

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht .....</b>	<b>4</b>
2.1	Aufbau und Funktion des Vormagensystems des Wiederkäuers .....	4
2.1.1	Histologie des Pansenepithels .....	5
2.1.2	Barriere- und Transportfunktion des Pansenepithels .....	5
2.2	Mikrobieller Proteinabbau und Proteinsynthese im Pansen.....	6
2.2.1	Ammoniakkonzentration im Pansen .....	6
2.2.2	Harnstoffzyklus .....	7
2.2.3	Die Harnstoffsekretion in den Pansen wird durch Transportproteine vermittelt .....	8
2.3	Ammoniak und Ammonium .....	9
2.3.1	Physikalische Eigenschaften .....	9
2.3.2	Umweltbelastung durch Ammoniak-(N).....	11
2.4	Stoffaustausch über Epithelien .....	12
2.4.1	Diffusionstheorie nach Overton .....	12
2.4.2	Epithelialer Transport .....	13
2.4.3	Parazellulärer Transport .....	13
2.4.4	Transzellulärer Transport.....	14
2.4.5	Passiver Transport.....	14
2.4.6	Aktiver Transport.. ..	15
2.4.7	Funktion von Ionenkanälen.. ..	16
2.4.8	Membranpotential .....	16
2.5	Transportprozesse und Transportproteine am Pansenepithel.....	18
2.5.1	Der Transport von Anionen durch Austauscher und Monocarboxylat-Transporter (MCT) ..	19
2.5.2	Die basolaterale Ausschleusung von $\text{Cl}^-$ und $\text{SCFA}^-$ über einen Anionenkanal.....	20
2.5.3	Die $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase .....	20
2.5.4	Die elektroneutrale Natriumresorption am Pansenepithel: Der NHE .....	21
2.5.5	Die elektrogene Natriumleitfähigkeit des Pansenepithels.....	22
2.5.6	Eine nicht-selektive Kationenleitfähigkeit am Pansenepithel .....	22
2.5.7	Die Kaliumleitfähigkeit des Pansenepithels.....	23
2.5.8	Magnesiumkanäle .....	24
2.5.9	Harnstoffsekretion über Harnstofftransporter und Aquaporine (AQP) ..	25
2.6	Ammoniaktransport aus dem Pansen .....	26
2.6.1	Der Einfluss des chemischen und elektrischen Gradienten auf den Efflux von Ammoniak	26

2.6.2	Der Einfluss von kurzkettigen Fettsäuren auf die Resorption von Ammoniak .....	28
2.6.3	Der Einfluss von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ auf die Resorption von Ammoniak.....	29
2.7	Der Transport des Ammonium-Ions ( $\text{NH}_4^+$ ) aus dem Pansen.....	30
2.7.1	Der Einfluss des pH-Wertes auf die Absorptionsrate von Ammoniak .....	30
2.7.2	Der Einfluss der Ammoniumresorption auf den Kurzschlussstrom.....	31
2.7.3	Der Einfluss von Ammonium auf den pH <sub>i</sub> von isolierten Zellen des Pansenepithels.....	32
2.7.4	Der Einfluss von Ammonium auf den elektroneutralen $\text{Na}^+$ -Transport bei unterschiedlichen mukosalen pH-Werten .....	33
2.8	Welche Transportproteine gibt es für Ammoniak und Ammonium? .....	34
2.8.1	$\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ -Austausch über einen NHE-vermittelten Transport .....	35
2.8.2	$\text{NH}_4^+$ -Transport über $\text{K}^+$ -Kanäle .....	35
2.8.3	Rolle der $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase .....	36
2.8.4	$\text{NH}_4^+$ -Transport über $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Transporter.....	37
2.8.5	Rh -Glykoproteine – Säugetieranaloga zu MEP/AMT bei Bakterien, Hefen und Pflanzen .	37
2.8.6	$\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase.....	38
2.8.7	Harnstofftransporter UT-B.....	38
2.8.8	Aquaporine (AQP) .....	39
2.9	Nicht-selektive Kationenkanäle (NSCC) .....	39
2.9.1	TRP-Kanäle – eine nicht-selektive Kationenkanalfamilie.....	40
2.9.2	TRP-Kanäle im Gastrointestinaltrakt. ....	41
2.10	Zusammenfassung für die eigene Fragestellung.....	43
<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>45</b>
3.1	Herkunft des Epithels... ..	45
3.1.1	Gewinnung, Präparation und Transport des Epithels... ..	45
3.2	Ussing-Kammer-Versuche.....	46
3.2.1	Messprinzip. ....	46
3.2.2	Versuchsablauf der Ussing-Kammer-Versuche ....	47
3.2.3	Verwendete Pufferlösungen.....	48
3.3	Bestimmung des $\text{NH}_3$ - und $\text{NH}_4^+$ -Fluxes über das Pansenepithel mittels Ammoniakelektrode. 48	
3.3.1	Aufbau und Messprinzip .....	49
3.3.2	Bestimmung der Elektrodensteilheit .....	50
3.3.3	Messung der Proben mittels Additionsmethode . ....	50
3.3.4	Statistische Auswertung.....	54
3.4	Patch-Clamp-Methode .....	54
3.4.1	Isolierung und Kultivierung von primären Pansenzellen des Rindes .....	54
3.4.2	Trypsinierung der isolierten Pansenepithelzellen .....	55

