

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie

des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**In vitro Untersuchung
über den
Peptidtransport im Vormagenepithel des Schafes**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Jana Kudritzki
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2000

Journal-Nr.: 2400

Gedruckt mit Genehmigung des
Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin.

Dekan: Univ. Prof. Dr. K. Hartung
1. Gutachter: Univ. Prof. Dr. H. Martens
2. Gutachter: Univ. Prof. Dr. O. Simon

Tag der Promotion: 29. 5. 2000

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
2	Literatur	8
2.1	<u>Epithelialer Transport und Gewebewiderstand</u>	8
2.2	<u>Protonen-gekoppelter Peptidtransport in Darm und Niere</u>	9
2.3	<u>Proteinspaltung und Resorption im Vormagen</u>	13
2.4	<u>Untersuchungen zur Peptidresorption aus den Vormägen</u>	16
2.4.1	<u>Durchblutungsmessungen</u>	16
2.4.2	<u>Peptidtransport isolierter Epithelien</u>	18
2.5	<u>Exprimiertes Transportprotein in <i>Xenopus leavis</i> Oocyten</u>	19
2.6	<u>Zusammenfassung und eigene Fragestellung</u>	20
3	<u>Material und Methoden</u>	21
3.1	<u>Versuchstiere</u>	21
3.2	<u>Gewinnung des Epithels</u>	21
3.3	<u>Inkubationstechnik</u>	22
3.4	<u>Elektrophysiologisches Meßprinzip</u>	23
3.4.1	<u>Messung unter "Open-circuit-Bedingungen"</u>	24
3.4.1.1	<u>Berechnung des transmuralen Stroms I_t</u>	24
3.4.2	<u>Messung unter "short-circuit-Bedingungen"</u>	24
3.5	<u>Versuchsablauf</u>	25
3.5.1	<u>Elektrophysiologische Messungen</u>	25
3.5.2	<u>Messung der Peptidfluxe</u>	25
3.6	<u>Messung intrazellulärer pH-Werte</u>	27
3.6.1	<u>Kultivierung der Pansenepithelzellen</u>	27
3.6.2	<u>Messung intrazellulärer Ionenkonzentrationen</u>	27
3.6.3	<u>Gewinnung und Quantifizierung der Fluoreszenzdaten</u>	28
3.7	<u>Chemikalien und Bezugsquellen</u>	28
3.7.1	<u>Inkubationslösungen</u>	28
3.7.2	<u>Pharmaka</u>	29
3.8	<u>Statistik</u>	29
3.8.1	<u>Elektrophysiologische Messungen</u>	29
3.8.2	<u>Messung der Transportraten von radioaktiv markiertem Peptid</u>	30

4	<u>Ergebnisse</u>	32
4.1	<u>Elektrophysiologische Messungen</u>	32
4.1.1	<u>Heu gefütterte Tiere (HF-Tiere)</u>	32
4.1.1.1	<u>pH 7,4 auf der mucosalen Kammerseite</u>	32
4.1.1.1.1	<u>Pansenepithel</u>	32
4.1.1.1.2	<u>Psalterepithel</u>	34
4.1.1.2	<u>pH 6,4 auf der mucosalen Kammerseite</u>	38
4.1.1.2.1	<u>Pansenepithel</u>	38
4.1.1.2.2	<u>Psalterepithel</u>	38
4.1.2	<u>Krafftutter gefütterte Tiere (KF-Tiere)</u>	41
4.1.2.1	<u>pH 7,4 auf der mucosalen Kammerseite</u>	41
4.1.2.1.1	<u>Pansenepithel</u>	41
4.1.2.1.2	<u>Psalterepithel</u>	42
4.1.2.2	<u>pH 6,4 auf der mucosalen Kammerseite</u>	44
4.1.2.2.1	<u>Pansenepithel</u>	44
4.1.2.2.2	<u>Psalterepithel</u>	44
4.1.3	<u>Zusammenfassung der Ergebnisse der elektrophysiologischen Messungen</u>	47
4.2	<u>Messung der Transportraten von radioaktiv markiertem Peptid</u>	48
4.2.1	<u>Peptidtransport vor Zugabe anderer Substanzen</u>	48
4.2.1.1	<u>Verlauf der elektrophysiologischen Parameter</u>	48
4.2.1.2	<u>Peptidtransportraten am Pansenepithel</u>	48
4.2.1.2.1	<u>Passage von der mucosalen zur serosalen Seite des Epithels (J_{ms})</u>	49
4.2.1.2.2	<u>Passage von der serosalen zur mucosalen Seite des Epithels (J_{sm})</u>	51
4.2.1.3	<u>Peptidtransportraten am Psalterepithel</u>	52
4.2.1.3.1	<u>Passage von der mucosalen zur serosalen Seite des Epithels (J_{ms})</u>	52
4.2.1.3.2	<u>Passage von der serosalen zur mucosalen Seite des Epithels (J_{sm})</u>	54
4.2.2	<u>Peptidtransport nach Zugabe von Ouabain</u>	55
4.2.2.1	<u>Verlauf der elektrophysiologischen Parameter</u>	55
4.2.2.2	<u>Peptidtransportraten am Pansenepithel</u>	55
4.2.2.3	<u>Peptidtransportraten am Psalterepithel</u>	58
4.2.3	<u>Peptidtransport nach Zugabe von Mannit</u>	61
4.2.3.1	<u>Verlauf der elektrophysiologischen Parameter</u>	61
4.2.3.2	<u>Peptidtransportraten am Pansenepithel</u>	63
4.2.3.3	<u>Peptidtransportraten am Psalterepithel</u>	67

