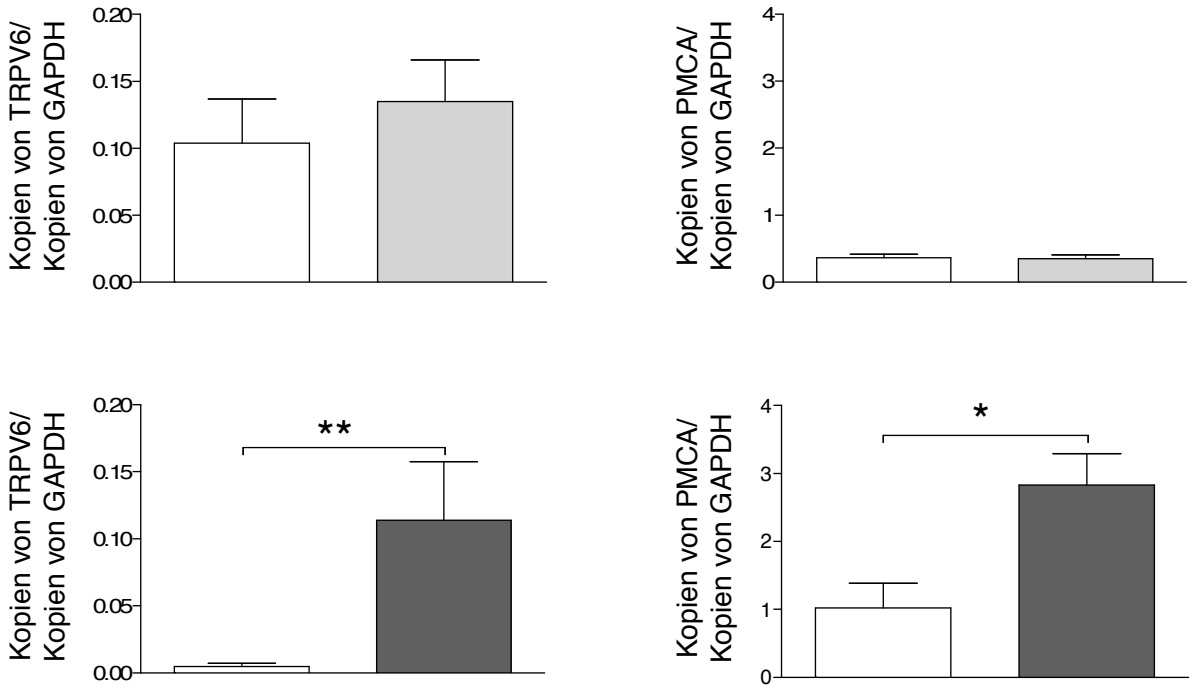

Abb. 4.18: Graphische Darstellung der mRNA-Expression von TRPV6 und PMCA relativ zur Expression von GAPDH im Jejunum von Schafen (oben) und Ziegen (unten) nach dem Trockenstellen (weiße Säulen) bzw. in der Laktation (hell- bzw. dunkelgraue Säulen) (Mittelwerte ± SEM, n_{Schafe} = 5, n_{Ziegen} = 6); Ergebnisse des Student's t-Tests bzw. des Mann-Whitney-Tests (*: $P < 0{,}05$; **: $P < 0{,}01$).

4.6.3. Colon

Die für TRPV6 und PMCA codierenden Transkripte konnten ebenfalls im Colon beider Spezies (siehe Abb. 4.19) nachgewiesen werden, allerdings traten keine Unterschiede zwischen laktierenden und trockengestellten Schafen und Ziegen auf. Des Weiteren fiel auf, dass bei den untersuchten Ziegen offenbar eine höhere mRNA-Expression von PMCA ermittelt werden konnte als bei den Schafen, wohingegen bei diesen Tieren die TRPV6-Expression höher zu sein schien.

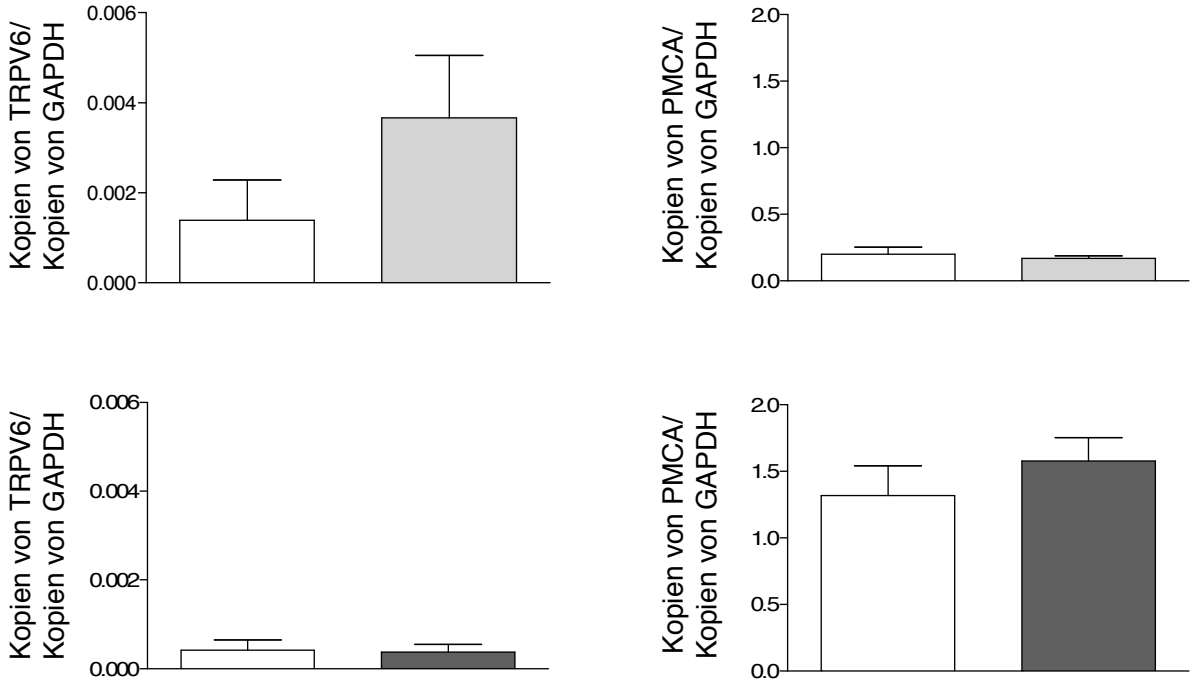

Abb. 4.19 Graphische Darstellung der mRNA-Expression von TRPV6 und PMCA relativ zur Expression von GAPDH im Colon von Schafen (oben) und Ziegen (unten) nach dem Trockenstellen (weiße Säulen) bzw. in der Laktation (hell- bzw. dunkelgraue Säulen) (Mittelwerte ± SEM, n_{Schafe} = 5, n_{Ziegen} = 6); Ergebnisse des Student's t-Tests bzw. des Mann-Whitney-Tests.

4.6.4. Pansen

Die mRNA-Expression von PMCA im Pansen konnte sowohl bei Schafen als auch bei Ziegen nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.20), ohne dass sich Unterschiede zwischen laktierenden und trockengestellten Tieren zeigten. Im Gegensatz zu der in allen Darmabschnitten ermittelten höheren Expression von PMCA bei den Ziegen unterschied sich diese im Pansen im Vergleich zu den Schafen nicht.

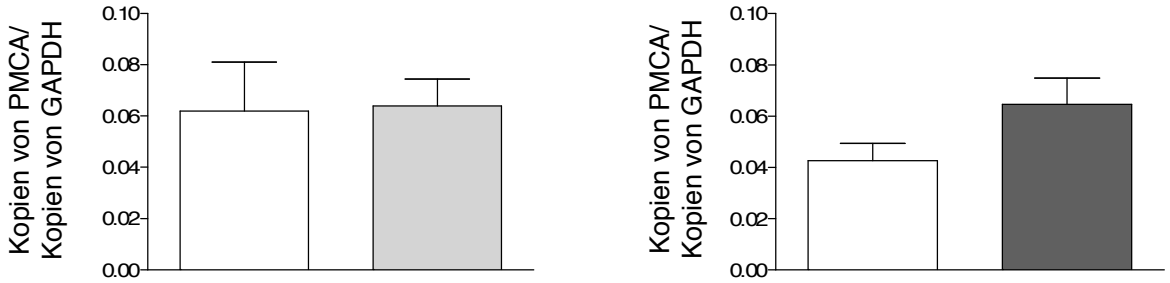

Abb. 4.20: Graphische Darstellung der mRNA-Expression von PMCA relativ zur Expression von GAPDH im Pansen von Schafen (links) und Ziegen (rechts) nach dem Trockenstellen (weiße Säulen) bzw. in der Laktation (hell- bzw. dunkelgraue Säulen) (Mittelwert ± SEM, $n_{Schafe} = 4$, $n_{Ziegen} = 6$); Ergebnisse des Student's t-Tests.

4.7. Nachweis und Quantifizierung spezifischer intestinaler Calcium-transportierender Strukturen sowie von NaPi-IIb auf Proteinebene

4.7.1. Nachweis der Calcium-transportierenden Strukturen sowie von NaPi-IIb

4.7.1.1. Nachweis von TRPV6

Die spezifische Bande von TRPV6 mit einer Höhe von circa 72 kDa konnte in allen Darmsegmenten von Schafen und Ziegen detektiert werden. Je eine Membran pro Spezies ist in Abbildung 4.21 exemplarisch dargestellt. Zur Normalisierung der TRPV6-Expression wurde auf der gleichen Membran durch eine zweite Antikörper-Inkubation die spezifische Bande für das Villin-Protein auf einer Höhe von 95 kDa detektiert (siehe auch 5.2.3).

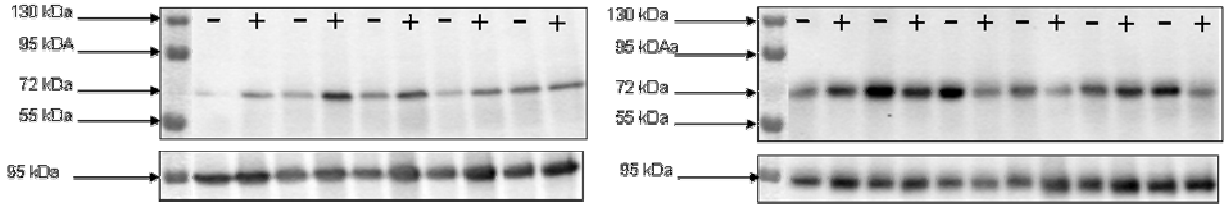

Abb. 4.21: Semiquantitativer Nachweis von TRPV6 mittels Western-Blot-Analyse: Jejunum trockengestellter (-) und laktierender (+) Schafe (links) und Ziegen (rechts) sowie der Nachweis von Villin (unterer Membranabschnitt); $n_{Schafe} = 10$, $n_{Ziegen} = 12$.

4.7.1.2. Nachweis von Calbindin-D_{9k}

Die spezifische Bande von Calbindin-D_{9k} mit einer Höhe von circa 9 kDa konnte im Duodenum und Jejunum (siehe Abb. 4.22), jedoch nicht im Colon und im Pansen (nicht dargestellt) beider Spezies detektiert werden.

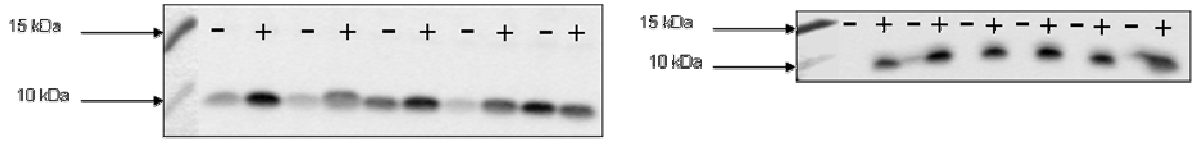

Abb. 4.22: Semiquantitativer Nachweis von Calbindin-D_{9k} mittels Western-Blot-Analyse: Jejunum trockengestellter (-) und laktierender (+) Schafe (links) und Ziegen (rechts), $n_{Schafe} = 10$, $n_{Ziegen} = 12$.

4.7.1.3. Nachweis von PMCA

Die Expression des in gastrointestinalen Gesamtmembranen lokalisierten PMCA-Proteins konnte bei beiden Spezies in Form zweier Antikörper-spezifischer Banden bei 80 kDa und 140 kDa im Darm (siehe Abb. 4.23) und einer Bande auf einer Höhe von 140 kDa im Pansen nachgewiesen werden (nicht dargestellt). Die optische Dichte beider Banden wurde bei der Auswertung addiert und nachfolgend mit Villin für die intestinalen Abschnitte und mit β-Actin für den Pansen normalisiert (siehe auch 5.2.3).

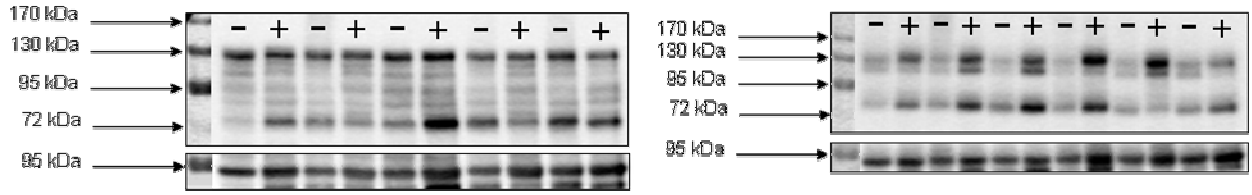

Abb. 4.23: Semiquantitativer Nachweis von PMCA mittels Western-Blot-Analyse: Jejunum trockengestellter (-) und laktierender (+) Schafe (links) und Ziegen (rechts) sowie der Nachweis von Villin (unterer Membranabschnitt), $n_{Schafe} = 10$, $n_{Ziegen} = 12$.

4.7.1.4. Nachweis von NaPi-IIb

Bei der Detektion des NaPi-IIb-Proteins konnte im Jejunum der Ziege (siehe Abb. 4.24) eine Bande auf einer Höhe zwischen 95 kDa und 100 kDa detektiert werden, welche in den übrigen Darmabschnitten und im Pansen nicht vorhanden war (siehe Abb. 4.25). Im Darm und im Pansen der Schafe konnte eine solche Bande nicht detektiert werden (nicht dargestellt). Eine Normalisierung fand mit dem internen Standard β-Actin, der sich auf einer Höhe zwischen 40 und 50 kDa befindet, statt (siehe Abb. 4.24). Eine Überprüfung der Spezifität mittel Antikörper-Blockade mit einem antigenen Peptid wurde nicht durchgeführt (siehe auch 5.2.3).

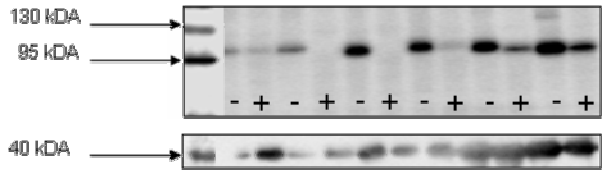

Abb. 4.24: Semiquantitativer Nachweis von NaPi-IIb mittels Western-Blot-Analyse: Jejunum trockengestellter (-) und laktierender (+) Ziegen sowie der Nachweis von β-Actin (unterer Membranabschnitt).

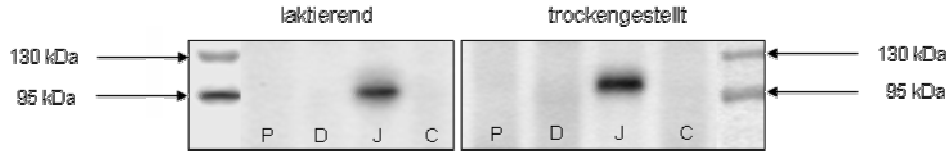

Abb. 4.25: Semiquantitativer Nachweis von NaPi-IIb mittels Western-Blot-Analyse: Gastrointestinale Achse (P = Pansen, D = Duodenum, J = Jejunum, C = Colon) laktierender (links) und trockengestellter (rechts) Ziegen.

4.7.2. Quantifizierung Calcium-transportierender Strukturen im Darm und im Pansen von laktierenden und trockengestellten Schafen und Ziegen sowie von NaPi-IIb im Jejunum der Ziegen

4.7.2.1. Duodenum

Die Protein-Expression der Calcium-transportierenden Strukturen im Duodenum laktierender Schafe und Ziegen in Relation zu den trockengestellten Tieren ist in Abb. 4.26 und Abb. 4.27 dargestellt.

Im Duodenum konnte bei den Schafen keine signifikante Veränderung der Protein-Expression Calcium-transportierender Strukturen nachgewiesen werden.

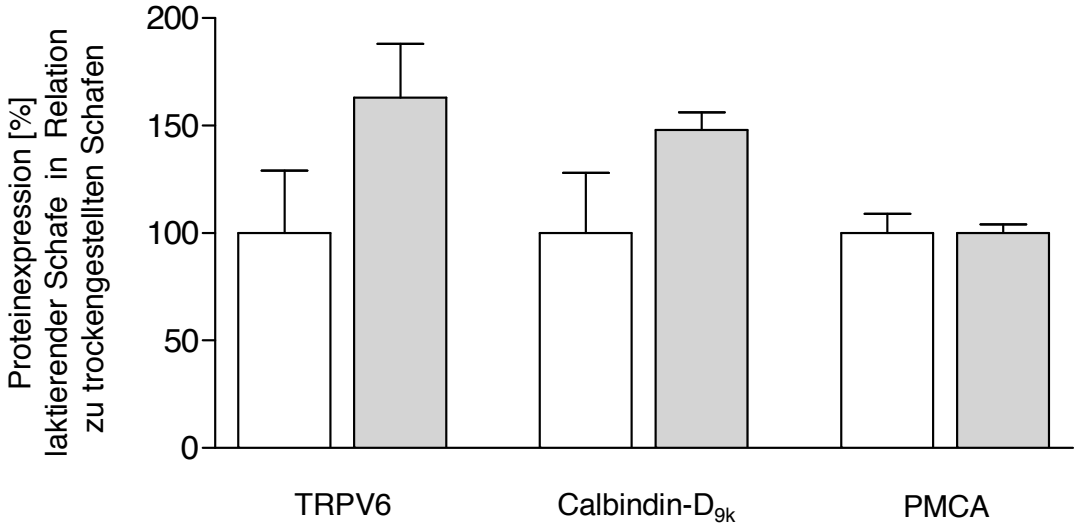

Abb. 4.26: Proteinexpression von TRPV6 und PMCA in Gesamtmembranen sowie von Calbindin-D_{9k} im Cytosol des Duodenums von trockengestellten (weiße Säulen) und laktierenden Schafen (hellgraue Säulen); die Mittelwerte der Expression der trockengestellten Schafe sind gleich 100% gesetzt und die Standardfehler beider Gruppen sowie die Expression der laktierenden Schafe in Relation zu diesen aufgetragen (Mittelwerte ± SEM, n = 5), Ergebnisse des Student's t-Tests.

Auch bei den laktierenden und trockengestellten Ziegen konnten im Duodenum keine Expressionsveränderungen der Calcium-transportierenden Strukturen nachgewiesen werden.

