

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	5
2	Literaturübersicht.....	7
2.1	Anatomie des Pansens	7
2.2	Histologie des Pansenepithels.....	9
2.3	Anatomie des Blättermagens.....	11
2.4	Produktion kurzkettiger Fettsäuren im Pansen.....	13
2.5	Resorption kurzkettiger Fettsäuren am Pansenepithel.....	13
2.5.1	Anstieg der Resorption der kurzkettigen Fettsäuren mit steigender Konzentration	14
2.5.2	Anstieg der Resorption der kurzkettigen Fettsäuren mit steigender Kettenlänge	15
2.5.3	Anstieg der Resorption der kurzkettigen Fettsäuren bei pH-Wert-Erniedrigung.....	15
2.6	Transport kurzkettiger Fettsäuren am Psalter.....	17
2.7	Einfluss auf den intraruminalen pH-Wert.....	17
2.8	Gestörte Resorption kurzkettiger Fettsäuren: Pansenazidose	18
2.9	Transepithelialer Transport.....	20
2.9.1	Parazellulär	20
2.9.2	Transzellulär	20
2.9.2.1	Diffusion	20
2.9.2.2	Elektrochemischer Gradient.....	21
2.9.2.3	Aktiver Transport	21
2.9.2.4	Sekundär aktiver Transport.....	21
2.10	Resorption von Natrium und Chlorid: Modell des resorbierenden Epithels	21
2.11	Transportmechanismen für die Aufnahme kurzkettiger Fettsäuren am Vormagenepithel.....	24
2.11.1	Parazelluläre Resorption	24
2.11.2	Transzelluläre Resorption	25
2.11.2.1	Apikale Aufnahme der protonierten, undissoziierten Form der kurzkettigen Fettsäuren (HSCFA)	25
2.11.2.2	Apikale Aufnahme der kurzkettigen Fettsäureanionen (SCFA)	26
2.11.2.2.1	Monocarboxylat-Transporter (MCT)	26
2.11.2.2.2	Der Chlorid-Bikarbonat Austauscher (Cl/HCO_3^- -Anionenexchanger)	26
2.11.2.2.3	Der Natrium-Protonen-Austauscher (Na^+/H^+ -Exchanger, NHE)	28
2.12	Zusammenfassung der apikalen Aufnahmemechanismen für kurzkettige Fettsäuren	28
2.13	Intrazellulärer Metabolismus der kurzkettigen Fettsäuren in den Vormagenepithelzellen	29
2.14	Mechanismen für die basolaterale Ausschleusung der kurzkettigen Fettsäuren.....	31
2.14.1	Basolaterale Ausschleusung der protonierten, undissoziierten kurzkettigen Fettsäuren (HSCFA)	31
2.14.2	Basolaterale Ausschleusung der kurzkettigen Fettsäureanionen.....	32
2.14.2.1	Basolateraler Anionenaustausch	32
2.14.2.2	Der Monocarboxylat-Transporter 1	32
2.14.2.3	Der basolaterale Anionenkanal	32
2.15	Zusammenfassung für die eigene Fragestellung.....	35

3 Material und Methoden	37
3.1 Überblick	37
3.2 Material	37
3.2.1 Verwendete Gewebe	37
3.3 Methoden	37
3.3.1 Gewinnung und Kultivierung der Pansenepithelzellen	37
3.4 Etablierung einer neuen Methode zur Isolierung von Psalterepithelzellen	38
3.5 Immunhistochemie	40
3.6 Elektrophysiologische Messungen: Patch-Clamp-Technik	41
3.6.1 Überblick	41
3.6.2 Prinzip der Patch-Clamp-Technik	41
3.6.3 Patch-Clamp Konfigurationen	42
3.6.4 Detaillierter Versuchsaufbau	44
3.6.5 Arbeitskammer und Badperfusion	44
3.6.6 Zulauf und Ablauf	44
3.6.7 Patchpipette	45
3.6.8 Messelektroden	45