4.2.4	<u>Darstellung der Transportraten in Abhängigkeit von der Leitfähigkeit (G_i)</u>	69
4.2.4.1	<u>Transport am Pansenepithel von mucosal nach serosal (J_{ms})</u>	70
4.2.4.2	<u>Transport am Pansenepithel von serosal nach mucosal (J_{sm})</u>	70
4.2.4.3	<u>Transport am Psalterepithel von mucosal nach serosal (J_{ms})</u>	72
4.2.4.4	<u>Transport am Psalterepithel von serosal nach mucosal (J_{sm})</u>	73
4.2.5	<u>Zusammenfassung der Ergebnisse der Messung der Transportraten von radioaktiv markiertem Peptid</u>	75
4.3	<u>Messung des intrazellulären pH (pH_i) an isolierten Zellen des Pansenepithels</u> ..	77
4.3.1	<u>Messung des pH_i bei einem Umgebungs pH von 7,4</u>	77
4.3.2	<u>Messung des pH_i bei einem Umgebungs pH von 6,4</u>	78
5	<u>Diskussion</u>	80
5.1	<u>Eigene Ergebnisse</u>	80
5.1.1	<u>Mechanismus des Protonen-gekoppelten Peptidtransporters</u>	80
5.1.2	<u>Ergebnisse der Elektrophysiologie</u>	80
5.1.2.1	<u>Heu gefütterte Tiere</u>	80
5.1.2.2	<u>Kraftfutter gefütterte Tiere</u>	81
5.1.2.3	<u>Zusammenfassung der Ergebnisse der Elektrophysiologie</u>	81
5.1.3	<u>Ergebnisse der Messungen der Transportraten von radioaktiv markiertem Peptid</u>	82
5.1.3.1	<u>Peptidtransportraten am Pansenepithel</u>	82
5.1.3.1.1	<u>Peptidtransport unter Kontrollbedingungen</u>	82
5.1.3.1.2	<u>Peptidtransporte mit und ohne Ouabain</u>	83
5.1.3.1.3	<u>Ergebnisse nach Mannitzugabe am Pansenepithel</u>	84
5.1.3.2	<u>Peptidtransportraten am Psalterepithel</u>	86
5.1.3.2.1	<u>Peptidtransportraten unter Kontrollbedingungen</u>	86
5.1.3.2.2	<u>Zugabe von Ouabain</u>	86
5.1.3.2.3	<u>Mannitzugabe</u>	87
5.1.4	<u>Erhöhte Streuung der Transportraten in Richtung J_{sm} am Pansenepithel</u>	87
5.1.5	<u>Vergleich der Membranwiderstände des Pansen- und Psalterepithels</u>	89
5.1.6	<u>Diskussion der Ergebnisse der Messungen des intrazellulären pH-Wertes</u>	91
5.1.6.1	<u>Messung des pH_i bei einem extrazellulären pH von 7,4</u>	92
5.1.6.2	<u>Messung des pH_i bei einem extrazellulären pH von 6,4</u>	92
5.1.7	<u>Zusammenfassung der Diskussion eigener Ergebnisse</u>	93
5.2	<u>Diskussion der Ergebnisse und Hypothesen anderer Arbeitsgruppen</u>	94