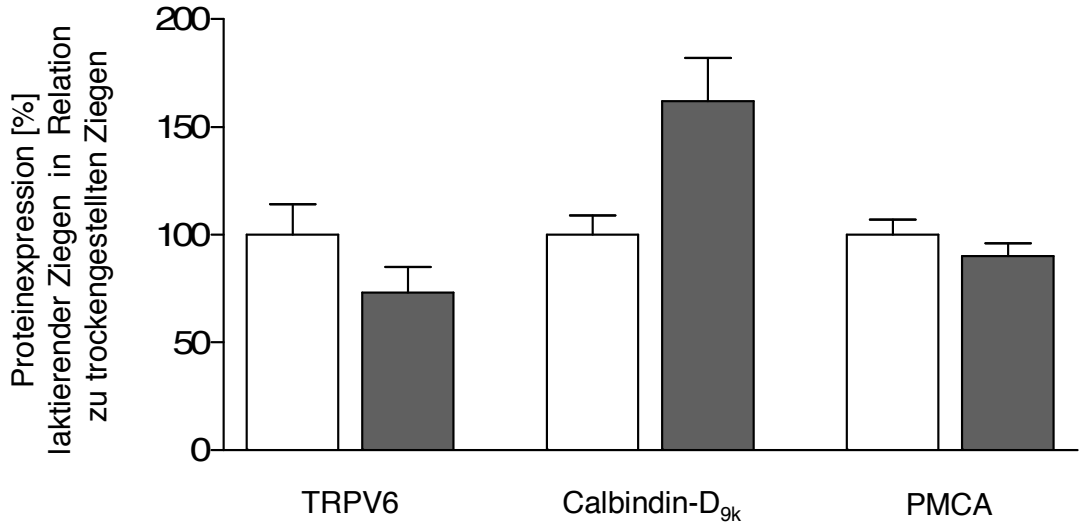

Abb. 4.27: Proteinexpression von TRPV6 und PMCA in Gesamtmembranen sowie von Calbindin-D_{9k} im Cytosol des Duodenums von trockengestellten (weiße Säulen) und laktierenden Ziegen (dunkelgraue Säulen); die Mittelwerte der Expression der trockengestellten Ziegen sind gleich 100% gesetzt und die Standardfehler beider Gruppen sowie die Expression der laktierenden Ziegen in Relation zu diesen aufgetragen (Mittelwerte ± SEM, n = 6), Ergebnisse des Student's t-Tests.

4.7.2.2. Jejunum

Die Protein-Expression der Calcium-transportierenden Strukturen im Jejunum laktierender Schafe und Ziegen sowie von NaPi-IIb im Jejunum der Ziegen in Relation zu den trockengestellten Tieren ist in Abb. 4.28 und Abb. 4.29 dargestellt.

Im Jejunum der trockengestellten und laktierenden Schafe war die Expression der Calcium-transportierenden Strukturen ebenfalls unverändert.

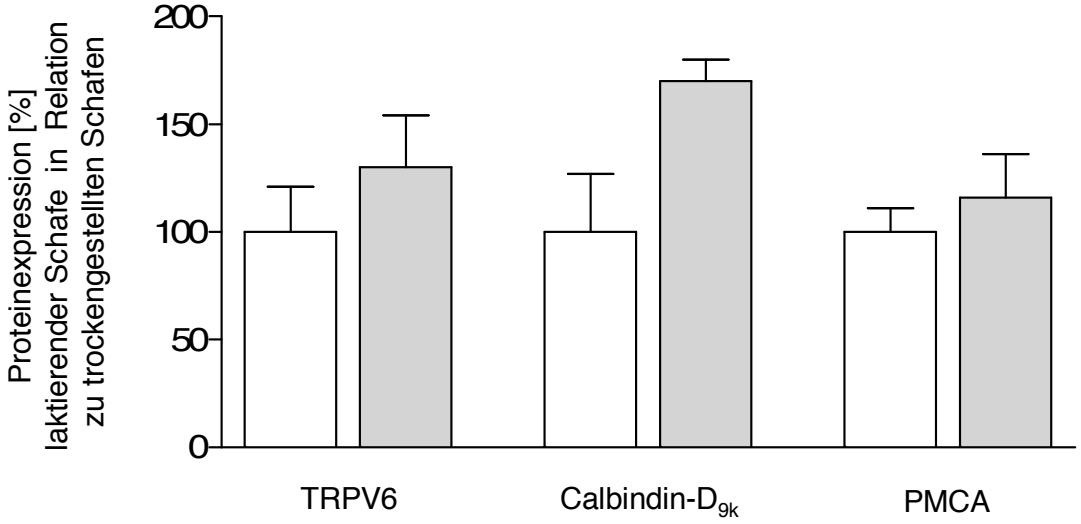

Abb. 4.28: Proteinexpression von TRPV6 und PMCA in Gesamtmembranen sowie von Calbindin-D_{9k} im Cytosol des Jejunums von trockengestellten (weiße Säulen) und laktierenden Schafen (hellgraue Säulen); die Mittelwerte der Expression der trockengestellten Schafe sind gleich 100% gesetzt und die Standardfehler beider Gruppen sowie die Expression der laktierenden Schafe in Relation zu diesen aufgetragen (Mittelwerte ± SEM, n = 5), Ergebnisse des Student's t-Tests bzw. des Mann-Whitney-Tests.

Im Gegensatz zu den Schafen konnte im Jejunum der Ziegen dagegen eine signifikante Steigerung der Protein-Expression von PMCA und vor allem von Calbindin-D_{9k} bei den laktierenden Ziegen im Vergleich zu den trockenstehenden Tieren nachgewiesen werden. Die Protein-Expression von TRPV6 blieb dagegen

unverändert. Die trockenstehenden Ziegen zeigten des Weiteren eine tendenziell erhöhte Expression des NaPi-IIb-Proteins.

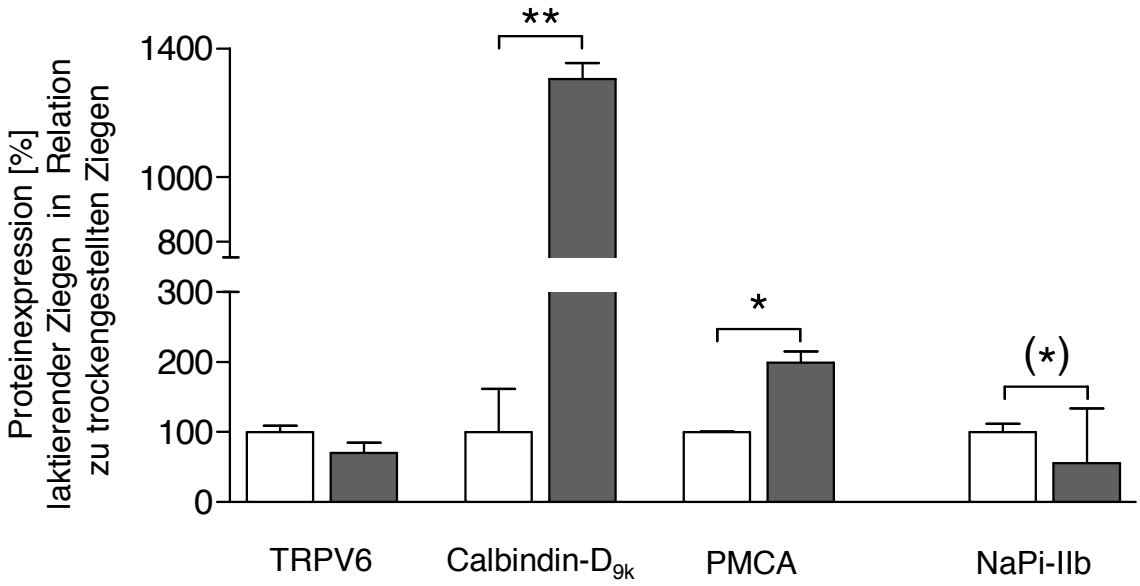

Abb. 4.29: Proteinexpression von TRPV6 und PMCA in Gesamtmembranen sowie von Calbindin-D_{9k} im Cytosol und von NaPi-IIb in Bürstensaummembranen des Jejunums von trockengestellten (weiße Säulen) und laktierenden Ziegen (dunkelgraue Säulen); die Mittelwerte der Expression der trockengestellten Ziegen sind gleich 100% gesetzt und die Standardfehler beider Gruppen sowie die Expression der laktierenden Ziegen in Relation zu diesen aufgetragen (Mittelwerte ± SEM, n = 6); Ergebnisse des Mann-Whitney-Tests ((*): $P < 0{,}1$, **: $P < 0{,}01$); Ergebnisse des Student's t-Tests (*: $P < 0{,}05$).

4.7.2.3. Colon

Die Protein-Expression der Calcium-transportierenden Strukturen im Colon laktierender Schafe und Ziegen in Relation zu den trockengestellten Tieren ist in Abb. 4.30 dargestellt.

Im Colon beider Spezies konnten keine Veränderungen der Protein-Expression von TRPV6 und PMCA nachgewiesen werden.

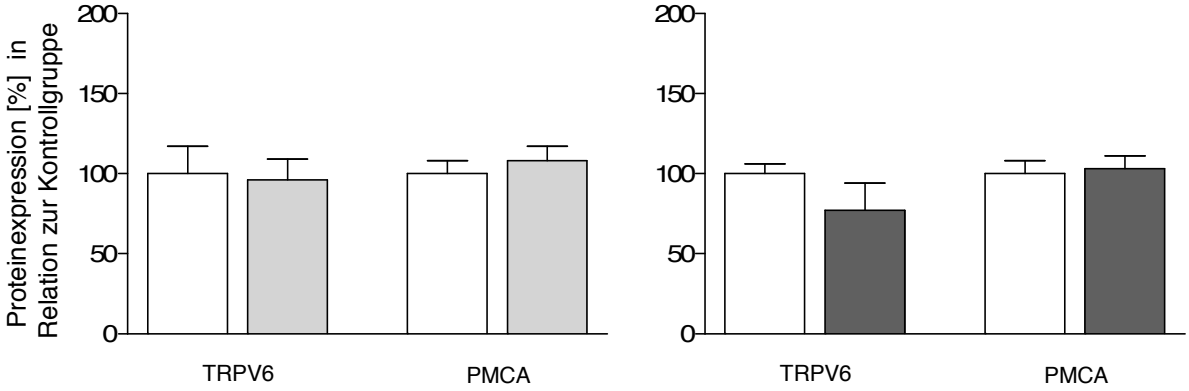

Abb. 4.30: Proteinexpression von TRPV6 und PMCA in Gesamtmembranen des Colons von trockengestellten (weiße Säulen) und laktierenden Schafen (hellgraue Säulen) (links) und Ziegen (dunkelgraue Säulen) (rechts); die Mittelwerte der Expression der trockengestellten Schafe und Ziegen sind gleich 100% gesetzt und die Standardfehler beider Gruppen sowie die Expression der laktierenden Schafe und Ziegen in Relation zu diesen aufgetragen (Mittelwerte ± SEM, n_{Schafe} = 5, n_{Ziegen} = 6); Ergebnisse des Student's t-Tests.

4.7.2.4. Pansen

Die Protein-Expression von PMCA im Pansen von Schafen und Ziegen (siehe Abb. 4.31) zeigte keinen Unterschied zwischen trockengestellten und laktierenden Tieren.

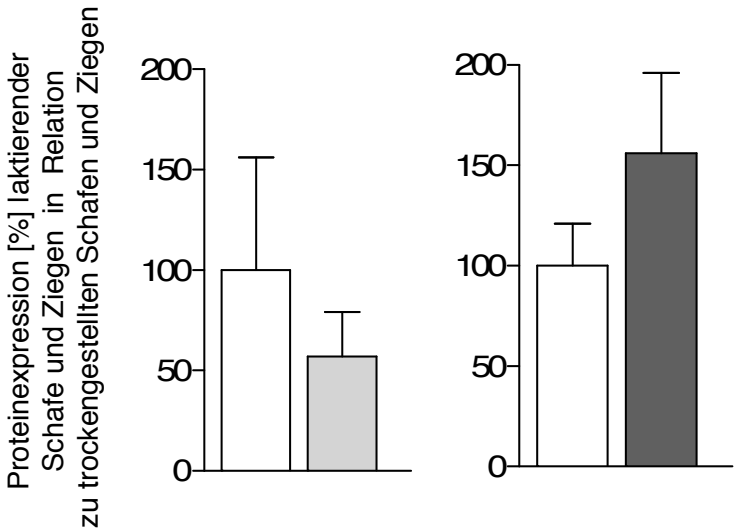

Abb. 4.31: Proteinexpression von PMCA in Gesamtmembranen des Pansens von trockengestellten (weiße Säulen) und laktierenden Schafen (hellgraue Säule) (links) und Ziegen (dunkelgraue Säule) (rechts); die Mittelwerte der Expression der trockengestellten Schafe und Ziegen sind gleich 100% gesetzt und die Standardfehler beider Gruppen sowie die Expression der laktierenden Schafe und Ziegen in Relation zu diesen aufgetragen (Mittelwerte ± SEM, $n_{Schafe} = 5$, $n_{Ziegen} = 6$); Ergebnisse des Student's t-Tests.

5 Diskussion

5.1. Beurteilung des Versuchsdesigns

Zur Gewährleistung eines möglichst hohen laktationsbedingten Calcium-Verlusts durch die Sekretion von Calcium in das Kolostrum bzw. in die Milch wurde mit der Auswahl von sowohl einer Milchschaf- als auch einer Milchziegenrasse und durch eine entsprechende Melkfrequenz (siehe 3.1.2) eine möglichst hohe Milchleistung sichergestellt. Im Vergleich mit einer Studie an circa 2000 deutschen Edelziegen, in der eine durchschnittliche Milchleistung von 2,87 ± 1,2 kg Milch·Tag^{-1} angegeben wurde (BÖMKES 2003), ist die Milchleistung der hier verwendeten Ziegen mit 4,22 ± 0,31 kg Milch·Tag^{-1} an Tag 20 der Laktation als relativ hoch einzuschätzen. Die Milchleistung der Schafe hingegen liegt mit 2,71 ± 0,15 kg Milch·Tag^{-1} im selben Zeitraum in einem vergleichsweise normalen Bereich (HAMANN et al. 2004). Aufgrund ihres unterschiedlichen Alters (siehe 3.1.1) befanden sich die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Schafe und Ziegen nicht in derselben Laktationsnummer. In diesem Zusammenhang konnten Liesegang et al. (2007b) an laktierenden Schafen und Ziegen zeigen, dass im Vergleich zur ersten Laktation eine effizientere Anpassung des Skelettsystems an den erhöhten Calcium-Bedarf in der zweiten Laktation trotz einer vergleichsweise höheren Milchleistung erfolgte. Möglicherweise könnte sich daher der erwähnte Altersunterschied der verwendeten Schafe im Vergleich zu den Ziegen ebenfalls auf die Anpassung an einen erhöhten Calcium-Bedarf in der Laktation auswirken.

Zur Sicherstellung einer Calcium- und Phosphat-adäquaten Ernährung erhielten die Tiere eine an ihren jeweiligen Leistungsbedarf angepasste Fütterung (siehe 3.1.2).

5.2. Beurteilung der angewandten Methoden

5.2.1. Ussingkammer-Technik

Für eine aussagekräftige Darstellung der Calcium- und Phosphat-Bewegungen ist die Erhaltung eines funktionsfähigen Epithels ausschlaggebend. Rückschlüsse auf die intakte Integrität sowie Vitalität der gastrointestinalen Präparationen konnten unter anderem anhand der erfassten Gewebeleitfähigkeiten sowie der Kurzschlussströme gemacht werden (siehe 4.5.1).

Als weitere Vitalitätskontrolle diente für das Darm- und das Pansenepithel die Zugabe von Forskolin bzw. Ouabain. Die in Abschnitt 3.3.2.3 erläuterte Wirkungsweise dieser beiden Substanzen konnte bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten intestinalen Epithelien bzw. beim Pansenepithel sowohl der Schafe als auch der Ziegen beobachtet werden. Somit ist anzunehmen, dass alle Epithelien bis zum Ende des Versuchs funktionsfähig waren.

Neben den unidirektionalen Calcium- und Phosphat-Fluxraten wurde ebenfalls der Transport von Mannit über das gastrointestinale Epithel bestimmt. Durch seinen nachweislich passiven Transport (DAWSON 1979; SCHRÖDER et al. 1997) wird es üblicherweise als Marker für den parazellulären Transport eingesetzt.

5.2.2. Quantitative RT-PCR

Mit Hilfe der TaqMan®-PCR wurde der Effekt der Laktation auf die mRNA-Expression von TRPV6 und PMCA bei den Schafen und Ziegen quantitativ erfasst. Zur Normalisierung der intestinalen TRPV6- und gastrointestinalen PMCA-Expression wurde das *Housekeeping gene* GAPDH, welches als Enzym der Glykolyse in nahezu konstanter Menge in den verschiedenen Geweben unterschiedlicher Spezies vorkommt (REIST et al. 2003), eingesetzt. Da sich die Expression von GAPDH sowohl bei den Schafen als auch bei den Ziegen nicht signifikant zwischen

trockengestellten und laktierenden Tieren unterschied (nicht dargestellt), liegt die Vermutung nahe, dass die Laktation keinen Effekt auf die GAPDH-Expression hatte, so dass infolge dessen der Einsatz als interner Standard möglich war.

5.2.3. Western-Blot-Analyse

Der Einfluss der Laktation auf die Calcium-transportierenden Strukturen sowie auf die Expression von NaPi-IIb wurde auf Protein-Ebene mit Hilfe der semiquantitativen Western-Blot-Analyse erfasst. Es wurden immer nur Banden einer Membran miteinander verglichen, da diese unter den gleichen Bedingungen erzeugt wurden. Eine Normalisierung fand mit den internen Standards Villin und β-Actin statt. Letzteres wurde bei der Detektion von NaPi-IIb im Jejunum der Ziegen (siehe 4.7.1.4) eingesetzt, da aufgrund der Nähe der Villin-Bande zu der dort detektierten Bande keine exakte Trennung und damit auch keine genaue Vermessung der einzelnen Bande vorgenommen werden konnte. Aufgrund der schlechten Darstellbarkeit von Villin in Präparationen des Pansens, fand eine Normalisierung der ruminalen PMCA-Expression ebenfalls mittels β-Actin statt. Da sich Hinweise darauf ergeben haben, dass der β-Actin-Nachweis schon bei einer Proteinmenge von weniger als 15 μg nicht mehr linear verläuft und daher bei den verwendeten Proteinmengen von 40 μg bzw. 50 μg nicht exakt genug ist Unterschiede der Proteinbeladung zu detektieren (DITTMER u. DITTMER 2006), wurde aufgrund dessen beim Nachweis von TRPV6 sowie PMCA im Darm Villin als interner Standard verwendet. Durch die Normalisierung mit β-Actin konnte bei der Detektion von NaPi-IIb im Jejunum der Ziegen ein zuvor ohne Normalisierung ermittelter signifikanter Unterschied zwischen trockengestellten und laktierenden Tieren nur noch tendenziell nachgewiesen werden. Die Ergebnisse des PMCA-Nachweises im Pansen beider Spezies blieben von der β-Actin-Normalisierung unbeeinflusst. Da sowohl Villin (BRETSCHER u. WEBER 1979) als auch β-Actin (HOOCK et al. 1991) als Strukturproteine der Zellmembranen nicht im Cytoplasma vorkommen, wurde im Fall der Calbindin-D_{9k}-Detektion kein interner Standard verwendet und die Expression bezogen auf die aufgetragene Proteinmenge (siehe Tab. 3.7) ermittelt.

Bei der Detektion von TRPV6 fiel auf, dass die auf mRNA-Ebene nachgewiesene erhöhte Expression von TRPV6 im Duodenum und Jejunum laktierender Ziegen (siehe 4.6.1 und 4.6.2) nicht mit einer entsprechenden Veränderung auf Protein-Ebene (siehe 4.7.2.1 und 4.7.2.2) einherging. Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Antikörper wurde aus dem Kaninchen generiert und ist gegen das C-terminale Ende des TRPV6-Proteins gerichtet. Ein ebenfalls gegen die letzten 19 Aminosäuren des C-terminalen Endes von TRPV6 gerichteter Antikörper wurde von ZHUANG et al. (2002) an humanen embryonalen Nierenzellen verwendet. Neben einer Bande bei 86 kDa, welche vermutlich einer glykosylierten Form von TRPV6 entspricht (HOENDEROP et al. 2003), wurde dabei außerdem eine weitere Bande mit einer Höhe von 160 kDa nachgewiesen. Das entsprechende Protein wurde als *Early endosomal antigen 1* (EEA 1) identifiziert, welches im Cytosol und in den Zellmembranen vorkommt. Da bei diesem Protein keine TRPV6-ähnlichen Sequenzen nachgewiesen werden konnten, ist die Ursache für die Kreuzreaktion mit TRPV6 bisher unklar. Die nicht exakte Spezifität des im Rahmen dieser Arbeit verwendeten TRPV6-Antikörpers könnte möglicherweise eine Erklärung für die nicht zu der TRPV6-mRNA-Expression passenden Ergebnisse der Western-Blot-Analyse sein. Fraglich bleibt hierbei allerdings, ob das EEA 1 aufgrund seiner wesentlich höher gelegenen Bande verantwortlich für eine Störung des TRPV6-Nachweises sein kann. Als eine weitere zugrunde liegende Ursache könnte auch eine Beeinflussung durch die Membranpräparation (siehe 3.4.3) in Betracht gezogen werden.