3.7 Ablauf der Patch-Clamp-Experimente	45
3.8 Vorzeichenkonvention	46
3.9 Ruhemembranpotential	47
3.9.1 Nernst-Gleichung in der Biologie	47
3.10 Pulsprotokolle	48
3.11 Analyse der Patch-Clamp Daten	50
3.11.1 Liquid Junction Potentials (LJP)	50
3.11.2 Auswärtsstrom in Prozent	50
3.11.3 Umkehrpotential	50
3.11.4 Relative Permeabilität	51
3.11.5 Identifizierung der Ionenströme über die Membran	51
3.11.6 Strom-Spannungs-Kurven	51
3.11.6.1 Rektifizierend	52
3.11.6.2 Einwärtsrektifizierend	53
3.11.6.3 Auswärtsrektifizierend	53
3.11.6.4 Einzelkanalleitfähigkeit	53
3.12 Statistische Analyse	53
4 Ergebnisse	54
4.1 Etablierung einer neuen Methode zur Isolierung von Pansen- und Psalterepithelzellen	54
4.2 Fraktionierte Trypsinierung zur Bestimmung der optimalen Trypsineinwirkzeit	55
4.3 Immunhistochemische Charakterisierung der isolierten Pansen und Psalterepithelzellen	57
4.3.1 Färbung der Zytokeratine	57
4.3.2 Immunhistochemische Färbung der Tight Junction Proteine	58
4.4 Ergebnisse der Patch-Clamp-Experimente	64
4.4.1 Ganzzellmessungen an isolierten Pansenepithelzellen	64
4.4.1.1 Chlorideleitfähigkeit	64
4.4.1.2 Kanalblocker	67
4.4.1.2.1 DIDS	67
4.4.1.2.2 NPPB	67
4.4.1.2.3 Gadolinium	67
4.4.1.2.4 Arachidonsäure	67
4.4.1.2.5 Ionomycin	68
4.4.1.2.6 Glibenclamid	69
4.4.2 Propionateleitfähigkeit	71
4.4.2.1 Statistische Datenauswertung	75
4.4.2.2 Absolutwerte der bei Depolarisation gemessenen Ströme (pA)	76

4.4.2.3	Normierung des Auswärtsstroms auf die Kapazität (oc).....	77
4.4.2.4	Normierung auf den Ausgangswert: Auswärtsströme (in %)	79
4.4.2.5	Effekte der eingesetzten Kanalblocker	80
4.4.2.5.1	DIDS	80
4.4.2.5.2	pCMBs	80
4.4.2.5.3	Effekte der eingesetzten Kanalblocker auf das Umkehrpotential	82
4.4.3	Möglicher Kationenkanal	83
4.4.4	Hypoosmolare Natriumchloridlösung 50 %.....	86
4.4.5	Butyrateleitfähigkeit	87
4.4.6	Laktateleitfähigkeit	89
4.4.7	Vergleich der Leitfähigkeit der Fettsäureanionen Azetat, Propionat und Butyrat	91
4.4.8	Leitfähigkeit für die Halide Iodid, Bromid und Fluorid	94
4.4.9	Ganzzellmessungen an isolierten Psalterepithelzellen.....	97
4.4.9.1	Leitfähigkeit für Chlorid und für Azetat.....	97
4.4.9.2	Vergleich der Auswärtsströme der Fettsäureanionen am Psalter.....	101
4.4.9.3	Gegenüberstellung der Leitfähigkeit an Pansen- und Psalterepithelzellen.....	102
4.4.10	Einzelkanalmessungen.....	104
4.4.10.1	Einzelkanalmessungen an isolierten Pansenepithelzellen	104
4.4.10.2	Zusammenfassung der Einzelkanalmessungen im Strom-Spannungs Diagramm	106
4.4.10.3	Einzelkanalmessungen an isolierten Psalterepithelzellen	107
4.4.10.4	Vergleich der Einzelkanalmessungen an Pansen- und Psalterepithelzellen.....	108
4.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	109
5	Diskussion.....	111
5.1	Einführung	111
5.2	Zellisolierung.....	113
5.2.1	Verbesserung der bisherigen Isolierungsmethode für Pansenepithelzellen	113
