

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Literaturübersicht	4
2.1	Aufbau und Funktion des Vormagensystems des Wiederkäuers 4
2.1.1	Histologie des Pansenepithels..... 5
2.1.2	Barrierefunktion 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 Cl ⁻ und SCFA über einen Anionenkanal..... 20
2.5.3	Die Na ⁺ /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 (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 _i von isolierten Zellen des Pansenepithels.....	32
2.7.4 Der Einfluss von Ammonium auf den elektroneutralen 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 NH_4^+ -Transport über K^+ -Kanäle	35
2.8.3 Rolle der Na^+/K^+ -ATPase	36
2.8.4 NH_4^+ -Transport über $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ -Transporter.....	37
2.8.5 Rh-Glykoproteine – Säugetieranaloge zu MEP/AMT bei Bakterien, Hefen und Pflanzen .	37
2.8.6 H^+/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
3 Material und Methoden.....	45
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 NH_3 - und 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 Mikroelektrodentechnik	65
3.5.1 Aufbau der Mikroelektrode	65
3.5.2 Elektrophysiologisches Messprinzip	66
3.5.3 Messung des pH, 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 Ergebnisse	75
4.1 Ergebnisse der Ussing-Kammer-Versuche und Messung der Ammoniak-Fluxe mittels Ammoniakelektrode	75
4.1.1 Elektrophysiologische Parameter Kurzschlussstrom I_{sc} und Gewebeleitfähigkeit G_t ..	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 Mikroelektrodenergebnisse	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 Diskussion	126
5.1 Methodenkritik	128
5.1.1 Herkunft und Gewinnung des Pansenepithels	128

5.1.2	Messung des Ammomak-Fluxes mittels Ammoniakelektrode nach Inkubation in der Ussing-Kammer	130
5.1.3	Patch-Clamp-Technik ..	131
5.1.4	Mikroelektrodentechnik ..	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 pH_i - Messungen mittels Mikroelektrodentechnik.....	146
5.2.4	Der Effekt von NH₄⁺ auf den I_{sc} - Messung in der modifizierten Ussing-Kammer ..	152
5.2.5	Einfluss von verschiedenen TRP-Modulatoren auf den NH₄⁺-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	Zusammenfassung	167
7	Summary.....	169
8	Abkürzungsverzeichnis	171
9	Literaturverzeichnis	173
10	Anhang.....	196
10.1	Verwendete Materialien und Arbeitsprotokolle	196
10.2	Verwendete Pufferlösungen	201
10.3	Ergänzende Ergebnistabellen.....	203
11	Publikationsliste	206
12	Danksagung	208
13	Selbstständigkeitserklärung.....	209