Bei der Detektion des PMCA-Proteins wurden analog zu früheren Untersuchungen (MROCHEN 2010) zwei dominante Banden auf einer Höhe von 140 kDa bzw. 80 kDa ermittelt sowie mehrere schwächere Banden in dem zwischen den beiden Banden gelegenen Bereich (siehe Abb. 4.23). Mit Hilfe einer spezifischen Antikörper-Blockade konnte bereits die Spezifität beider Banden für PMCA bestätigt werden (MROCHEN 2010). Wie auch schon von BORKE et al. (1990) und MROCHEN (2010) vermutet, könnten die 80 kDa-Bande sowie die detektierten diffusen Banden durch eine enzymatische proteolytische Degradation entstanden sein. Diese Hypothese kann dadurch untermauert werden, dass im Colon, in dem sich vergleichsweise weniger proteolytische Enzyme befinden, die 80 kDa-Bande weniger

ausgeprägt war und die diffusen Banden zwischen 80 kDa und 140 kDa nicht detektierbar waren. Entsprechend den Angaben von MROCHEN (2010) konnte auch bei der hier vorliegenden Arbeit im Pansen, in welchem sich keine entsprechenden Enzyme befinden, nur die 140 kDa-Bande detektiert werden.

Bei der Detektion des NaPi-IIb-Proteins konnte im Jejunum der Ziegen eine Bande (siehe Abb. 4.25) nachgewiesen werden, die in etwa in dem Bereich lag, der bei vorangegangenen Detektionen für NaPi-IIb angegeben wurde (MUSCHER 2006). Da jedoch bis zu diesem Zeitpunkt kein antigenes Peptid vorlag, konnte keine spezifische Antikörper-Blockade durchgeführt werden, um die beschriebene detektierte Bande eindeutig dem NaPi-IIb-Protein zuzuordnen. Bisher wurde davon ausgegangen, dass bei der Ziege NaPi-IIb nur im Jejunum exprimiert wird (HUBER et al. 2002), während für das Schaf bisher noch keine entsprechenden Daten über den Nachweis von NaPi-IIb im Dünndarm vorliegen. Daher müssen die ermittelten Expressionsdaten unter kritischem Vorbehalt interpretiert werden.

5.3. Effekt der Geburt, des Einsetzens der Laktation und des Trockenstellens auf die die Calcium-Homöostase beschreibenden Vollblut- bzw. Plasmaparameter

Bei der ermittelten und auf das Körpergewicht korrigierten Milchleistung von 0,026 ± 0,003 $l \cdot kg^{-1}$ KGW am Beginn der Laktation wurde bei den in dieser Arbeit verwendeten laktierenden Schafen mit einem mittleren Körpergewicht von 66,3 ± 1,6 kg, ausgehend von einer Sekretion von etwa 5,5 g $Calcium \cdot l^{-1}$ (CSAPÓ et al. 1994), vermutlich circa 0,14 g $Calcium \cdot kg^{-1}$ KGW in das Kolostrum sezerniert. Dem gegenüber verloren die laktierenden Ziegen trotz eines ähnlichen Milchleistungsniveaus am Beginn der Laktation von etwa 0,032 ± 0,002 $l \cdot kg^{-1}$ KGW und eines geringeren Körpergewichts von im Mittel 49,13 ± 1,68 kg durch die höhere Konzentration von Calcium im Kolostrum (~ 7,5 g $Calcium \cdot l^{-1}$) (CSAPÓ et al. 1994) vermutlich circa 0,24 g $Calcium \cdot kg^{-1}$ KGW mit Einsetzen der Laktation. Dieser Verlust von Calcium nach der Geburt und in der sich anschließenden Laktation wirkte sich unterschiedlich auf die die Calcium-Homöostase beschreibenden Vollblut- und Plasmaparameter der Schafe und Ziegen aus.

Trotz des durch die einsetzende Laktation im Vergleich zur Trächtigkeit gesteigerten maternalen Calcium-Bedarfs blieben die im Vollblut bzw. im Blutplasma laktierender Schafe ermittelten Konzentrationen von Ca^{2+} und Ca_t während des gesamten Versuchszeitraumes mit im Mittel 1,21 ± 0,02 $mmol \cdot l^{-1}$ bzw. 2,28 ± 0,9 $mmol \cdot l^{-1}$ zwar in dem von KRAFT und DÜRR (1999) für das Schaf angegebenen Referenzbereich (2,1 – 2,7 $mmol \cdot l^{-1}$), jedoch eher in einem, im Vergleich zu in vorangegangenen Studien an Schafen ermittelten Werten, unteren physiologischen Bereich. Höhere Ca_t-Konzentrationen von im Mittel 2,54 ± 0,03 $mmol \cdot l^{-1}$ konnten von LIESEGANG et al. (2008) bei laktierenden Schafen peripartal und in der Laktation nachgewiesen werden. Analog zu der hier vorliegenden Arbeit konnten in der Studie von LIESEGANG et al. (2008) ebenfalls keine signifikanten Veränderungen der Ca_t-Konzentrationen vor, während und nach der Geburt beobachtet werden. Ähnlich

niedrige Konzentrationen von Ca^{2+} und Ca_t, wie sie bei den hier verwendeten laktierenden Schafen erreicht wurden, konnten von WILKENS et al. (2010) bei 4 bis 8 Wochen Calcium-restriktiv gefütterten, nicht-laktierenden, wachsenden Schafen nachgewiesen werden (Ca^{2+}: 1,19 ± 0,02 mmol·l^{-1}; Ca_t: 2,37 ± 0,04 mmol·l^{-1}). Aufgrund dieses Vergleichs kann angenommen werden, dass sowohl die Trächtigkeit als auch der Beginn der Laktation ähnlich einer alimentären Calcium-Restriktion zu einer Belastung des Calcium-Haushaltes der laktierenden Schafe geführt hat. Dabei war möglicherweise der Calcium-Bedarf schon in der späten Trächtigkeit als Folge der Mineralisierung des fetalen Skeletts bei den Schafen erhöht, so dass die Konzentrationen von Ca^{2+} und Ca_t bereits vor Entnahme der ersten Blutprobe 10 Tage a.p. abgesunken waren. Dieser Zeitraum ist beim Schaf typischerweise mit der Entwicklung einer Hypocalcämie assoziiert (OETZEL 1988). Einschränkend kann ein Vergleich der Studie von WILKENS et al. (2010) mit der hier vorliegenden Arbeit aufgrund des unterschiedlichen Alters der verwendeten Tiere allerdings nur unter Vorbehalt erfolgen.

Jedoch sprechen für einen bereits in der späten Trächtigkeit erhöhten Bedarf an Calcium die im Blutplasma von trächtigen bzw. laktierenden Schafe ermittelten Konzentrationen des Knochenresorptionsmarkers CrossLaps®. Diese blieben zwar während der gesamten peripartalen Periode mit im Mittel 2,69 ± 0,20 ng·ml^{-1} unverändert, jedoch waren sie gegenüber den ermittelten Konzentrationen in vorangegangenen Studien an Schafen, deren Calcium-Verlust ebenfalls durch die Laktation gesteigert war, deutlich erhöht. So konnte in einer Studie von LIESEGANG et al. (2006) an laktierenden Schafen, die mit einem hohen Gehalt an alimentärem Calcium versorgt wurden, a.p. gemessene CrossLaps®-Konzentrationen zwischen 1,0 – 1,8 ng·ml^{-1} ermittelt werden. Auch hier ist jedoch ein Vergleich der im Rahmen dieser Arbeit ermittelten CrossLaps®-Plasma-Konzentrationen mit denen, die in der oben erwähnten Studie gemessen wurden, aufgrund diverser Störfaktoren wie beispielsweise eine andere Fütterung der verwendeten Tiere oder die Nutzung eines anderen Test-Kits zur Ermittlung der CrossLaps®-Konzentrationen nur bedingt möglich. Ebenfalls muss als weitere Ursache für die in der Laktation unveränderten CrossLaps®-Konzentrationen der Schafe im Vergleich zu den Ziegen ein möglicher

Einfluss der hohen Varianz der ermittelten Werte (siehe 4.2.2) in Betracht gezogen werden.

Für bereits vor der Geburt erhöhte CrossLaps®-Plasma-Konzentrationen bei den laktierenden Schafen sprechen jedoch auch die entsprechenden bei den trockengestellten Schafen ermittelten Werte. So zeigten diese Tiere bereits vor dem Trockenstellen vergleichsweise niedrigere CrossLaps®-Plasma-Konzentrationen von 1,51 ± 0,35 $ng \cdot ml^{-1}$. Nach der sich anschließenden 7wöchigen Trockenstehzeit konnte ein weiteres Absinken der CrossLaps®-Plasma-Konzentrationen auf 0,82 ± 0,23 $ng \cdot ml^{-1}$ ($P < 0,05$) ermittelt werden. Somit ist es als sehr wahrscheinlich anzusehen, dass die Plasma-CrossLaps®-Konzentrationen der trächtigen bzw. laktierenden Schafe bereits in der späten Trächtigkeit sowie nachfolgend im peripartalen Zeitraum und am Beginn der Laktation erhöht waren. Diese Ergebnisse deuten auf eine bereits vor der Geburt, vermutlich aufgrund des erhöhten Calcium-Bedarfs, gesteigerten Resorption von Calcium aus dem Knochen hin.

Dazu passen auch die bei den laktierenden Schafen in der ersten Laktationswoche (Tag 6) gegenüber der Geburt ermittelten signifikant erhöhten Plasma-Konzentrationen von P_i (1,07 ± 0,08 $mmol \cdot l^{-1}$ vs. 2,04 ± 0,30 $mmol \cdot l^{-1}$; $P < 0,05$), welches wahrscheinlich aufgrund des gemeinsamen Vorliegens von Calcium und Phosphat als Hydroxylapatit zusammen mit Calcium aus dem Knochen mobilisiert wurde.

Die signifikante Steigerung der OC-Plasma-Konzentrationen von circa 15,51 ± 2,65 $ng \cdot ml^{-1}$ im peripartalen Zeitraum auf 35,73 ± 6,16 $ng \cdot ml^{-1}$ ($P < 0,001$) 21 Tage p.p. deutet auf den Beginn der Wiederherstellung der skelettalen Ressourcen in der Laktation durch erhöhte Knochenformation hin, welche bereits in Bilanzversuchen an laktierenden Schafen von BRAITHWAITE et al. (1970) beschrieben wurde.

Die Konzentrationen von Calcitriol blieben bei den laktierenden Schafen trotz wahrscheinlich verringerter Calcium-Plasma-Konzentrationen mit 13,05 ± 0,74 $pg \cdot ml^{-1}$ während des gesamten Versuchszeitraumes unbeeinflusst und

auf dem Level der in trockenstehenden Schafen ermittelten Konzentrationen (13,36 ± 3,35 pg·ml^{-1}). Auch PAULSON und LANGMAN (1990) konnten in einer Studie an trächtigen Schafen keinen Anstieg der Calcitriol-Plasma-Konzentrationen nach der Geburt nachweisen. Ein durch eine alimentäre Calcium-Restriktion induzierter erhöhter Calcium-Bedarf hatte in einer Studie von WILKENS et al. (2010) an wachsenden Schafen nur einen geringen Anstieg der Calcitriol-Konzentrationen im Plasma zur Folge, wohingegen bei Calcium-restriktiv ernährten, wachsenden Ziegen ein stärkerer Effekt auf die Calcitriol-Plasma-Konzentrationen beobachtet werden konnte (WILKENS et al. 2012). Aufgrund dessen bleibt es fraglich, ob bei Schafen eine erhöhte Calcitriol-Synthese unter physiologischen Bedingungen als Adaptation an den in der Trächtigkeit und der Laktation erhöhten Calcium-Bedarf erfolgt.

Als Folge des erhöhten Calcium-Bedarfs konnte im Unterschied zu den Schafen bei den trächtigen bzw. laktierenden Ziegen ein signifikanter Abfall der Ca^{2+}-Vollblut-Konzentrationen im Vergleich zu den a.p. ermittelten Werten (1,32 ± 0,02 mmol·l^{-1}) um circa 11% zum Zeitpunkt der Geburt (1,18 ± 0,04 mmol·l^{-1}; $P < 0,05$) nachgewiesen werden. Innerhalb von 12 Stunden p.p. stiegen die Ca^{2+}-Konzentrationen wieder auf 1,26 ± 0,05 mmol·l^{-1} an. Im Gegensatz dazu blieben die Konzentrationen von Ca_t im Blutplasma während des gesamten Versuchszeitraumes mit im Mittel 2,46 ± 0,02 mmol·l^{-1} unverändert. Fraglich ist hierbei, warum die Abnahme der Ca^{2+}-Konzentrationen nicht mit entsprechend gesenkten Ca_t-Konzentrationen einhergegangen ist, da zwischen Ca_t und Ca^{2+} üblicherweise eine positive lineare Korrelation besteht, bei der Ca^{2+} circa 50-55% vom Ca_t ausmacht. Eine Verschiebung dieses Verhältnisses konnte bereits in Studien von NORRIS et al. (2001) an Calcium-restriktiv ernährten, wachsenden Kaninchen beobachtet werden, bei denen jedoch die Ca_t-Konzentrationen bei gleich bleibenden Ca^{2+}-Konzentrationen abnahmen. Eine mögliche Ursache dieses Phänomens könnte möglicherweise in einer unterschiedlichen Sensitivität der zur Messung der jeweiligen Parameter verwendeten Methoden (siehe 3.2.1.1 und 3.2.1.2) liegen.

Infolge der zur Geburt sinkenden Ca^{2+}-Plasma-Konzentrationen sollte es zu einer vermehrten Freisetzung von PTH kommen, welches nicht nur die Mobilisation von Calcium und Phosphat aus dem Knochen fördert, sondern weiterhin durch Stimulation der renalen 1α-Hydroxylase für eine gesteigerte Synthese von Calcitriol verantwortlich ist (siehe auch 2.4.1). Tatsächlich konnte bei den Ziegen parallel zum Absinken der Ca^{2+}-Konzentrationen ein Anstieg der Calcitriol-Plasma-Konzentrationen ausgehend von 16,37 ± 2,49 $pg \cdot ml^{-1}$ auf 24 ± 2,82 $pg \cdot ml^{-1}$ ($P < 0,05$) nachgewiesen werden. Ein ähnlicher Verlauf wurde bereits in der erwähnten Studie an laktierenden Ziegen und auch, im Gegensatz zu den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit, an laktierenden Schafen von LIESEGANG et al. (2006) gezeigt.

Neben der genomischen Wirkungsweise von Calcitriol auf die Expression der intestinalen Calcium-transportierenden Strukturen (siehe 5.4) steht zunächst die unmittelbare Wirkung auf das Skelettsystem im Vordergrund. So deuten die bei den laktierenden Ziegen 1 bis 2 Tage p.p. signifikant gesteigerten CrossLaps®-Konzentrationen im Plasma von 0,83 ± 0,14 $ng \cdot ml^{-1}$ auf 1,28 ± 0,21 $ng \cdot ml^{-1}$ ($P < 0,01$) auf eine vermutlich PTH- sowie Calcitriol-induzierte Resorption von Calcium aus dem Knochen als Folge des erhöhten Calcium-Bedarfs hin. Die in demselben Zeitraum (Tag 0 bis Tag 2) verringerten OC-Konzentrationen sprechen für eine gleichzeitig verringerte Knochenformation. Als Folge der gesteigerten Resorption von Calcium aus dem Skelettsystem konnte, vermutlich durch die simultane Mobilisation von Phosphat gemeinsam mit Calcium aus dem Knochen, ein damit einhergehender signifikanter Anstieg der Konzentrationen von P_i im Plasma von 1,07 ± 0,09 $mmol \cdot l^{-1}$ zum Zeitpunkt der Geburt auf 2,55 ± 0,55 $mmol \cdot l^{-1}$ (Tag 8: $P < 0,01$) bzw. 2,69 ± 0,48 $mmol \cdot l^{-1}$ (Tag 10: $P < 0,001$) nach der ersten Laktationswoche beobachtet werden.

Vermutlich aufgrund dieser nach der Geburt einsetzenden Adaptationsmechanismen im Skelettsystem kommt es bei den laktierenden Ziegen innerhalb von 12 Stunden zu einer Normalisierung der Ca^{2+}-Konzentrationen im Plasma. Das Ansteigen der OC-Konzentrationen ab Tag 2 p.p. auf in etwa die *ante partal* gemessenen Werte sowie die simultan sinkenden CrossLaps®-Konzentrationen im Plasma deuten auf

einen möglichen Regenerationsprozess der skelettalen Calcium-Ressourcen hin. Dabei sprechen jedoch die bereits erwähnten in diesem Zeitraum erhöhten P_i-Konzentrationen im Plasma der laktierenden Ziegen sowie die Tatsache, dass die Konzentrationen von OC bei den trockengestellten Ziegen im Vergleich zu den laktierenden Ziegen wesentlich höher waren und sich weiterhin innerhalb des 7wöchigen Trockenstehens signifikant steigerten für lediglich den Beginn der Wiederherstellung der Calcium-Reserven im Skelettsystem der laktierenden Ziegen. Möglicherweise könnte bei diesen Tieren eine den laktierenden Schafen ähnliche Steigerung der OC-Konzentrationen bis 21 Tage p.p. vorliegen. Da jedoch eine entsprechende Blutprobe bei den laktierenden Ziegen nicht entnommen wurde, kann über ein entsprechendes Verlaufsprofil der OC-Konzentrationen der laktierenden Ziegen nach Tag 10 p.p. nur spekuliert werden.

5.4. Einfluss der Laktation auf den gastrointestinalen Calcium- und Phosphat-Transport trockengestellter und laktierender Schafe und Ziegen

Nach Abschluss der Produktion von Kolostrum wird bei den Schafen und Ziegen mit 1,7 – 2,0 $g \cdot l^{-1}$ bzw. 1,3 – 1,4 $g \cdot l^{-1}$ (LIESEGANG et al. 2006; PARK et al. 2007) vergleichsweise zwar weniger Calcium in die Milch sezerniert, dennoch bleibt der maternale Bedarf an Calcium durch die, insbesondere bei den Ziegen, steigende Milchleistung weiterhin erhöht. So liegt der Calcium-Verlust der Schafe an Tag 20 p.p. bei einer Milchleistung von circa 0,04 $l \cdot kg^{-1}$ KGW vermutlich zwischen 0,07 und 0,08 g Calcium$\cdot kg^{-1}$ KGW. Die Ziegen verlieren in demselben Zeitraum durch die im Vergleich zu den Schafen doppelt so hohe Milchleistung von etwa 0,09 $l \cdot kg^{-1}$ KGW vermutlich circa 0,11 g Calcium$\cdot kg^{-1}$ KGW.

Aufgrund des weiterhin bestehenden Calcium-Verlusts muss auch in dieser Phase der Laktation eine Adaptation an den erhöhten Calcium-Bedarf erfolgen. Da bereits durch die Interpretation der die Calcium-Homöostase beschreibenden Plasmaparameter unter anderem ein Einblick in die im Knochen ablaufenden Adaptationsprozesse gewonnen werden konnte, steht in diesem Abschnitt ein möglicher Wechsel der Anpassungsmechanismen auf die Ebene der gastrointestinalen Calcium-Absorption wie er bereits in früheren Bilanzversuchen beschrieben wurde (vergleiche Abb. 2.1) im Vordergrund.