5.2.2	Isolierung der Psalterepithelzellen	113
5.3	Charakterisierung der Pansen- und Psalterepithelzellen.....	113
5.3.1	HE-Färbung	113
5.3.2	Färbung der Zytokeratine	114
5.3.3	Färbungen der Tight Junction Proteine.....	114
5.4	Patch-Clamp-Technik	115
5.4.1	Methode zur Untersuchung einzelner Ionenkanäle	115
5.4.2	Verwendete Lösungen in den Patch-Clamp-Experimenten	115
5.4.3	Ganzzellkonfiguration	116
5.4.4	Einzelkanalmessungen	117
5.4.5	Inside-Out-Konfiguration	117
5.5	Zusammenfassung der Ergebnisse der Patch-Clamp-Experimente	118
5.5.1	Ganzzellmessungen an isolierten Pansenepithelzellen.....	118
5.5.2	Chlorideleitfähigkeit	118
5.5.3	Propionateleitfähigkeit	118
5.5.4	Butyrateleitfähigkeit	119
5.5.5	Laktateleitfähigkeit	119
5.5.6	Vergleich der Leitfähigkeiten der kurzketten Fettsäureanionen an isolierten Pansenepithelzellen	119
5.5.7	DIDS	119
5.5.8	Andere Anionenkanalblocker	122
5.5.8.1	NPPB	122
5.5.8.2	Glibenclamid	122
5.5.8.3	pCMBs	122
5.5.9	Weitere Kanalmodulatoren	123

5.5.10 Halide.....	123
5.6 Einzelkanalmessungen an isolierten Pansenepithelzellen	126
5.7 Ganzzellmessungen an isolierten Psalterepithelzellen.....	126
5.7.1 Chloridleitfähigkeit	126
5.7.2 Azetatlleitfähigkeit.....	127
5.7.3 Weitere kurzkettige Fettsäureanionen	127
5.8 Einzelkanalmessungen an isolierten Psalterepithelzellen	127
5.9 Ionenkanäle	127
5.9.1 CIC Familie	128
5.9.2 CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator)	129
5.9.3 Maxi-Anionen Kanäle.....	130
5.10 Diskussion verschiedener Zellmodelle zum Transport kurzkettiger Fettsäuren am Vormagenepithel.....	131
5.10.1 Klassischer Transport der undissoziierten protonierten kurzkettigen Fettsäuren (HSCFA) allein über Lipiddiffusion.....	131
5.10.2 Transport der kurzkettigen Fettsäureanionen über einen SCFA ⁻ / HCO ₃ ⁻ Austauscher.....	133
5.10.3 MCT 1	134
5.11 Bedeutung des Anionenkanals für den Pansen / den Wiederkäuer	136
5.12 Zusammenfassung und Zellmodell.....	136
6 Zusammenfassung	139
7 Summary.....	142
8 Literaturverzeichnis.....	145
9 Abkürzungsverzeichnis	169
10 Anhang	170
10.1 Protokoll zur Kultivierung von Pansenepithelzellen	170
10.1.1 Gewinnung des Pansenepithels	170
10.1.2 Trypsinierung der Pansenzotten.....	170
10.1.3 Aussähen der Zellen	170
10.1.4 Kollagenisierung der Zellkulturschalen	171
10.1.5 Zellkulturmedien	171
10.1.6 Trypsinierung der Pansenepithelzellen.....	171
10.1.7 Sterilisieren der Deckgläser	172
10.1.8 Aussähen der Zellen auf Deckgläser	172
10.2 Übersicht der für die Zellkultur verwendeten Materialien.....	172
10.3 Detailliertes Protokoll für die Immunhistochemischen Färbungen	173
10.4 Genaue Zusammensetzung der Bad - und Pipettenlösungen	174
10.4.1 Ganzzellmessungen	174
10.4.2 Einzelkanalmessungen	174
11 Publikationsliste	175
12 Danksagung.....	177
13 Selbstständigkeitserklärung	178