3.4.3	Aussähen der Zellen.....	55
3.4.4	Prinzip der Patch-Clamp-Methode.. ..	55
3.4.5	Statistische Auswertung.....	64
3.5	Mikroelektrodenteknik.....	65
3.5.1	Aufbau der Mikroelektrode .. ..	65
3.5.2	Elektrophysiologisches Messprinzip.....	66
3.5.3	Messung des pH <sub>i</sub> mit ionenselektiven Mikroelektroden .. ..	68
3.5.4	Elektrophysiologische Messung mit konventionellen, einlumigen Mikroelektroden.....	70
3.5.5	Ablauf des Mikroelektrodenversuchs mit Punktion.....	71
3.5.6	Elektrophysiologische Messung in der Mikroelektrodenapparatur ohne Punktion .. ..	72
3.5.7	Versuchsansätze und Einsatz von Testsubstanzen .. ..	72
3.5.8	Pufferlösungen .. ..	73
3.5.9	Auswertung und Statistik.....	73
4	<b>Ergebnisse</b> .....	75
4.1	Ergebnisse der Ussing-Kammer-Versuche und Messung der Ammoniak-Fluxe mittels Ammoniakelektrode.....	75
4.1.1	Elektrophysiologische Parameter Kurzschlussstrom I <sub>sc</sub> und Gewebeleitfähigkeit G <sub>t</sub> .. ..	75
4.1.2	Der Einfluss von mukosalem Ammoniak auf den serosalen pH-Wert .. ..	76
4.1.3	Ammoniak-Flux über das Pansenepithel des Rindes .. ..	77
4.2	Ergebnisse der Patch-Clamp-Messungen.....	79
4.2.1	Identifizierung der Membranströme unter Standardbedingungen .. ..	80
4.2.2	Messungen mit einer Na-Glukonat Pipettenlösung.....	80
4.2.3	Messungen mit einer K-Glukonat-Pipettenlösung .. ..	85
4.2.4	Vergleichende Betrachtung der Messungen mit Na-Glukonat und K-Glukonat .. ..	89
4.3	Mikroelektrodenresultate .. ..	90
4.3.1	Elektrophysiologische Messungen mit „double-barreled“ Mikroelektroden.....	90
4.3.2	Messungen am Pansenepithel des Schafes.....	91
4.3.3	Messungen am Pansenepithel des Rindes.....	93
4.3.4	Elektrophysiologische Messungen mit konventionellen, einlumigen Mikroelektroden.....	99
4.3.5	Elektrophysiologische Messungen ohne den Einsatz von Mikroelektroden.. ..	102
4.3.6	Untersuchung der Auswirkungen von verschiedenen Substanzen auf die Leitfähigkeit von Kationen über das Pansenepithel des Rindes .. ..	111
5	<b>Diskussion</b> .....	126
5.1	Methodenkritik .. ..	128
5.1.1	Herkunft und Gewinnung des Pansenepithels.....	128

5.1.2	Messung des Ammoniak-Fluxes mittels Ammoniakelektrode nach Inkubation in der Ussing-Kammer .....	130
5.1.3	Patch-Clamp-Technik .. .. .	131
5.1.4	Mikroelektrodenteknik .. .. .	133
5.2	Diskussion der Ergebnisse .. .. .	135
5.2.1	Ammoniak-Fluxe und die Auswirkungen der Resorption von Ammoniak auf den serosalen pH-Wert – Messungen in der Ussing-Kammer .. .. .	135
5.2.2	Identifizierung von Ionenströmen über die Membran von bovinen Pansenepithelzellen in Patch-Clamp-Versuchen .. .. .	136
5.2.3	Der Einfluss des mukosalen pH-Wertes auf die Ammoniakresorption und die Auswirkung auf den $\text{pH}_i$ - Messungen mittels Mikroelektrodenteknik.....	146
5.2.4	Der Effekt von $\text{NH}_4^+$ auf den $I_{\text{sc}}$ - Messung in der modifizierten Ussing-Kammer .....	152
5.2.5	Einfluss von verschiedenen TRP-Modulatoren auf den $\text{NH}_4^+$ -induzierten Kurzschlussstrom über das Pansenepithel .. .. .	155
5.3	Schlussfolgerung.....	162
5.3.1	Entwicklung eines Transportmodells für die Resorption von Ammoniak aus dem Pansen	162
5.3.2	Mögliche physiologische Bedeutung des Ammoniaktransports für den Wiederkäuer ..	165
6	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>167</b>
7	<b>Summary.....</b>	<b>169</b>
8	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>171</b>
9	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>173</b>
10	<b>Anhang.....</b>	<b>196</b>
10.1	Verwendete Materialien und Arbeitsprotokolle .....	196
10.2	Verwendete Pufferlösungen .. .. .	201
10.3	Ergänzende Ergebnistabellen.....	203
11	<b>Publikationsliste.....</b>	<b>206</b>
12	<b>Danksagung.....</b>	<b>208</b>
13	<b>Selbstständigkeitserklärung.....</b>	<b>209</b>