5.4.1. Einfluss der Laktation auf die im Duodenum, Jejunum und Pansen ermittelten elektrophysiologischen Parameter

Die im Duodenum der laktierenden Schafe ermittelten elektrophysiologischen Parameter rangierten in demselben Bereich, welcher bereits von WILKENS et al. (2011) an Calcium-restriktiv ernährten, wachsenden Schafen nachgewiesen wurde. Die Gewebeleitfähigkeiten der trockengestellten Schafe waren allerdings eher mit denen vergleichbar, die von SCHRÖDER et al. (1997) an adulten Schafen ermittelt wurden. Bei den laktierenden Ziegen waren sowohl die Kurzschlussströme als auch die Gewebeleitfähigkeiten im Vergleich zu früheren *In-vitro*-Studien (SCHRÖDER et al. 1997; WILKENS et al. 2012), im Gegensatz zu den trockengestellten Tieren, erniedrigt.

Die elektrophysiologischen Parameter, die im Jejunum der laktierenden Schafe ermittelt wurden, waren vergleichbar mit denen, die von SCHRÖDER et al. (1997) an adulten Schafen sowie von WILKENS et al. (2011) an wachsenden Schafen gemessen wurden, wohingegen die trockengestellten Tiere höhere Kurzschlussströme aufwiesen. Die im Jejunum sowohl der trockengestellten als auch der laktierenden Ziegen gemessenen elektrophysiologischen Parameter rangierten in derselben Größenordnung wie die, die von WILKENS et al. (2012) an wachsenden Ziegen ermittelt wurden.

Die im Duodenum der laktierenden Schafe und Ziegen sowie im Jejunum der laktierenden Schafe im Vergleich zu den jeweiligen trockengestellten Tieren signifikant verringerten Kurzschlussströme könnten im Fall des Jejunums der Schafe möglicherweise in einer, vermutlich infolge der an den Leistungsbedarf angepassten Fütterung, nachweislich erhöhten Expression sowie Aktivität der basolateralen Na^+/K^+-ATPase im Jejunum der laktierenden Tiere im Vergleich zu den trockengestellten Schafen (KLINGER, unveröffentlichte Ergebnisse) begründet sein. Das durch die Na^+/K^+-ATPase vermehrt eingeschleuste Kalium könnte nachfolgend die Zelle nicht nur basolateral, sondern ebenfalls durch einen möglicherweise apikal

gelegenen Kationen-Kanal verlassen, wodurch sich durch eine Sekretion dieser Ionen eine Verringerung des Kurzschlussstromes ergeben würde. Eine mögliche Rolle könnte in diesem Zusammenhang auch das neben Calcitriol ebenfalls an der Regulation der Calcium-Homöostase beteiligte Polypeptidhormon Prolaktin (siehe 2.4.2) spielen. In Studien an adulten Ratten, denen Prolaktin intraperitoneal injiziert wurde, konnte eine dosisabhängige Steigerung der Na^+/K^+-ATPase im Duodenum dieser Tiere beobachtet werden (KRISHNAMRA et al. 1998; CHAROENPHANDHU et al. 2006). Eine endogene Erhöhung der Konzentrationen von Prolaktin im Plasma laktierender Schafe wurde bereits in einer früheren Studie nachgewiesen (DAVIS et al. 1971). Aufgrund dessen liegt die Vermutung nahe, dass möglicherweise eine durch die Laktation induzierte Steigerung der Prolaktin-Plasma-Konzentrationen auch bei den in der hier vorliegenden Arbeit verwendeten Schafen vorhanden ist und nachfolgend ein ähnlicher Einfluss dieses Hormons auf die Na^+/K^+-ATPase erfolgt sein könnte.

Auch im Duodenum der laktierenden Schafe und Ziegen könnte der signifikant verminderte Kurzschlussstrom ebenfalls durch eine entsprechende Wirkungsweise zustande gekommen sein. Jedoch liegen bis zum jetzigen Zeitpunkt keine Daten über die Expression und Aktivität der Na^+/K^+-ATPase bei diesen Tieren in diesen Darmabschnitten vor.

Die im Pansen gemessenen elektrophysiologischen Parameter sowohl der trockengestellten als auch der laktierenden Schafe und Ziegen lagen in einem Bereich, der schon in früheren Studien ermittelt werden konnte (SCHRÖDER et al. 1999; WILKENS et al. 2012).

5.4.2. Einfluss der Laktation auf die gastrointestinalen Calcium- und Mannit-Fluxraten sowie auf die Expression der Calcium-transportierenden Strukturen

5.4.2.1. Duodenum

Die Betrachtung der im Duodenum der laktierenden und trockengestellten Schafe erfassten nicht signifikanten Calcium-Nettofluxraten im Zusammenhang mit den parallel ermittelten Mannit-Fluxraten deutet auf einen rein parazellulären Transport von Calcium hin. Auch die Tatsache, dass sich bei den erfassten Calcium-Fluxraten in Abhängigkeit von den entsprechenden Mannit-Fluxraten in diesem Darmabschnitt ein linearer Zusammenhang für den Transport von serosal nach mukosal bei den trockengestellten Schafen bzw. in beide Fluxrichtungen bei den laktierenden Tieren ergibt (siehe Abb. 5.1), deutet auf einen parazellulären Transport zumindest der sekretorischen Fraktion hin. Da sich weiterhin auch in den Expressionsstudien keine Unterschiede der Calcium-transportierenden Strukturen ergeben haben, scheint keine Anpassung auf intestinaler Ebene an den infolge der Laktation erhöhten Calcium-Bedarf bei den Schafen zu erfolgen. Dieser Unterschied zum Monogastrier, bei dem das Duodenum die Hauptlokalisation für den intestinalen Calcium-Transport darstellt, wurde bereits in früheren Studien auf funktioneller und struktureller Ebene an wachsenden, Calcium-restriktiv ernährten Schafen (WILKENS et al. 2011) sowie in Ussingkammer-Versuchen an adulten Schafen (SCHRÖDER et al. 1997) beobachtet.

Auch bei den Ziegen deuten die Ergebnisse auf funktioneller Ebene auf eine fehlende Anpassung des Calcium-Transports im Duodenum hin. Der Verlauf der Mannit-Fluxraten sowie lineare Zusammenhänge zwischen den Calcium-Fluxraten in Abhängigkeit von den jeweiligen Mannit-Fluxraten (siehe Abb. 5.1) lassen auch hier mutmaßen, dass Calcium im Duodenum sowohl bei den trockengestellten als auch bei den laktierenden Ziegen parazellulär transportiert wird. Auf struktureller Ebene

konnte zwar eine Steigerung der TRPV6-mRNA-Expression beobachtet werden, diese ging jedoch nicht mit einer entsprechenden Veränderung der Protein-Expression einher. Ob die zugrunde liegende Ursache in einer fehlerhaften Methodik (siehe 5.2.3) begründet ist oder ob es sich hierbei um einen auf die mRNA-Expression beschränkten Effekt der Laktation handelt, kann nicht abschließend geklärt werden.

Eine Anpassung auf funktioneller Ebene infolge eines durch eine alimentäre Calcium-Restriktion erhöhten Calcium-Bedarfs konnte dagegen von WILKENS et al. (2012) an wachsenden Ziegen beobachtet werden. So wurde eine Steigerung der Calcium-Nettofluxraten um circa 10 $nmol \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$ ohne simultane Beeinflussung der Mannit-Fluxraten nachgewiesen. Möglicherweise führte die extreme Reduktion des diätetischen Calcium-Gehalts zu einem vergleichsweise höheren Calcium-Verlust und damit nachfolgend zu einer Steigerung des aktiven transzellulären Calcium-Transports im Duodenum. Weiterhin könnten die zugrunde liegenden Ursachen durch Unterschiede in der Größe und des Alters der verwendeten Tiere begründet sein.

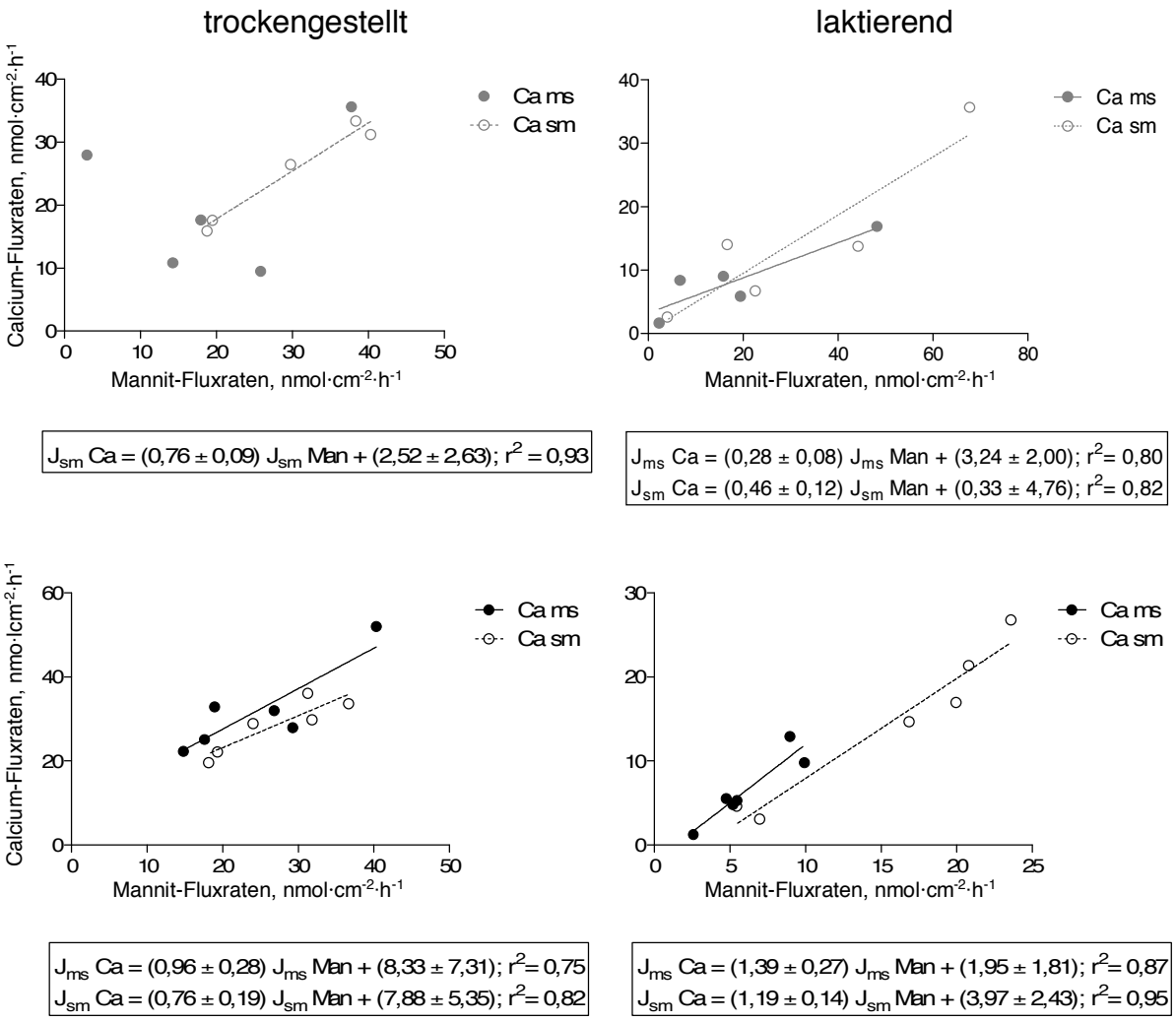

Abb. 5.1: Korrelationen zwischen Calcium (Ca)- und Mannit (Man)-Fluxraten von mukosal nach serosal (ms) bzw. von serosal nach mukosal (sm) im Duodenum trockengestellter (links) und laktierender (rechts) Schafe (oben) und Ziegen (unten). Die entsprechenden Kalkulationen sind nur im Fall einer signifikanten Korrelation in Form einer linearen Regression aufgetragen; J_{ms} = Fluxrate von mukosal nach serosal, J_{sm} = Fluxrate von serosal nach mukosal; r^2 = Bestimmtheitsmaß der linearen Regression.

5.4.2.2. Jejunum

Im Jejunum der laktierenden Schafe konnte zwar eine signifikante Nettoabsorption von Calcium nachgewiesen werden, jedoch spricht die ebenfalls signifikante Absorption von Mannit bei diesen Tieren mit einer hohen Wahrscheinlichkeit für

einen parazellulären Transport von Calcium im diesem Darmsegment. Auch entsprechende Korrelationen der Mannit-Fluxraten in Abhängigkeit von den Gewebeleitfähigkeiten von mukosal nach serosal sowie eine gleichartige Beeinflussung der jeweiligen Calcium-Fluxraten (nicht dargestellt) und die unveränderte Expression der Calcium-transportierenden Strukturen deuten auf einen parazellulären Calcium-Transport. Die bei den laktierenden Schafen im Vergleich zu den trockengestellten Tieren signifikant erhöhten Mannit-Fluxraten könnten auf ein ausgeprägtes *Solvent drag*-Phänomen (siehe 2.3.1) zurückzuführen sein. Im Zusammenhang mit einem parazellulären Transport von Calcium könnte auch das vermutlich ebenfalls an der Regulation der Calcium-Homöostase beteiligte Hormon Prolaktin (siehe 2.4.2) eine Rolle spielen. So konnte in adulten Ratten, die eine intraperitoneale Injektion mit Prolaktin erhielten eine dosisabhängige Steigerung der parazellulären Transportkomponente nachgewiesen werden (TANRATTANA et al. 2004). Durch die wahrscheinlich endogen bei den Schafen infolge der Laktation ebenfalls erhöhten Konzentrationen von Prolaktin im Blutplasma könnte auch bei diesen Tieren ein ähnlicher Effekt des Hormons vorliegen. Da aber bis zum jetzigen Zeitpunkt kein entsprechender Assay zur Bestimmung der Prolaktin-Plasma-Konzentrationen vorlag, kann über einen Einfluss erhöhter Prolaktin-Konzentrationen auf den Calcium-Transport in diesem Darmabschnitt nur spekuliert werden.

Neben dem parazellulären Calcium-Transport bei den laktierenden Schafen deuten die bei diesen Tieren ermittelten fehlenden linearen Zusammenhänge zwischen den Calcium- und Mannit-Fluxraten (siehe Abb. 5.2) ungeachtet der Fluxrichtung auf eine zumindest teilweise Vermittlung des Calcium-Transports im Jejunum über den aktiven, transzellulären Weg. Dabei ist einschränkend anzumerken, dass aufgrund der niedrigen Tierzahl (n= 5) die Ergebnisse der durchgeführten Korrelationen kritisch beurteilt werden müssen. Jedoch deuteten sich in einer Studie an wachsenden, Calcium-restriktiv ernährten Schafen von WILKENS et al. (2011) auf funktioneller Ebene Hinweise auf einen möglicherweise transzellulären Calcium-Transport im Jejunum an, welcher sich jedoch nicht statistisch verifizieren ließ. Ein Effekt auf den aktiven, transzellulären Calcium-Transport sowie auf die Expression der Calcium-transportierenden Strukturen konnte in der Studie von WILKENS et al.

(2011) nur durch eine Behandlung mit Calcitriol in supraphysiologischer Dosis erzielt werden. Diese Tatsache spricht dafür, dass im Jejunum des Schafes prinzipiell ein aktiver, Calcitriol-regulierter Transport von Calcium stattfinden kann. Inwieweit dies unter den physiologischen Bedingungen der Laktation eine Rolle spielt, muss allerdings vorsichtig beurteilt werden. Analog zum Duodenum scheint bei den Schafen auch im Jejunum, obwohl dieser Darmabschnitt als wahrscheinliche Hauptlokalisation für den intestinalen Calcium-Transport angesehen wird (MROCHEN 2010), keine Anpassung an den durch die Laktation induzierten erhöhten Calcium-Bedarf zu erfolgen. Jedoch deuten auf skelettaler Ebene die im Vergleich zu den laktierenden Schafen 21 Tage p.p. erhöhten OC-Plasma-Konzentrationen, die vor dem Trockenstellen ermittelt wurden (35,7 ± 6,16 $ng \cdot ml^{-1}$ vs. 48,52 ± 9,70 $ng \cdot ml^{-1}$) sowie die verringerten CrossLaps®-Plasma-Konzentrationen (2,4 ± 0,38 $ng \cdot ml^{-1}$ vs. 1,51 ± 0,35 $ng \cdot ml^{-1}$) auf eine weiterhin bestehende Beteiligung des Skelettsystems an der Aufrechterhaltung der Calcium-Homöostase.

Im Gegensatz zu den Schafen scheint bei den Ziegen eine Adaptation an den durch die Laktation erhöhten Calcium-Bedarf auf intestinaler Ebene von größerer Bedeutung zu sein. Einen ersten Anhaltspunkt für diese Vermutung gab dabei die im Vergleich der laktierenden Ziegen mit den laktierenden Schafen um ein Vielfaches erhöhte mRNA-Expression von PMCA. Da dieser Speziesunterschied nicht im Pansen (siehe 4.6.4) nachgewiesen wurde, kann in diesem Zusammenhang ein für die Schafe nicht optimierter Assay als mögliche Ursache für die vergleichsweise verringerte PMCA-Expression bei diesen Tieren mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Der Unterschied zwischen der mRNA- und Protein-Expression von TRPV6 ist wie auch im Duodenum mit hoher Wahrscheinlichkeit auch hier auf die in Abschnitt 5.2.3 beschriebene Problematik zurückzuführen.

Die Expressionssteigerungen des PMCA- und vor allem des Calbindin-D_{9k}-Proteins bei den laktierenden Ziegen als ein vermutlicher Adaptationsmechanismus an den durch die Laktation erhöhten Calcium-Bedarf bei gleichzeitig unveränderter Protein-Expression von TRPV6 stehen in Kontrast zu der von HOENDEROP et al. (2002) postulierten Annahme, dass die Expression von TRPV6 der

geschwindigkeitslimitierende Schritt des intestinalen transzellulären Calcium-Transports darstellt. Aufgrund der höheren Konzentrationen von Calcium im Pansen der laktierenden Schafe im Vergleich zu den trockengestellten Tieren liegt die Vermutung nahe, dass auch in der Ingesta des Jejunum höhere luminale Calcium-Konzentrationen als bei den trockengestellten Tieren vorhanden sein könnten. Unter diesen Umständen findet normalerweise durch luminal als auch durch intrazellulär hohe Calcium-Konzentrationen eine verminderte Expression von TRPV6 statt (HOENDEROP et al. 2001), jedoch könnten durch die Bindung von Calcium an das vermehrt exprimierte Calbindin-D_{9k}-Protein die intrazellulären Calcium-Konzentrationen soweit gesenkt worden sein, dass TRPV6 möglicherweise länger geöffnet bleiben könnte. Ein möglicher alternativer Weg der apikalen Calcium-Aufnahme könnte laut KELLET (2011) über den spannungsgesteuerten L-Typ-Kanal $Ca_v1.3$ (*voltage-gated Calcium channel type 1.3*) vermittelt werden, dessen intestinale Expression unter anderem bereits im Jejunum von Ratten nachgewiesen werden konnte (MORGAN et al. 2003).

Die zugrunde liegende Ursache der im Gegensatz zu den Expressionsstudien weniger ausgeprägten Reaktion auf funktioneller Ebene könnte durch die im Vergleich zu den *In-vivo*-Bedingungen geringeren luminalen Calcium-Konzentrationen während der Ussingkammer-Versuche begründet sein. In diesem Zusammenhang könnte *in vivo* mehr Calcium transportiert werden, als unter *In-vitro*-Bedingungen ersichtlich ist. Möglicherweise könnte daher in zukünftigen Untersuchungen eine Erhöhung der Calcium-Konzentrationen in der mukosalen Pufferlösung zu eindeutigeren Ergebnissen führen.

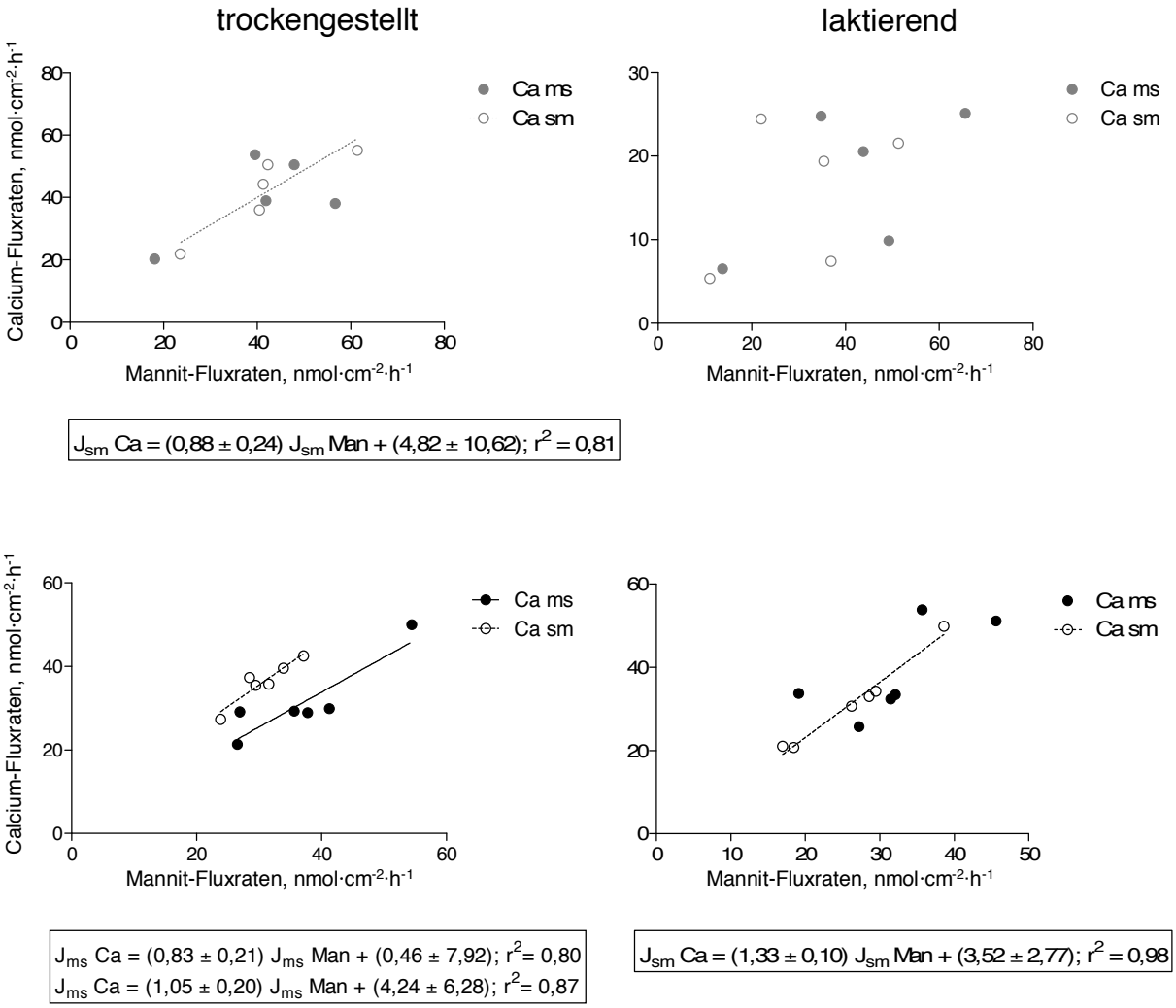

Abb. 5.2: Korrelationen zwischen Calcium (Ca)- und Mannit (Man)-Fluxraten von mukosal nach serosal (ms) bzw. von serosal nach mukosal (sm) im Jejunum trockengestellter (links) und laktierender (rechts) Schafe (oben) und Ziegen (unten). Die entsprechenden Kalkulationen sind nur im Fall einer signifikanten Korrelation in Form einer linearen Regression aufgetragen; J_{ms} = Fluxrate von mukosal nach serosal, J_{sm} = Fluxrate von serosal nach mukosal, r^2 = Bestimmtheitsmaß der linearen Regression.

5.4.2.3. Colon

Eine Untersuchung des Effekts der Laktation auf den Transport von Calcium im Colon fand nur auf struktureller Ebene statt. Sowohl bei den trockengestellten als auch bei den laktierenden Schafen und Ziegen konnte dabei weder auf mRNA- noch

auf Protein-Ebene eine Expressionsveränderung der Calcium-transportierenden Strukturen TRPV6 und PMCA beobachtet werden. Allerdings war die mRNA-Expression von PMCA bei den Ziegen im Vergleich zu den Schafen deutlich erhöht, wohingegen die TRPV6-mRNA-Expression bei den Schafen höher war, was möglicherweise auf eine größere Bedeutung von PMCA für die Ziegen bzw. von TRPV6 für die Schafe hindeuten könnte. Das Colon scheint jedoch weder bei den Schafen noch bei den Ziegen an der regulierten, transzellulären Calcium-Absorption beteiligt zu sein. Die von WILKENS et al. (2011; 2012) postulierte Vermutung eines parazellulären Transports von Calcium im Colon trifft möglicherweise auch für die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Schafe und Ziegen zu, kann aber aufgrund der nicht durchgeführten Ussingkammer-Versuche nicht vollständig bestätigt werden.

5.4.2.4. Pansen

Die sowohl bei den Schafen als auch bei den Ziegen im Pansen nachgewiesene signifikante Absorption von Calcium ist bei Betrachtung der in Richtung Sekretion verlaufenden Mannit-Fluxraten mit hoher Wahrscheinlichkeit auf einen transzellulären Transport von Calcium zurückzuführen. Auch die fehlenden linearen Zusammenhänge bzw. die negative Korrelation zwischen den erfassten Calcium-Fluxraten in Abhängigkeit von den entsprechenden Mannit-Fluxraten der Schafe und Ziegen (siehe Abb. 5.3) lassen auf einen transzellulären Transportprozess schließen. Da unter den *In-vitro*-Konditionen der Ussingkammer-Versuche geringere luminale Calcium-Konzentrationen im Vergleich zu den Konzentrationen in der Pansenflüssigkeit vorhanden sind, ist die signifikante Steigerung der ruminalen Calcium-Absorption, die bei den laktierenden Ziegen im Vergleich zu den trockengestellten Tieren beobachtet werden konnte, vermutlich auf einen Effekt der Laktation zurückzuführen, der bei entsprechend höheren Calcium-Konzentrationen *in vivo* eine noch viel größere Bedeutung zukommen würde. Ein in diesem Zusammenhang möglicher Einfluss von Calcitriol auf den transzellulären Calcium-Transport im Pansen der Schafe und Ziegen kann allerdings aufgrund der Ergebnisse von WILKENS et al. (2011; 2012), die weder einen Effekt von

endogenem noch exogenem Calcitriol auf die ruminale Calcium-Absorption bei Calcium-restriktiv bzw. –adäquat ernährten Schafen und Ziegen beobachten konnten, nahezu ausgeschlossen werden.

Die Tatsache, dass sowohl bei den laktierenden Schafen als auch bei den laktierenden Ziegen im Vergleich zu den jeweiligen trockengestellten Tieren keine Unterschiede in der PMCA-Expression nachgewiesen werden konnten, sowie die bei beiden Spezies im Vergleich zu der intestinalen Expression deutlich geringere ruminale PMCA-mRNA-Expression spricht für eine geringere Bedeutung dieses Ausschleusungssystems beim Calcium-Transport im Pansen.

Statt des klassischen Calcium-Transportweges über TRPV6, Calbindin-D_{9k} und PMCA könnte ein alternativer, Calcitriol-unabhängiger Mechanismus des Calcium-Transports im Pansen der kleinen Wiederkäuer präsent zu sein. SCHRÖDER et al. (1997) wiesen in diesem Zusammenhang eine Abhängigkeit des aktiven transzellulären Calcium-Transports im Pansen des Schafes von der Anwesenheit kurzkettiger Fettsäuren (SCFA) nach, die aufgrund eines apikalen $Ca^{2+}/2H^{+}$-Antiporters, der bereits im Zusammenhang mit einem Calcium-Transport im Colon von Ratten postuliert wurde (LUTZ u. SCHARRER 1991), bedingt sein könnte. Nicht-dissoziierte SCFA, insbesondere Butyrat (SCHRÖDER et al. 1999), könnten dabei die Zellmembran über Diffusion passieren und durch nachfolgende Dissoziation intrazellulär Protonen liefern (RECHKEMMER 1991), aufgrund dessen sich eine Abhängigkeit des $Ca^{2+}/2H^{+}$-Antiporters und damit auch des ruminalen Calcium-Transports von den luminalen Konzentrationen der SCFA ergeben würde.

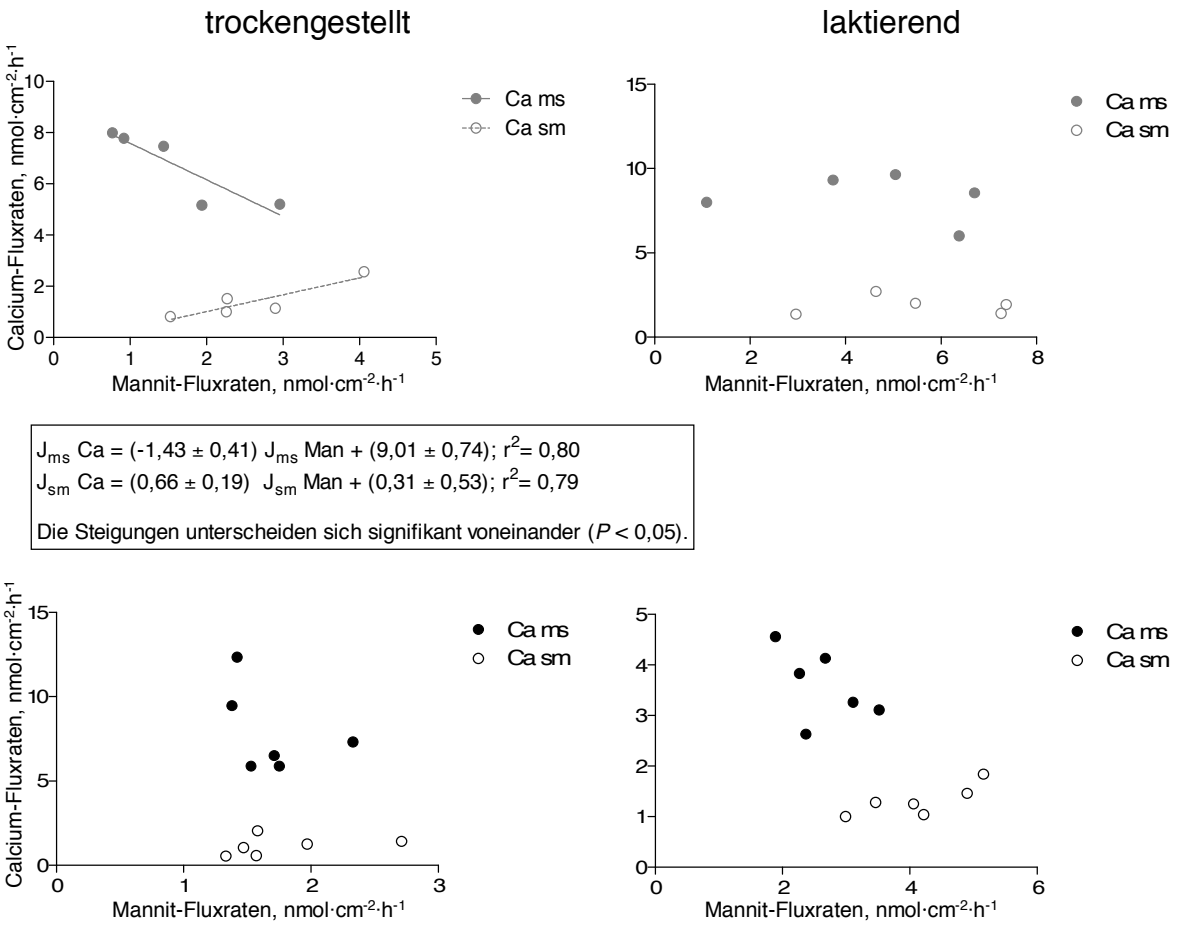

Abb. 5.3: Korrelationen zwischen Calcium (Ca)- und Mannit (Man)-Fluxraten von mukosal nach serosal (ms) bzw. von serosal nach mukosal (sm) im Pansen trockengestellter (links) und laktierender (rechts) Schafe (oben) und Ziegen (unten). Die entsprechenden Kalkulationen sind nur im Fall einer signifikanten Korrelation in Form einer linearen Regression aufgetragen; J_{ms} = Fluxrate von mukosal nach serosal, J_{sm} = Fluxrate von serosal nach mukosal, r^2 = Bestimmtheitsmaß der linearen Regression.

5.4.3. Einfluss der Laktation auf die intestinalen Phosphat- und Mannit-Fluxraten sowie auf die Expression von NaPi-IIb

Sowohl bei den laktierenden, als auch bei den trockengestellten Schafen deuten die Ergebnisse der funktionellen Untersuchungen im Duodenum und Jejunum sowie die in Abb. 5.4 und Abb. 5.5 dargestellten linearen Zusammenhänge der erfassten Phosphat-Fluxraten in Abhängigkeit von den jeweiligen Mannit-Fluxraten und entsprechende Abhängigkeiten sowohl der Phosphat- als auch der Mannit-Fluxraten von den Gewebeleitfähigkeiten (nicht dargestellt) durch die gleichartige Beeinflussung der Fluxraten auf einen parazellulären Transport von Phosphat hin.

Die nachweislich erhöhte Resorption von Calcium (siehe 4.2.2) und die vermutlich damit einhergehende Mobilisation von Phosphat aus dem Knochen könnte dem erhöhten Phosphat-Bedarf der laktierenden Schafe soweit entgegengekommen sein, dass eine Anpassung auf intestinaler Ebene durch einen gesteigerten transzellulären Transport möglicherweise nicht notwendig war. Infolge der vergleichsweise (WILKENS; unveröffentlichte Ergebnisse) hohen Phosphat-Konzentrationen in der Pansenflüssigkeit der laktierenden und trockengestellten Schafe (siehe 4.4), liegt die Vermutung nahe, dass auch in der Ingesta des Dünndarms hohe luminale Phosphat-Konzentrationen vorhanden sein könnten, bei denen die parazelluläre Transportkomponente an Bedeutung gewinnt.

Analog zu den laktierenden Schafen deuten die ermittelten nicht signifikanten Phosphat-Fluxraten im Duodenum und Jejunum der laktierenden Ziegen im Zusammenhang mit den jeweiligen Mannit-Fluxraten sowie entsprechende Korrelationen der Phosphat-Fluxraten mit den Mannit-Fluxraten (siehe Abb. 5.4 und Abb. 5.5) ebenfalls auf einen parazellulären Phosphat-Transport in diesen Darmabschnitten hin. Die zugrunde liegende Ursache könnte wie auch bei den laktierenden Schafen durch eine Adaptation infolge der mit der Calcium-Resorption einhergehenden Mobilisation von Phosphat aus dem Skelettsystem begründet sein. Die durch diese Anpassung nachfolgend erhöhten Plasma-Phosphat-Konzentrationen in der Laktation (siehe 4.2.1) könnten auch hier in einer fehlenden Anpassung auf intestinaler Ebene resultieren.

Für diese Vermutung spricht auch die Tatsache, dass bei den trockengestellten Ziegen, bei denen eine solche Adaptation des Skelettsystems aufgrund des vergleichsweise geringeren Calcium-Bedarfs wahrscheinlich nicht erfolgte (siehe 4.3), sowohl im Duodenum als auch im Jejunum eine signifikante Nettoabsorption von Phosphat nachgewiesen wurde. Die in entgegengesetzter Richtung verlaufenden bzw. die nicht signifikanten Mannit-Fluxraten sowie die in absorptiver Richtung fehlenden Korrelationen der Phosphat-Fluxraten in Abhängigkeit von den jeweiligen Mannit-Fluxraten (siehe Abb. 5.4 und Abb. 5.5) deuten auf einen aktiven, transzellulären Phosphat-Transport in beiden Darmabschnitten bei diesen Tieren hin. Auch die tendenziell erhöhte Expression von NaPi-IIb im Jejunum der trockenstehenden Ziegen lässt einen aktiven, transzellulären Transportprozess vermuten. Jedoch ist die Aussagekraft des Nachweises dieses Transporters aufgrund der in Abschnitt 5.2.3 beschriebenen Problematik nur unter kritischem Vorbehalt zu beurteilen. Da analog zu früheren Untersuchungen NaPi-IIb nicht im Duodenum detektiert werden konnte (HUBER et al. 2002), liegt die Vermutung nahe, dass der transzelluläre Phosphat-Transport in diesem Darmabschnitt durch einen alternativen Mechanismus vermittelt wird. In diesem Zusammenhang konnten HUBER et al. (2002) in Ussingkammer-Versuchen sowie mit Hilfe von Phosphat-Uptakes an isolierten Bürstensaummembranvesikel des Duodenums der Ziege ein Carrier-vermitteltes, protonenabhängiges Phosphat-Transportsystem nachweisen. Ein weiterer möglicher Transportweg könnte durch den in Abschnitt 2.3.2.2 beschriebenen, bereits im Darm von Mäusen nachgewiesenen NaPi-III Kotransporter (PiT-2) vermittelt werden (KATAI et al. 1999).

Neben der intestinalen Absorption von Phosphat könnte möglicherweise auch eine Beteiligung des Pansens an einem solchen Transportprozess vorhanden sein. Dafür spricht die Tatsache, dass im Vergleich zu den Schafen signifikant höhere Phosphat-Konzentrationen in der Pansenflüssigkeit der Ziegen ermittelt werden konnten, wohingegen dieser Unterschied nicht in der Labmagenflüssigkeit nachgewiesen wurde. Da bei einer alleinigen Resorption von Wasser im Pansen die Konzentrationen von Phosphat in der Labmagenflüssigkeit im Vergleich zu den Konzentrationen in der Pansenflüssigkeit, wie bei den in der Pansen- und

Labmagenflüssigkeit gemessenen Calcium-Konzentrationen (siehe Abb. 4.9), ansteigen müssten, liegt die Vermutung nahe, dass Phosphat möglicherweise durch einen transzellulären Mechanismus absorbiert wurde und sich auf diese Weise an der Aufrechterhaltung der Phosphat-Homöostase bei diesen Tieren beteiligen könnte. Da jedoch in den funktionellen Studien der hier vorliegenden Arbeit keine Bestimmung der ruminalen Phosphat-Fluxraten durchgeführt wurden, kann diese Annahme nicht vollständig bestätigt werden.

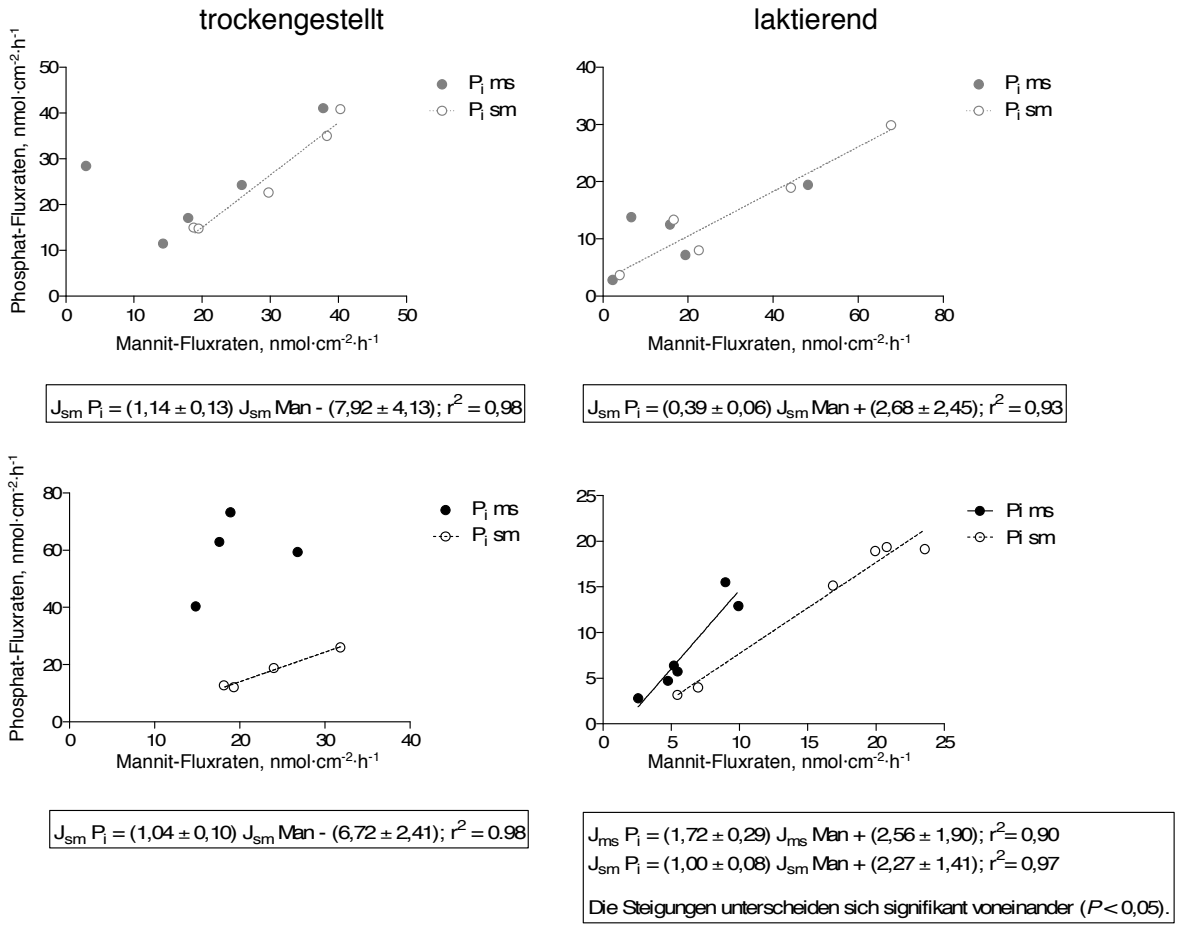

Abb. 5.4: Korrelationen zwischen Phosphat (P_i)- und Mannit (Man)-Fluxraten von mukosal nach serosal (ms) bzw. von serosal nach mukosal (sm) im Duodenum trockengestellter (links) und laktierender (rechts) Schafe (oben) und Ziegen (unten). Die entsprechenden Kalkulationen sind nur im Fall einer signifikanten Korrelation in Form einer linearen Regression aufgetragen; J_{ms} = Fluxrate von mukosal nach serosal, J_{sm} = Fluxrate von serosal nach mukosal, r^2 = Bestimmtheitsmaß der linearen Regression.

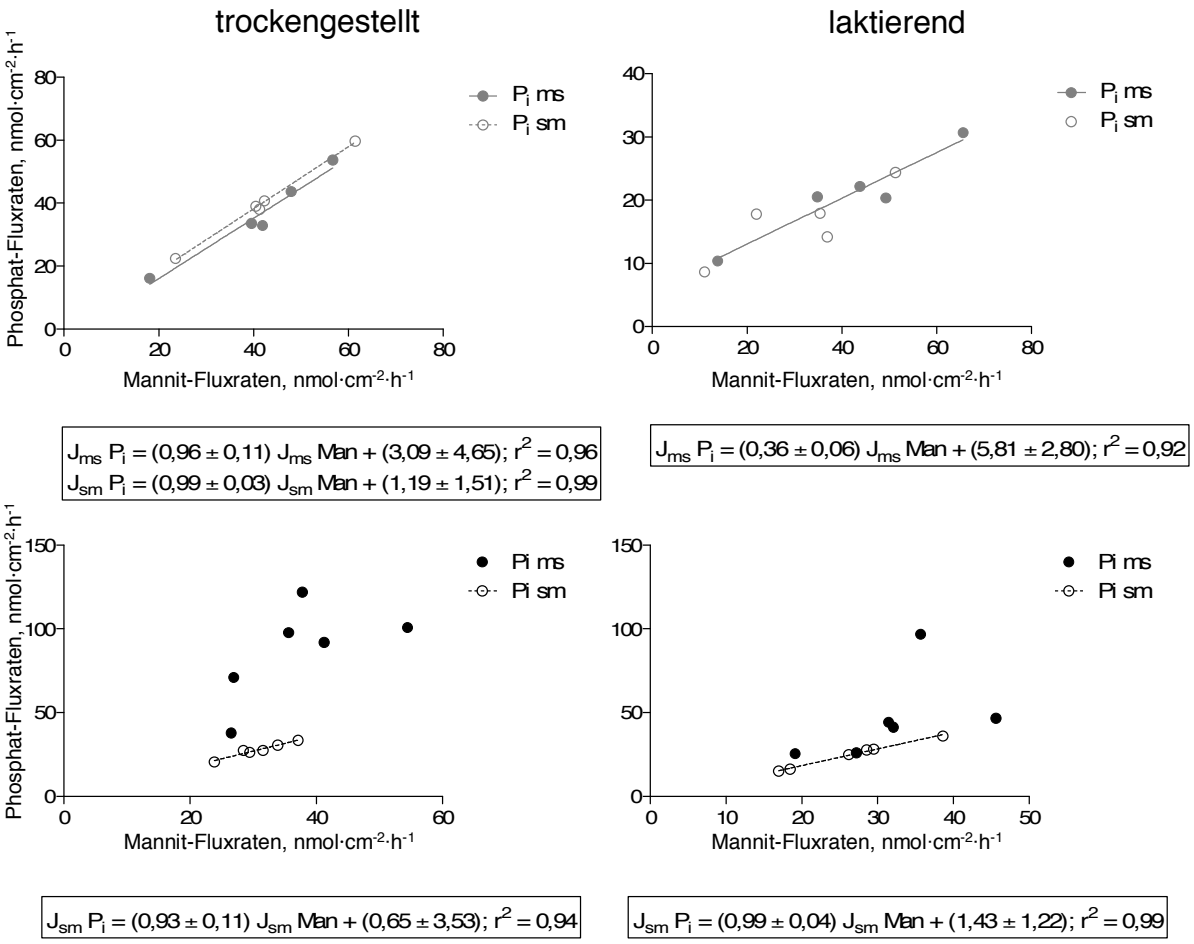

Abb. 5.5: Korrelationen zwischen Phosphat (P_i)- und Mannit (Man)-Fluxraten von mukosal nach serosal (ms) bzw. von serosal nach mukosal (sm) im Jejunum trockengestellter (links) und laktierender (rechts) Schafe (oben) und Ziegen (unten). Die entsprechenden Kalkulationen sind nur im Fall einer signifikanten Korrelation in Form einer linearen Regression aufgetragen; J_{ms} = Fluxrate von mukosal nach serosal, J_{sm} = Fluxrate von serosal nach mukosal, r^2 = Bestimmtheitsmaß der linearen Regression.

5.5. Schlussfolgerungen und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Ergebnisse der analytischen, strukturellen und funktionellen Untersuchungen gezeigt werden, dass es sowohl bei den Schafen als auch bei den Ziegen infolge der Geburt und der einsetzenden Laktation zu einer spezies-spezifischen Adaptation zur Aufrechterhaltung der Calcium-Homöostase gekommen ist.

Durch die bei den Schafen wahrscheinlich bereits in der späten Trächtigkeit verringerten Konzentrationen von ionisiertem Calcium im Vollblut sowie die erhöhten CrossLaps®-Plasma-Konzentrationen liegt die Vermutung nahe, dass es bei diesen Tieren schon *ante partum* zu einer Belastung des Calcium-Haushaltes gekommen sein könnte. Die im Vergleich zu den trockenstehenden Schafen erhöhten CrossLaps®-Konzentrationen im Blutplasma der laktierenden Tiere deuten auf eine zu großen Teilen durch Resorption von Calcium aus dem Knochen erfolgende Adaptation hin. Dagegen konnte durch die funktionellen und strukturellen Untersuchungen keine Anpassung auf gastrointestinaler Ebene beobachtet werden. Dass prinzipiell eine Adaptation des intestinalen Calcium-Transports beim Schaf erfolgen kann, konnte von WILKENS et al. (2011) durch eine Behandlung mit Calcitriol in pharmakologischer Dosis gezeigt werden. Die fehlende Anpassung in der Trächtigkeit und der Laktation könnte dadurch begründet sein, dass unter diesen physiologischen Bedingungen die Belastung des Calcium-Haushaltes nicht ausreichend war, eine entsprechende Antwort zu erwirken. Mögliche Einflussfaktoren könnten in diesem Zusammenhang in der im Vergleich zu den Ziegen niedrigeren Milchleistung und der Calcium- adäquaten Fütterung der laktierenden Schafe liegen. Weiterhin könnte durch die im Pansen sowohl der trockengestellten als auch der laktierenden Schafe nachgewiesene, wahrscheinlich transzelluläre Absorption von Calcium womöglich ausreichend Calcium aufgenommen worden sein. Insbesondere bei ausreichender alimentärer Calcium-Versorgung und damit einhergehenden hohen Calcium-Konzentrationen im Pansen könnte das Schaf daher nicht auf eine aktive Absorption von Calcium aus dem Darm angewiesen sein. Zukünftige

Untersuchungen sollten deshalb darauf abzielen, den molekularen Mechanismus des ruminalen Calcium-Transports sowie dessen Regulation näher zu charakterisieren. Darüber hinaus könnte beispielsweise durch eine in Maßen gehaltene Calcium-restriktive Fütterung von laktierenden Schafen eine stärkere Belastung des Calcium-Haushaltes und eine möglicherweise damit einhergehende Anpassung auf intestinaler Ebene provoziert werden.

Als spezies-spezifischer Unterschied konnte bei den laktierenden Ziegen im Gegensatz zu den Schafen neben einer Anpassung des Skelettsystems in Form einer gesteigerten Resorption von Calcium aus dem Knochen sowie einer verminderten Knochenformation mit Einsetzen der Laktation vor allem eine Aktivierung adaptiver Mechanismen im Jejunum durch die Expressionssteigerung von Calbindin-D_{9k} und PMCA beobachtet werden. Diese Anpassungen auf struktureller Ebene konnten jedoch nicht eindeutig durch die Ussingkammer-Versuche bestätigt werden. Dagegen ist die Steigerung des wahrscheinlich transzellulären Calcium-Transports im Pansen der laktierenden Ziegen im Vergleich zu den trockengestellten Tieren vermutlich auf einen Effekt der Laktation zurückzuführen. Auch hier sollte in zukünftigen Untersuchungen eine entsprechende Charakterisierung des zugrunde liegenden Transportmechanismus sowie dessen Regulation erfolgen.

Die sich vom Schaf unterscheidenden Anpassungsmechanismen im Darm der Ziege könnten möglicherweise in der deutlich höheren Milchleistung der Ziegen und dem damit verbundenen, im Vergleich zu den Schafen höheren Calcium-Verlust begründet sein. Im Gegensatz zum Schaf, das aufgrund seiner Ernährungsweise immer ausreichend mit Calcium versorgt ist (MROCHEN 2010), könnte die Ziege weiterhin als ein selektiver Ernährungstyp mit einer ausgeprägten Anpassungsfähigkeit an wechselnde und extreme Umweltbedingungen und Vegetationen, die nur einen niedrigen Nährstoffgehalt bieten (HOFMANN 1989), auf eine intestinale Adaptation angewiesen sein, um Perioden mit stark limitierten Ressourcen zu überdauern. Eine deutlichere Reaktion auf einen erhöhten Calcium-

Bedarf insbesondere auf funktioneller Ebene könnte auch hier durch eine moderate Calcium-restriktive Fütterung von laktierenden Ziegen erreicht werden.

Eine Steigerung des aktiven, transzellulären Phosphat-Transportes konnte weder bei den laktierenden Schafen noch bei den laktierenden Ziegen beobachtet werden. Durch die infolge der Trächtigkeit und der Laktation stattfindende Mobilisation von Calcium und damit auch von Phosphat aus dem Knochen war möglicherweise eine Adaptation auf intestinaler Ebene nicht notwendig. Da aber die trockengestellten Ziegen eine deutliche, wahrscheinlich transzelluläre Absorption von Phosphat im Duodenum und Jejunum zeigten, sollten zukünftige Untersuchungen auf die Charakterisierung der Phosphat-transportierenden Strukturen sowie der eindeutigen Identifikation von NaPi-IIb in diesen Darmabschnitten beider Spezies mittels einer Analyse auf mRNA-Ebene sowie der Überprüfung der Spezifität des verwendeten Antikörpers mit Hilfe einer Antikörper-Blockade abzielen.

Im Hinblick auf die Nutzung von Schafen und Ziegen als Tiermodell für entsprechende Untersuchungen der Regulationsmechanismen der Calcium- und Phosphat-Homöostase bei der Milchkuh konnten zwar Ähnlichkeiten beider Spezies wie beispielsweise der wahrscheinlich Calcitriol-unabhängige, aktive, transzelluläre Transport von Calcium im Pansen nachgewiesen werden, jedoch konnten ebenso ausgeprägte Unterschiede der Beteiligungen des Skelettsystems sowie des Gastrointestinaltraktes an der Aufrechterhaltung der Calcium-Homöostase ermittelt werden. Aufgrund dessen sind weitere Studien zur Klärung der Frage, welche der beiden Spezies als Tiermodell für die Milchkuh besser geeignet ist, erforderlich.

6 Zusammenfassung

Julia Richter

Untersuchungen zum Einfluss der Laktation auf die gastrointestinale Calcium- und Phosphat-Absorption bei Schaf und Ziege

Bilanzversuche am Schaf (BRAITHWAITE 1978) und am Rind (VAN'T KLOOSTER 1976) konnten zeigen, dass bei Wiederkäuern offenbar ebenso wie beim monogastrischen Tier eine Adaptation an den durch die Laktation erhöhten Calcium-Bedarf, neben einer gesteigerten Resorption von Calcium aus dem Knochen in Form einer gesteigerten Calcium-Absorption aus dem Gastrointestinaltrakt stattfindet, die Effizienz der gastrointestinalen Calcium-Absorptionsmechanismen jedoch nicht ausreichend ist, die beim Wiederkäuer mit dem Einsetzen der Laktation einhergehende negative Calcium-Bilanz auszugleichen. Viele Untersuchungen zu Störungen der Calcium-Homöostase wurden aufgrund ihrer besseren Praktikabilität anstelle an der Milchkuh an Schafen und Ziegen durchgeführt. Da sich aus Untersuchungen zum gastrointestinalen Calcium-Transport bereits Hinweise auf spezies-spezifische Unterschiede ergeben haben, war es nachfolgend das Ziel der hier vorliegenden Arbeit, zu untersuchen inwieweit sich Schafe und Ziegen in ihrer Adaptation an eine durch die Trächtigkeit bzw. Laktation erhöhte Belastung der Calcium-Homöostase peripartal und langfristig ähneln bzw. unterscheiden.

Da in früheren Studien die strukturellen Grundlagen für einen Calcitriol-abhängigen, transzellulären Calcium-Transport im Darm nachgewiesen bzw. ein entsprechender Mechanismus für den Pansen nahezu ausgeschlossen werden konnte, wurde nachfolgend in der vorliegenden Arbeit untersucht in welcher Art und Weise die Laktation einen Einfluss auf die Calcium-Absorption aus dem Gastrointestinaltrakt und auf die Phosphat-Absorption aus dem Darm von Schafen und Ziegen hat.

Zu diesem Zweck wurden analytische sowie funktionelle und strukturelle Untersuchungen an laktierenden Schafen und Ziegen im Vergleich zu der jeweiligen trockengestellten Gruppe durchgeführt.

Infolge der Laktation kam es bei den laktierenden Ziegen zu einer deutlichen Expressionssteigerung der Calcium-transportierenden Strukturen Calbindin-D_{9k} und PMCA auf Protein- bzw. auf mRNA- und Protein-Ebene und einer gesteigerten Absorption von Calcium im Pansen, wohingegen beim Schaf keine Anpassung auf gastrointestinaler Ebene beobachtet werden konnte. Stattdessen scheint eine Adaptation bei dieser Spezies zu großen Teilen durch Resorption von Calcium aus dem Knochen zu erfolgen. Da bei diesem Prozess nicht nur Calcium, sondern auch Phosphat aus dem Knochen mobilisiert wird, könnten die nachfolgend erhöhten Phosphat-Konzentrationen im Plasma dieser Tiere ursächlich für eine fehlende Adaptation des Phosphat-Transports im Duodenum und Jejunum sein.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit, dass die Anpassungsmechanismen an einen durch die Laktation induzierten erhöhten Calcium-Verlust bei Schafen und Ziegen nicht dieselben sind. Aufgrund dessen sind weitere Studien notwendig, um zu klären, welche der beiden Spezies besser als ein Modelltier für die Milchkuh geeignet ist.

7 Summary

Julia Richter

Studies on the influence of lactation on gastrointestinal calcium and phosphate absorption in sheep and goats

In former balance studies with sheep (BRAITHWAITE 1978) and cattle (VAN'T KLOOSTER 1976) it is known that in lactating ruminants like in monogastric animals the high calcium demand is met by increased resorption of calcium from the bone and increased absorption from the rumen and the intestines. However the efficiency of gastrointestinal calcium absorption is not sufficient to compensate for the negative calcium balance at the onset of lactation.

For practical reasons many studies aiming at the understanding of the disruption of calcium homeostasis in dairy cows are carried out using sheep and goats instead. As there is evidence of species specific differences in the gastrointestinal calcium transport it was the aim of the present study to investigate to what extent there are differences or similarities of sheep and goats in adapting to a pregnancy and lactation induced challenge of calcium homeostasis.

As former studies showed the existence of the structural basis for a calcitriol dependent transcellular calcium transport in the intestine but not in the rumen it was the aim of the present study to determine the effects of lactation on gastrointestinal calcium absorption and on intestinal phosphate absorption in sheep and goats.

For this purpose analytical as well as functional and structural investigations on lactating sheep and goats in comparison to the respective dried off animals were performed.

In goats, lactation resulted in an increase of the Calbindin-D_{9k} and PMCA as well as in an increased ruminal absorption of calcium. In contrast, gastrointestinal absorption in sheep was not affected by lactation. Instead an adaptation seems to occur via

enhanced mobilisation of calcium from the bone. As in this process not only calcium but also phosphate is mobilised the increased phosphate plasma concentrations obtained in these animals may be responsible for the absent adaptation of phosphate transport in the duodenum and jejunum.

In summary these findings clearly demonstrate that the mechanisms to compensate for a lactation induced challenge of calcium homeostasis are not the same in sheep and goats. Further studies are needed to clarify which of the two investigated species is more suitable as a model for the dairy cow.

8 Literaturverzeichnis

AGUS, Z. S., L. B. GARDNER, L. H. BECK u. M. GOLDBERG (1973):
Effects of parathyroid hormone on renal tubular reabsorption of calcium, sodium, and phosphate.
American Journal of Physiology - Legacy Content 224, 1143-1148

AJIBADE, D. V., P. DHAWAN, A. J. FECHNER, M. B. MEYER, J. W. PIKE u. S. CHRISTAKOS (2010):
Evidence for a role of prolactin in calcium homeostasis: regulation of intestinal transient receptor potential vanilloid type 6, intestinal calcium absorption, and the 25-hydroxyvitamin D_3 1α-hydroxylase gene by prolactin.
Endocrinology 151, 2974-2984

AURBACH, G. D., H. T. KEUTMANN, H. D. NIALL, G. W. TREGEAR, J. L. O'RIORDAN, R. MARCUS, S. J. MARX u. J. T. J. POTTS (1972):
Structure, synthesis, and mechanism of action of parathyroid hormone.
Recent Progress in Hormon Research 28, 353-398

BAI, L., J. F. COLLINS u. F. K. GHISHAN (2000):
Cloning and characterization of a type III Na-dependent phosphate cotransporter from mouse intestine.
American Journal of Physiology - Cell Physiology 279, C1135-C1143

BALDOCK, P. A., G. P. THOMAS, J. M. HODGE, S. U. K. BAKER, U. DRESSEL, P. D. O'LOUGHLIN, G. C. NICHOLSON, K. H. BRIFFA, J. A. EISMAN u. E. M. GARDINER (2006):
Vitamin D action and regulation of bone remodeling: suppression of osteoclastogenesis by the mature osteoblast.
Journal of Bone and Mineral Research 21, 1618-1626

BEARDSWORTH, L. J., P. M. BEARDSWORTH u. A. D. CARE (1989):
The effect of ruminal phosphate concentration on the absorption of calcium, phosphorus and magnesium from the reticulo-rumen of the sheep. .
British Journal of Nutrition 61, 715-723

BERNDT, T. J., S. SCHIAVI u. R. KUMAR (2005):
"Phosphatonins" and the regulation of phosphorus homeostasis.
American Journal of Physiology - Renal Physiology 289, F1170-F1182

BERRIDGE, M. J. (1998):
Neuronal calcium signaling.
Neuron 21, 13-26

BOASS, A., S. C. GARNER, V. L. SCHULTZ u. S. U. TOVERUD (1997):
Regulation of serum calcitriol by serum ionized calcium in rats during pregnancy and lactation.
Journal of Bone and Mineral Research 12, 909-914

BÖMKES, D. (2003)
Populationsgenetische Untersuchung von Exterieur- und Milchleistungsmerkmalen bei Bunten und Weißen Deutschen Edelziegen Hannover, Institut für Tierzucht und Vererbungsforschung, Diss.

BORKE, J. L., A. CARIDE, A. K. VERMA, J. T. PENNISTON u. U. R. KUMAR (1990):
Cellular and segmental distribution of Ca^{2+}-pump epitopes in rat intestine.
Pflugers Archiv 417, 120-122

BOSKEY, A. L. (1978):
The rote of calcium-phospholipid-phosphate complexes in tissue mineralization.
Metabolic Bone Disease and Related Research 1, 137-142

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

BRAITHWAITE, G. D., R. F. GLASCOCK u. A. S. RIAZUDDIN (1970):
Calcium metabolism in pregnant ewes.
British Journal of Nutrition 24, 661-670

BRAITHWAITE, G. D. u. A. S. RIAZUDDIN (1971):
The effect of age and level of dietary calcium intake on calcium metabolism in sheep.
British Journal of Nutrition 26, 215-225

BRAITHWAITE, G. D. (1978):
The effect of dietary calcium intake of ewes in pregnancy on their Ca and phosphorus metabolism in lactation.
British Journal of Nutrition 39, 213-218

BRAITHWAITE, G. D. (1983):
Calcium and phosphorus requirements of the ewe during pregnancy and lactation.
British Journal of Nutrition 50, 711-722

BRENZA, H. L. u. H. F. DELUCA (2000):
Regulation of 25-hydroxyvitamin D_3 1α-hydroxylase gene expression by parathyroid hormone and 1,25-dihydroxyvitamin D_3.
Archives of Biochemistry and Biophysics 381, 143-152

BRETSCHER, A. u. K. WEBER (1979):
Villin: the major microfilament-associated protein of the intestinal microvillus.
Proceedings of the National Academy of Sciences 76, 2321-2325

BREVES, G., H. HÖLLER, P. PACKHEISER, G. GÄBEL u. H. MARTENS (1988):
Flux of inorganic phosphat across the sheep rumen wall in vivo and in vitro.
Experimental Physiology 73, 343-351

BRINI, M. u. E. CARAFOLI (2009):
Calcium pumps in health and disease.
Physiological Reviews 89, 1341-1378

BROMMAGE, R. u. H. F. DELUCA (1985):
Regulation of bone mineral loss during lactation.
American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism 248, E182-E187

BRONNER, F. (2003):
Mechanisms of intestinal calcium absorption.
Journal of Cellular Biochemistry 88, 387-393

BROWN, E. M., G. GAMBA, D. RICCARDI, M. LOMBARDI, R. BUTTERS, O. KIFOR, A. SUN, M. A. HEDIGER, J. LYTTON u. S. C. HEBERT (1993):
Cloning and characterization of an extracellular Ca^{2+}-sensing receptor from bovine parathyroid.
Nature 366, 575-580

BRUCE, J., E. D. GOODALL, R. N. B. KAY, A. T. PHILLIPSON u. L. E. VOWLES (1966):
The flow of organic and inorganic materials through the alimentary tract of the sheep.
Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences 166, 46-62

CHAROENPHANDHU, N., L. LIMLOMWONGSE u. N. KRISHNAMRA (2006):
Prolactin directly enhanced Na^{+}/K^{+}- and Ca^{2+}-ATPase activities in the duodenum of female rats.
Canadian Journal of Physiology and Pharmacology 84, 555-563

CHAROENPHANDHU, N., K. WONGDEE u. N. KRISHNAMRA (2010):
Is prolactin the cardinal calciotropic maternal hormone?
Trends in Endocrinology & Metabolism 21, 395-401

COLLINS, J., L. BAI u. F. GHISHAN (2004):
The SLC20 family of proteins: dual functions as sodium-phosphate cotransporters and viral receptors.
Pflügers Archiv European Journal of Physiology 447, 647-652

CROSS, N. A., L. S. HILLMAN, S. H. ALLEN, G. F. KRAUSE u. N. E. VIEIRA (1995):
Calcium homeostasis and bone metabolism during pregnancy, lactation, and postweaning: a longitudinal study.
The American Journal of Clinical Nutrition 61, 514-523

CSAPÓ, J., Z. CSAPÓ-KISS, T. G. MARTIN, J. SZENTPETERI u. G. WOLF (1994):
Composition of colostrum from goats, ewes and cows producing twins.
International Dairy Journal 4, 445-458

DAVIS, S. L., L. E. REICHERT u. G. D. NISWENDER (1971):
Serum levels of prolactin in sheep as measured by radioimmunoassy.
Biology of Reproduction 4, 145-153

DAWSON, D. C. (1979):
Na and Cl transport across the isolated turtle colon: parallel pathways for transmural ion movement.
Journal of Membrane Biology 37, 213-233

DELUCA, H. F., M. F. HOLICK, H. K. SCHNOES, T. SUDA u. R. J. COUSINS (1971):
Isolation and identification of 1,25-dihydroxycholecalciferol. A metabolite of vitamin D active in intestine.
Biochemistry 10, 2799-2804

DITTMER, A. u. J. DITTMER (2006):
Beta-Actin is not a reliable loading control in Western blot analysis.
Electrophoresis 27, 2844-2845

EBASHI, S., M. ENDO u. I. OHTSUKI (1969):
Control of muscle contraction.
Quarterly Reviews of Biophysics 2, 351-384

ETO, N., M. TOMITA u. M. HAYASHI (2006):
NaPi-mediated transcellular permeation is the dominant route in intestinal inorganic phosphate absorption in rats.
Drug Metabolism and Pharmacokinetics 21, 217-221

FARRUGIA, W., C. L. FORTUNE, J. HEATH, I. W. CAPLE u. J. D. WARK (1989):
Osteocalcin as an index of osteoblast function during and after ovine pregnancy.
Endocrinology 125, 1705-1710

FERREIRA, H. G., F. A. HARRISON u. R. D. KEYNES (1966):
The potential and short-circuit current across isolated rumen epithelium of the sheep.
The Journal of Physiology 187, 631-644

FLEET, J. C. u. R. D. SCHOCH (2010):
Molecular mechanisms for regulation of intestinal calcium absorption by vitamin D and other factors.
Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences 47, 181-195

FORTUNE, C. L., W. FARRUGIA, J. TRESHAM, B. A. SCOGGINS u. J. D. WARK (1989):
Hormonal regulation of osteocalcin plasma production and clearance in sheep.
Endocrinology 124, 2785-2790

FRASER, D. R. u. E. KODICEK (1970):
Unique biosynthesis by kidney of a biologically active vitamin D metabolite.
Nature 228, 764-766

FRIEDMAN, P. A. u. F. A. GESEK (1995):
Cellular calcium transport in renal epithelia: measurement, mechanisms, and regulation.
Physiological Reviews 75, 429-471

FUCHS, R. u. M. PETERLIK (1980):
Vitamin D-induced phosphate transport in intestinal brush border membrane vesicles.
Biochemical and Biophysical Research Communications 93, 87-92

GAREL, J. M., A. D. CARE u. J. P. BARLET (1974):
A radioimmunoassay for ovine calcitonin: an evaluation of calcitonin secretion during gestation, lactation and foetal life.
Journal of Endocrinology 62, 497-509

GLASS, C. K. (1994):
Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers.
Endocrine Reviews 15, 391-407

GLIMCHER, M. J. (1959):
Molecular biology of mineralized tissues with particular reference to bone.
Reviews of Modern Physics 31, 359-393

GOFF, J. P. u. R. L. HORST (1997):
Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders
Journal of Dairy Science 80, 2388-2394

GRACE, N. D., M. J. ULYATT u. J. C. MACRAE (1974):
Quantitative digestion of fresh herbage by sheep: III. The movement of Mg, Ca, P, K and Na in the digestive tract.
The Journal of Agricultural Science 82, 321-330

GRACE, N. D., J. H. WATKINSON u. P. L. MARTINSON (1986):
Accumulation of minerals by the foetus(es) and conceptus of single- and twin-bearing ewes.
New Zealand Journal of Agricultural Research 29, 207-222

GUNDBERG, C. M., P. V. HAUSCHKA, J. B. LIAN, P. M. GALLOP u. K. M. FINN WOLD (1984):
Osteocalcin: isolation, characterization, and detection.
Methods in Enzymology 107, 516-544

HALLORAN, B. P., E. N. BARTHELL u. H. F. DELUCA (1979):
Vitamin D metabolism during pregnancy and lactation in the rat.
Proceedings of the National Academy of Sciences 76, 5549-5553

HALLORAN, B. P. u. H. F. DELUCA (1980):
Calcium transport in small intestine during pregnancy and lactation.
American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism 239, E64-E68

HAMANN, H., A. HORSTICK, A. WESSELS u. O. DISTL (2004):
Estimation of genetic parameters for test day milk production, somatic cell score and litter size at birth in East Friesian ewes.
Livestock Production Science 87, 153-160

HATTENHAUER, O., M. TRAEBERT, H. MURER u. J. BIBER (1999):
Regulation of small intestinal Na-Pi type IIb cotransporter by dietary phosphate intake.
American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology 277, G756-G762

HAUSSLER, M. R., G. K. WHITFIELD, C. A. HAUSSLER, J.-C. HSIEH, P. D. THOMPSON, S. H. SELZNICK, C. E. DOMINGUEZ u. P. W. JURUTKA (1998):
The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed.
Journal of Bone and Mineral Research 13, 325-349

HINATA, M. u. J. KIMURA (2004):
Forefront of Na^+/Ca^{2+} exchanger studies: stoichiometry of cardiac Na^+/Ca^{2+} exchanger; 3:1 or 4:1?
Journal of Pharmacological Sciences 96, 15-18

HINTERDING, T. (2002)
Expression der Ca^{2+}-Kanäle ECaC1 und ECaC2 im Dünndarm von Saug- und Absetzferkeln.
Hannover, Physiologisches Institut, Diss.

HOENDEROP, J. G. J. (1999):
Molecular identification of the apical Ca^{2+} channel in 1,25-dihydroxyvitamin D_3-responsive epithelia.
Journal of Biological Chemistry 274, 8375-8378

HOENDEROP, J. G. J., B. NILIUS u. R. J. M. BINDELS (2005):
Calcium absorption across epithelia.
Physiological Reviews 85, 373-422

HOENDEROP J. G. J., R. VENNEKENS, D. MÜLLER, J. PRENEN, G. DROOGMANS, R. J. M. BINDELS u. B. NILIUS (2001):
Function and expression of the epithelial Ca^{2+} channel family: comparison of mammalian ECaC1 and 2.
The Journal of Physiology 537, 747-761

HOENDEROP, J. G. J., B. NILIUS u. R. J. M. BINDELS (2002):
ECaC: the gatekeeper of transepithelial Ca^{2+} transport.
Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics 1600, 6-11

HOENDEROP, J. G. J., T. VOETS, S. HOEFS, F. WEIDEMA, J. PRENEN, B. NILIUS u. R. J. M. BINDELS (2003):
Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca^{2+} channels Trpv5 and Trpv6.
The EMBO Journal 22, 776-785

HOFF, A. O., P. CATALA-LEHNEN, P. M. THOMAS, M. PRIEMEL, J. M. RUEGER, I. NASONKIN, A. BRADLEY, M. R. HUGHES, N. ORDONEZ, G. J. COTE, M. AMLING u. R. F. GAGEL (2002):
Increased bone mass is an unexpected phenotype associated with deletion of the calcitonin gene.
The Journal of Clinical Investigation 110, 1849-1857

HOFMANN, R. R. (1989):
Evolutionary steps of ecophysiological adaptation and diversification of ruminants: a comparative view of their digestive systems.
Oecologia 78, 443-457

HOLICK, M. F. (1981):
The cutaneous photosynthesis of previtamin D_3: a unique photoendocrine system.
Journal of Investigative Dermatology 77, 51-58

HOLICK, M. F., J. A. MACLAUGHLIN, M. B. CLARK, S. A. HOLICK, J. T. POTTS, R. R. ANDERSON, I. H. BLANK, J. A. PARRISH u. P. ELIAS (1980):
Photosynthesis of previtamin D_3 in human skin and the physiologic consequences.
Science 210, 203-205

HÖLLER, H., G. BREVES, H. GERDES u. M. KOCABATMAZ (1988):
Flux of calcium across the sheep rumen wall in vivo and in vitro.
Experimental Physiology 73, 609-618

HOOCK, T. C., P. M. NEWCOMB u. I. M. HERMAN (1991):
Beta actin and its mRNA are localized at the plasma membrane and the regions of moving cytoplasm during the cellular response to injury.
Journal of Cell Biology 112, 653-664

HORST, R. L., J. P. GOFF u. T. A. REINHARDT (2005):
Adapting to the transition between gestation and lactation: differences between rat, human and dairy cow.
Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia 10, 141-156

HUBER, K., C. WALTER, B. SCHRÖDER u. G. BREVES (2002):
Phosphate transport in the duodenum and jejunum of goats and its adaptation by dietary phosphate and calcium.
American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 283, R296-R302

JONES, G., S. A. STRUGNELL u. H. F. DELUCA (1998):
Current understanding of the molecular actions of vitamin D.
Physiological Reviews 78, 1193-1231

JUNGBLUTH, H. u. U. BINSWANGER (1989):
Unidirectional duodenal and jejunal calcium and phosphorus transport in the rat: effects of dietary phosphorus depletion, ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate and 1,25-dihydroxycholecalciferol.
Research in Experimental Medicine (Berl.) 189, 439–449

KARBACH, U. (1992):
Paracellular calcium transport across the small intestine.
The Journal of Nutrition 122, 672-677

KATAI, K., K. MIYAMOTO, S. KISHIDA, H. SEGAWA, T. NII, H. TANAKA, Y. TANI, H. ARAI, S. TATSUMI, K. MORITA, A. Y. TAKETANI u. E. TAKEDA (1999):
Regulation of intestinal Na^+-dependent phosphate co-transporters by a low-phosphate diet and 1,25-dihydroxyvitamin D_3.
Biochemical Journal 1, 705–712

KAY, R. N. (1966):
The influence of saliva on digestion in ruminants.
World Review of Nutrition and Dietetics 6, 292-325

KOVACS, C. S., L. L. CHAFE, M. L. WOODLAND, K. R. MCDONALD, N. J. FUDGE u. P. J. WOOKEY (2002):
Calcitropic gene expression suggests a role for the intraplacental yolk sac in maternal-fetal calcium exchange.
American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism 282, E721-E732

KRAFT, W. u. U. M. DÜRR (1999):
Referenzbereiche.
Schattauer, Stuttgart

KREBS, E. G. u. J. A. BEAVO (1979):
Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes.
Annual Review of Biochemistry 48, 923-959

KRETSINGER, R. H., J. E. MANN u. A. J. G. SIMMONS (1982):
Model of facilitated diffusion of calcium by the intestinal calcium binding protein.
Vitamin D: Chemical, Biochemical and Clinical Endocrinology 233-248

KRISHNAMRA, N., Y. WIRUNRATTANAKIJ u. L. LIMLOMWONGSE (1998):
Acute effects of prolactin on passive calcium absorption in the small intestine by in vivo perfusion technique.
Canadian Journal of Physiology and Pharmacology 76, 161-168

KUMAR, R. u. J. R. THOMPSON (2010):
The regulation of parathyroid hormone secretion and synthesis.
Journal of the American Society of Nephrology 22, 216-224

KUTUZOVA, G. D. u. H. F. DELUCA (2004):
Gene expression profiles in rat intestine identify pathways for 1,25-dihydroxyvitamin D_3 stimulated calcium absorption and clarify its immunomodulatory properties.
Archives of Biochemistry and Biophysics 432, 152-166

LEE, G.-S., K.-Y. LEE, K.-C. CHOI, Y.-H. RYU, S. G. PAIK, G. T. OH u. E.-B. JEUNG (2007):
Phenotype of a calbindin-D_{9k} gene knockout Is compensated for by the induction of other calcium transporter genes in a mouse model.
Journal of Bone and Mineral Research 22, 1968-1978

LIESEGANG, A. (2008):
Influence of anionic salts on bone metabolism in periparturient dairy goats and sheep.
Journal of Dairy Science 91, 2449-2460

LIESEGANG, A., K. RINER u. A. BOOS (2007a):
Effects of gestation and lactation on vitamin D receptor amounts in goats and sheep.
Domestic Animal Endocrinology 33, 190-202

LIESEGANG, A., J. RISTELI u. M. WANNER (2006):
The effects of first gestation and lactation on bone metabolism in dairy goats and milk sheep.
Bone 38, 794-802

LIESEGANG, A., J. RISTELI u. M. WANNER (2007b):
Bone metabolism of milk goats and sheep during second pregnancy and lactation in comparison to first lactation.
Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 91, 217-225

LUTZ, T. u. E. SCHARRER (1991):
Effect of short-chain fatty acids on calcium absorption by the rat colon.
Experimental Physiology 76, 615-618

MONTELL, C., L. BIRNBAUMER u. V. FLOCKERZI (2002):
The Trp channels, a remarkably functional family.
Cell 108, 595-598

MORGAN, E. L., O. J. MACE, P. A. HELLIWELL, J. AFFLECK u. G. L. KELLETT (2003):
A role for $Ca_v1.3$ in rat intestinal calcium absorption.
Biochemical and Biophysical Research Communications 312, 487-493

MROCHEN, N. (2010)
Untersuchungen zur Regulation der jejunalen Calcium-Resorption beim Schaf.
Hannover, Physiologisches Institut, Diss.

MURAYAMA, A., K.-I. TAKEYAMA, S. KITANAKA, Y. KODERA, Y. KAWAGUCHI, T. HOSOYA u. S. KATO (1999):
Positive and negative regulations of the renal 25-hydroxyvitamin D_3 1α-hydroxylase gene by parathyroid hormone, calcitonin, and $1\alpha\text{-}25(OH)_2D_3$ in intact animals.
Endocrinology 140, 2224-2231

MURER, H., N. HERNANDO, I. FORSTER u. J. BIBER (2000):
Proximal tubular phosphate reabsorption: molecular mechanisms.
Physiological Reviews 80, 1373-1409

MURER, H. u. B. HILDMANN (1981):
Transcellular transport of calcium and inorganic phosphate in the small intestinal epithelium.
American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology 240, G409-G416

MUSCHER, A. (2006)
Einfluss der diätetischen Phosphor-Versorgung auf die Parathormon- und Vitamin D_3-Rezeptor-Expression in Niere und Jejunum bei Ziegen.
Hannover, Tierärztliche Hochschule, Diss.

NEMERE, I. (1992):
Vesicular calcium transport in chick intestine.
The Journal of Nutrition 122, 657-661

NEMERE, I. u. A. W. NORMAN (1990):
Transcaltachia, vesicular calcium transport, and microtubule-associated calbindin-D_{28K}: emerging views of 1,25-dihydroxyvitamin D_3-mediated intestinal calcium absorption.
Mineral and Electrolyte Metabolism 16, 109-114

NEMETH, E. F. (1990):
Regulation of cytosolic calcium by extracellular divalent cations in C-cells and parathyroid cells.
Cell Calcium 11, 323-327

NEVILLE, M. C., R. P. KELLER, C. CASEY u. J. C. ALLEN (1994):
Calcium partitioning in human and bovine milk.
Journal of Dairy Science 77, 1964-1975

OETZEL, G. R. (1988):
Parturient paresis and hypocalcemia in ruminant livestock.
The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice 4, 351-364

OSSWALD, C., K. BAUMGARTEN, F. STÄMPEL, V. GORBOULEV, M. AKIMJANOVA, K.-P. KNOBELOCH, I. HORAK, R. KLUGE, H.-G. JOOST u. H. KOEPSELL (2005):
Mice without the regulator gene Rsc1A1 exhibit increased Na^+-d-glucose cotransport in small intestine and develop obesity.
Molecular and Cellular Biology 25, 78-87

PANSU, D., C. BELLATON u. F. BRONNER (1981):
Effect of Ca intake on saturable and nonsaturable components of duodenal Ca transport.
American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology 240, G32-G37

PARK, Y. W., M. JUAREZ, M. RAMOS u. G. F. W. HAENLEIN (2007):
Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk.
Small Ruminant Research 68, 88-113

PENG, J.-B., X.-Z. CHEN, U. V. BERGER, P. M. VASSILEV, H. TSUKAGUCHI, E. M. BROWN u. M. A. HEDIGER (1999):
Molecular cloning and characterization of a channel-like transporter mediating intestinal calcium absorption.
Journal of Biological Chemistry 274, 22739-22746

PETER, R. (1982):
Klinische Chemie.
Karger Verlag, Basel/München

RAMBERG, C. F., D. S. KRONFELD u. A. WILSON (1975):
Regulationof calcium metabolism in cattle during growth, gestation, lactation and changes in diet.
Digestion and metabolism in the ruminant, 231-242

RAMBERG, C. F., G. P. MAYER, D. S. KRONFELD, J. M. PHANG u. A. M. BERMAN (1970):
Calcium kinetics in cows during late pregnancy, parturition, and early lactation.
American Journal of Physiology 219 (5), 1166-1177

RAYSSIGUIER, Y. u. C. PONCET (1980):
Effect of lactose supplement on digestion of lucerne hay by sheep. II. Absorption of magnesium and calcium in the stomach.
Journal of Animal Science 51(1), 186-192

RECHKEMMER, G. (1991):
Transport of weak electrolytes.
Comprehensive Physiology, John Wiley & Sons, Inc.

REIST, M., M. W. PFAFFL, C. MOREL, M. MEYLAN, G. HIRSBRUNNER, J. W. BLUM u. A. STEINER (2003):
Quantitative mRNA analysis of eight bovine 5-HT receptor subtypes in brain, abomasum, and intestine by real-time RT-PCR.
Journal of Receptors and Signal Transduction 23, 271-287

SARKAR, R. B. C. u. U. P. S. CHAUHAN (1967):
A new method for determining micro quantities of calcium in biological materials.
Analytical Biochemistry 20, 155-166

SCHÄGGER, H. u. G. V. JAGOW (1987):
Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa.
Analytical Biochemistry 166, 368-379

SCHRÖDER, B. u. G. BREVES (1996):
Mechanisms of phosphate uptake into brush-border membrane vesicles from goat jejunum.
Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology 166, 230-240

SCHRÖDER, B. u. G. BREVES (2006):
Mechanisms and regulation of calcium absorption from the gastrointestinal tract in pigs and ruminants: comparative aspects with special emphasis on hypocalcemia in dairy cows.
Animal Health Research Reviews 7, 31-41

SCHRÖDER, B., I. RITTMANN, E. PFEFFER u. G. BREVES (1997):
In vitro studies on calcium absorption from the gastrointestinal tract in small ruminants.
Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic and Environmental Physiology 167, 43-51

SCHRÖDER, B., S. VÖSSING u. G. BREVES (1999):
In vitro studies on active calcium absorption from ovine rumen.
Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic and Environmental Physiology 169, 487-494

SCHRÖDER, B., W. GOEBEL, K. HUBER u. G. BREVES (2001):
No effect of vitamin D_3 treatment on active calcium absorption across ruminal epithelium of sheep.
Journal of Veterinary Medicine Series A 48, 353-363

SCOTT, D., F. G. WHITELAW, W. BUCHAN u. L. A. BRUCE (1985):
The effect of variation in phosphorus intake on salivary phosphorus secretion, net intestinal phosphorus absorption and faecal endogenous phosphorus excretion in sheep.
The Journal of Agricultural Science 105, 271-277

SEAMON, K. B., W. PADGETT u. J. W. DALY (1981):
Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells.
Proceedings of the National Academy of Sciences 78, 3363-3367

SHIRAZI-BEECHEY, S. P., R. B. BEECHEY, J. PENNY, S. VAYRO, W. BUCHAN u. D. SCOTT (1991):
Mechanisms of phosphate transport in sheep intestine and parotid gland: response to variation in dietary phosphate supply.
Experimental Physiology 76, 231-241

SIDLER-LAUFF, K., A. BOOS, M. KRAENZLIN u. A. LIESEGANG (2010):
Influence of different calcium supplies and a single vitamin D injection on vitamin D receptor and calbindin D_{9k} immunoreactivities in the gastrointestinal tract of goat kids.
Journal of Animal Science 88, 3598-3610

SINHA, D., F. S. SEAMAN u. P. N. WALSH (1987):
Role of calcium ions and the heavy chain of factor XIa in the activation of human coagulation factor IX.
Biochemistry 26, 3768-3775

SLEPCHENKO, B. M. u. F. BRONNER (2001):
Modeling of transcellular Ca transport in rat duodenum points to coexistence of two mechanisms of apical entry.
American Journal of Physiology - Cell Physiology 281, C270-C281

STEVENSON, J., C. HILLYARD, I. MACINTYRE, H. COOPER u. M. WHITEHEAD (1979):
A physiological role for calcitonin: protection of the maternal skeleton.
The Lancet 314, 769-770

SUZUKI, M., K. ISHIBASHI, G. OOKI, S. TSURUOKA u. M. IMAI (2000):
Electrophysiologic characteristics of the Ca-permeable channels, ECaC and CaT, in the kidney.
Biochemical and Biophysical Research Communications 274, 344-349

TALMAGE, R. V. (1967):
A study of the effect of parathyroid hormone on bone remodeling and on calcium homeostasis.
Clinical Orthopaedics and Related Research 54, 163-174

TANAKA, Y. u. H. F. DELUCA (1973):
The control of 25-hydroxyvitamin D metabolism by inorganic phosphorus.
Archives of Biochemistry and Biophysics 154, 566-574

TANRATTANA, C., N. CHAROENPHANDU, L. LIMLONGWONGSE u. N. KRISHNAMRA (2004):
Prolactin directly stimulated the solvent drag-induced calcium transport in the duodenum of female rats.
Biochimica et Biophysica acta. Biomembranes 1665, 81-91

THOMASSET, M., C. O. PARKES u. P. CUISINIER-GLEIZES (1982):
Rat calcium-binding proteins: distribution, development, and vitamin D dependence.
American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism 243, E483-E488

TUDPOR, K., J. TEERAPORNPUNTAKIT, W. JANTARAJIT, N. KRISHNAMRA u. N. CHAROENPHANDHU (2008):
1,25-Dihydroxyvitamin D_3 rapidly stimulates the solvent-drag-induced paracellular calcium transport in the duodenum of female rats.
The Journal of Physiological Sciences 58, 297-307

USSING, H. H. u. K. ZERAHN (1951):
Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin.
Acta Physiologica Scandinavica 23, 110-127

VAN'T KLOOSTER, A. T. (1976):
Adaptation of calcium absorption from the small intestine of dairy cows to changes in the dietary calcium intake and at the onset of lactation.
Zeitschrift für Tierphysiologie, Tierernährung und Futtermittelkunde 37, 169-182

VAN ABEL, M., J. G. J. HOENDEROP u. R. J. M. BINDELS (2005):
The epithelial calcium channels Trpv5 and Trpv6: regulation and implications for disease.
Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 371, 295-306

VAN ABEL, M., J. G. J. HOENDEROP, A. W.C.M. VAN DER KEMP, J. P. T. M. V. LEEUWEN u. R. J. M. BINDELS (2003):
Regulation of the epithelial Ca^{2+} channels in small intestine as studied by quantitative mRNA detection.
American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology 285, 78-85

VAN ITALLIE, C. M. u. J. M. ANDERSON (2006):
Claudins and epithelial paracellular transport.
Annual Review of Physiology 68, 403-429

WADHWA, D. R. u. A. D. CARE (2002):
The absorption of phosphate ions from the ovine reticulorumen.
The Veterinary Journal 163, 182-186

WERNER, A. u. R. K. H. KINNE (2001):
Evolution of the Na-Pi cotransport systems.
American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 280, R301-R312

WILKENS, M. R., C. KUNERT-KEIL, H. BRINKMEIER u. B. SCHRÖDER (2009):
Expression of calcium channel Trpv6 in ovine epithelial tissue.
The Veterinary Journal 182, 294-300

WILKENS, M. R., N. MROCHEN, G. BREVES u. B. SCHRÖDER (2011):
Gastrointestinal calcium absorption in sheep is mostly insensitive to an alimentary induced challenge of calcium homeostasis.
Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology 158, 199-207

WILKENS, M. R., J. RICHTER, D. R. FRASER, A. LIESEGANG, G. BREVES u. B. SCHRÖDER (2012):
In contrast to sheep, goats adapt to dietary calcium restriction by increasing intestinal absorption of calcium.
Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology 163, 396-406

WILKENS, M. R., N. MROCHEN, G. BREVES u. B. SCHRÖDER (2010):
Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D_3 on calcium and phosphorus homeostasis in sheep fed diets either adequate or restricted in calcium content.
Domestic Animal Endocrinology 38, 190-199

YAMAGISHI, N., Y. AYUKAWA, I. LEE, K. OBOSHI u. Y. NAITO (2005):
Calcium metabolism in cows receiving an intramuscular injection of 1,25-dihydroxyvitamin D_3 combined with prostaglandin F(2α) closely before parturition.
Journal of Veterinary Science 6, 165-167

ZAIDI, M., B. S. MOONGA u. E. ABE (2002):
Calcitonin and bone formation: a knockout full of surprises.
The Journal of Clinical Investigation 110, 1769-1771

Anhang

A. Puffer für die funktionellen Untersuchungen

Name der Lösung	Bestandteile
Darmpuffer „serosal“ (pH 7,4) (Schafe, Ziegen)	113,8 mmol·l^{-1} NaCl 5,4 mmol·l^{-1} KCl 0,2 mmol·l^{-1} 1N HCl 1,2 mmol·l^{-1} $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1,2 mmol·l^{-1} $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 21,0 mmol·l^{-1} $NaHCO_3$ 1,2 mmol·l^{-1} $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 10,0 mmol·l^{-1} Glucose 1,2 mmol·l^{-1} Mannit 7,0 mmol·l^{-1} Hepes 6,0 mmol·l^{-1} Na-Gluconat
Darmpuffer „mukosal” (pH 7,4) (Schafe, Ziegen)	113,6 mmol·l^{-1} NaCl 5,4 mmol·l^{-1} KCl 0,2 mmol·l^{-1} 1N HCl 1,2 mmol·l^{-1} $MgCl_2 \cdot 2H_2O$ 1,2 mmol·l^{-1} $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 21,0 mmol·l^{-1} $NaHCO_3$ 1,2 mmol·l^{-1} $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 1,2 mmol·l^{-1} Mannit 20,0 mmol·l^{-1} Hepes 6,0 mmol·l^{-1} 1N NaOH
Pansenpuffer „serosal“ (pH 7,4) (Schafe)	55,5 mmol·l^{-1} NaCl 5,0 mmol·l^{-1} KCl 2,2 mmol·l^{-1} $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1,2 mmol·l^{-1} $MgCl_2 \cdot 6H_2O$

	0,4 mmol·l^{-1} 1N HCl 1,4 mmol·l^{-1} $NaH_2PO_4 \cdot 1H_2O$ 1,4 mmol·l^{-1} $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 60,0 mmol·l^{-1} Na-Gluconat 10,0 mmol·l^{-1} Glucose (wasserfrei) 0,8 mmol·l^{-1} Mannit 21,0 mmol·l^{-1} $NaHCO_3$
Pansenpuffer „mukosal“ (pH 7,4) (Schafe)	57,0 mmol·l^{-1} NaCl 5,0 mmol·l^{-1} KCl 1,2 mmol·l^{-1} $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1,2 mmol·l^{-1} $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,8 mmol·l^{-1} 1N HCl 1,6 mmol·l^{-1} $NaH_2PO_4 \cdot 1H_2O$ 1,2 mmol·l^{-1} $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 36,0 mmol·l^{-1} Na-Acetat·$3H_2O$ 15,0 mmol·l^{-1} Na-Propionat 9,0 mmol·l^{-1} Na-Butyrat 5,0 mmol·l^{-1} Glucose (wasserfrei) 0,8 mmol·l^{-1} Mannit 21,0 mmol·l^{-1} $NaHCO_3$
Pansenpuffer „serosal“ (pH 7,4) (Ziegen)	50,1 mmol·l^{-1} NaCl 5,0 mmol·l^{-1} KCl 2,2 mmol·l^{-1} $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 4,8 mmol·l^{-1} $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,4 mmol·l^{-1} 1N HCl 1,4 mmol·l^{-1} $NaH_2PO_4 \cdot 1H_2O$ 1,4 mmol·l^{-1} $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 60,0 mmol·l^{-1} Na-Gluconat 10,0 mmol·l^{-1} Glucose

	(wasserfrei) 0,8 mmol·l^{-1} Mannit 21,0 mmol·l^{-1} $NaHCO_3$
Pansenpuffer „mukosal“ (pH 6,4) (Ziegen)	51,6 mmol·l^{-1} NaCl 5,0 mmol·l^{-1} KCl 1,45 mmol·l^{-1} $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 4,8 mmol·l^{-1} $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,8 mmol·l^{-1} 1N HCl 2,3 mmol·l^{-1} $NaH_2PO_4 \cdot 1H_2O$ 0,5 mmol·l^{-1} $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 20,9 mmol·l^{-1} Na-Gluconat 36,0 mmol·l^{-1} Na-Acetat·$3H_2O$ 15,0 mmol·l^{-1} Na-Propionat 9,0 mmol·l^{-1} Na-Butyrat 5,0 mmol·l^{-1} Glucose (wasserfrei) 0,8 mmol·l^{-1} Mannit 2,0 mmol·l^{-1} $NaHCO_3$

B. Puffer und Lösungen für die Präparation von Gesamtmembranen und Bürstensaummembranen

Name der Lösung	Bestandteile
Homogenisierungspuffer (GM)	20 mmol/l Tris basisch 250 mmol/l Saccharose 5 mmol/l EGTA 5 mmol/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ pH 7,5
Homogenisierungspuffer (BSM)	2 mmol/l Tris basisch 50 mmol/l Mannitol pH 7,1
Resuspensionspuffer (GM/BSM)	10 mmol/l Tris basisch 150 mmol/l NaCl pH 7,4

C. Puffer und Lösungen für die Western-Blot-Analyse

Name der Lösung	Bestandteile
3fach Gelpuffer (Calbindin-D_{9k})	3 mol·l^{-1} Tris 1 mol·l^{-1} HCl 0,3% SDS
Anodenpuffer	0,1 mol·l^{-1} Tris
Blottingpuffer	25 mmol·l^{-1} Tris basisch 192 mmol·l^{-1} Glycin 20% v/v Methanol
Denaturierungspuffer	1 ml Glycin 3 ml SDS [10% w/v] 1,25 ml Sammelgelpuffer 0,5 ml ges. Bromphenolblau-Lösung ad 10 ml A. bidest (steril)
Elektrodenpuffer	25 mmol·l^{-1} Tris, basisch 192 mmol·l^{-1} Glycin 0,1% w/v SDS
Kathodenpuffer	0,1 mol·l^{-1} Tris 0,1 mol·l^{-1} Tricin 0,1% v/v SDS
Lämmli-Puffer (Calbindin-D_{9k})	2ml Glycerin 4 ml SDS 4ml [10%ig w/v] 0,1 mmol·$^{-1}$ Tris HCL ph 6,8 0,5 ml gesättigte Bromphenol-Lösung
PBS	137 mmol·l^{-1} NaCl 3 mmol·l^{-1} KCl 2 mmol·l^{-1} KH_2PO_4 9 mmol·l^{-1} Na_2HPO_4
PBST	1 ml Tween 20

	ad 1000 ml PBS
Ponceau Rot-Lösung	20 mg Ponceau R 10 ml Essigsäure (30%)
Sammelgel (4%) **(Calbindin-D_{9k})**	1,25 ml Roti-Gel 40 3,0 ml 3fach Puffer 7,75 ml A. bidest (steril) 90 µl APS (10%) 9 µl TEMED
Sammelgel (4,75%)	1,25 ml Roti-Gel 40 1,25 ml Sammelgelpuffer 7,3 ml A. bidest (steril) 100 µl SDS (10%) 100 µl APS (10%) 5 µl TEMED
Sammelgelpuffer **(pH 6,8)**	1 mol Tris/HCl ad 100 ml A. bidest
Trenngel (8,5%)	2,5 ml Roti-Gel 40 4,32 ml Trenngelpuffer 4,44 ml A. bidest (steril) 114 µl SDS (10%) 92 µl APS (10%) 9,2 µl TEMED
Trenngel (16%) **(Calbindin-D_{9k})**	6,25 ml Roti-Gel 40 5,0 ml 3fach Puffer 1,5 g Glycerol 2,25 ml A. bidest (steril) 50 µl APS (10%) 5 µl TEMED
Trenngelpuffer **(pH 8,8)**	1 $mmol \cdot l^{-1}$ Tris/HCl ad 100 ml A. bidest

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir bei diesem Projekt immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben und diese Arbeit erst möglich gemacht haben.

Mein herzlichster Dank gilt:

…. Herrn Prof. Dr. Gerhard Breves für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe.

…. Herrn Apl. Prof. Dr. Bernd Schröder für die Überlassung des interessanten Themas, die engagierte Betreuung, seine hilfsbereite Art und den Abenden im Vereinsheim des Kleingartenvereins Bischofshol.

…. meinen Mitdoktoranden/-innen Birgit, Imke, Jana, Jens K., Johanna, Maria, und Steffi, die ich in den fast 2 Jahren sehr lieb gewonnen haben und die mir eine immense Hilfe bei diversen Nacht- und Tagschichten waren und bei denen es sich immer gelohnt hat auf einen Kaffee oder zum Frühstück in der Wohnung oder im Doktorandenzimmer vorbeizuschauen.

…. Susi und Caro, den besten Zimmernachbarinnen, die es gibt und die immer ein offenes Ohr für mich hatten.

…. Svenja, für die Ablenkung beim Joggen um den Maschsee selbst bei Minusgraden und die tolle Zeit auf Gran Canaria.

.... Dirk für die immer aufmunternden Worte, den ein oder anderen Kräutertee und die gemeinsamen Kalorimetrie-Übungen.

…. Marion, Kerstin, Karin und Bärbel für die viele Hilfe im Labor, sei es das Pottern diverser Proben, das Bekleben unzähliger Eppies und die aufmunternden Worten bei einem unerschöpflichen Keks-Reservoir.

…. Yvonne, Micha und Carina für die Betreuung der Tiere.

Aber mein allergrößter Dank gilt Mirja, die mir so viel beigebracht und von der ich so viel gelernt habe, die mir immer mir egal, ob es sich um die Vorbereitung eines Vortrags oder Posters, um Laborarbeiten, um die Durchführung des Versuchs oder um das letztendliche Schreiben dieser Doktorarbeit ging bei jeder Tages- und Nachtzeit mit Rat und Tat zur Seite stand und ohne die diese Dissertation nicht das geworden wäre, was sie heute ist. Dafür möchte ich dir ganz herzlich danken.

Auf diesem Wege möchte ich auch meinen Eltern und meinem Bruder Renke danken, dafür, dass sie immer und in allen Lebenslagen für mich da waren und sind und mir immer, wo sie nur konnten geholfen, mich ermutigt und unterstützt haben, nicht nur bei der Doktorarbeit, sondern auch im Studium. Danke, dass es euch gibt!

Dem besten Menschen in meinem Leben möchte ich dafür danken, dass er immer an mich geglaubt und mich unterstützt hat, egal wie hoch die eigenen Zweifel waren und er immer für mich da war. Danke, dass es dich gibt!