5.2.1	<u>In vitro Ergebnisse WEBB et al.</u>	94
5.2.1.1	<u>Anmerkungen zum Versuchsansatz</u>	94
5.2.1.2	<u>Vergleich der Ergebnisse</u>	94
5.2.1.3	<u>Umrechnung der Transportraten auf die gesamte Epithelfläche des Pansen- und des Psalters</u>	95
5.2.1.4	<u>Vergleich der ermittelten Transportraten für Peptid mit den Transportraten von Mg und Na</u>	97
5.2.2	<u>Die Annahme des Transportmechanismus wurde aus Durchblutungsmessungen abgeleitet</u>	98
5.2.3	<u>Exprimiertes Transportprotein in <i>Xenopus laevis</i> Oocyten (siehe auch Kap.1)</u>	100
6	<u>Zusammenfassung</u>	100
6.1	<u>Zusammenfassung</u>	100
6.2	<u>Summary</u>	102
7	<u>Literatur</u>	104
8	<u>Anhang</u>	110
8.1	<u>Pufferzusammensetzungen</u>	110
8.2	<u>Epithelgewichte</u>	112

8 Anhang

8.1 Pufferzusammensetzungen

Alle angegebenen Konzentrationen sind in mmol / l angegeben. Alle Pufferlösungen wurden mit Carbogen begast. Der pH-Wert wurde mit 0,5 mmol/l MES so eingestellt, daß er bei 38° C 7,4 betrug. Die Osmolaritäten wurden mit Mannit auf 280 mosmol/l eingestellt.

Transportpuffer:

		Konz [mmol/l]
	NaCl	115,00
	NaHCO ₃	25,00
	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	0,40
	Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	2,40
	KCl	5,00
Glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆ ·H ₂ O	5,00
	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	1,20
	MgCl ₂ · 6 H ₂ O	1,20

Puffer für die elektrophysiologischen Messungen:

Dieser Puffer diente zum einen als Kontrollpuffer für die Funktionsprüfungen vor Beginn der jeweiligen Messungen, als auch nach Zugabe der jeweils zu testenden Substanzen als Versuchspuffer. Seine Osmolarität betrug 300 mosmol pro Liter.

	Kontrolle	Konz. mmol/l
	NaCl	25,00
	NaHCO₃	25,00
	NMDG Cl	30,00
	KH ₂ PO ₄	1,00
	K ₂ HPO ₄ · 3 H ₂ O	2,00
Glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆ · H ₂ O	10,00
	Na-acetat	25,00
	Na-prop	10,00
	Na-but	5,00
Mannit	C ₆ H ₁₄ O ₆	30,00
	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	1,00
	MgCl ₂ · 6 H ₂ O	1,00

Puffer für die Messungen der Transportraten von D-Phenylalanyl-L-Alanin [2,3-³H]

Die pH-Absenkung wurde ebenfalls mit 0,5 mmol/l MES durchgeführt. Die Osmolarität betrug 300 mosmol/l.

	Kontrolle ³ H Versuche	Konz. mmol/l
	NaCl	55,00
	NaHCO₃	25,00
	KH ₂ PO ₄	1,00
	K ₂ HPO ₄ · 3 H ₂ O	2,00
Glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆ · H ₂ O	10,00
	Na-acetat	25,00
	Na-prop	10,00
	Na-but	5,00
	Phen-Ala-Ala	2,00
Mannit	C ₆ H ₁₄ O ₆	30,00
	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	1,00
	MgCl ₂ · 6 H ₂ O	1,00

8.2 Epithelgewichte

	Feuchtgewicht /3,14 cm ² in g	Gewicht/1cm ² in g	Trockengewicht /3,14 cm ² in g	Gewicht/1cm ² in g
Psalter	0,176		0,030	
	0,195		0,029	
	0,181		0,033	
Mittelwert	0,184	0,058	0,030	0,009
Pansen	0,201		0,042	
	0,284		0,048	
	0,347		0,052	
Mittelwert	0,277	0,088	0,050	0,016

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die dazu beigetragen haben, daß diese Arbeit in vorliegender Form entstehen konnte.

Herrn Prof. Dr. H. Martens für die Überlassung des interessanten Themas und die hervorragende Betreuung.

Frau Dr. M. Schweigel und Almut Böttcher für die Durchführung der intrazellulären pH-Messungen deren Ergebnisse in dieser Arbeit verwendet wurden.

Frau K. Wolf für die Einweisung in die Laborarbeit, Ihre Hilfe bei der Durchführung und Auswertung der Versuche, sowie für das Korrigieren dieser Arbeit.

Frau Plaumann für die Hilfe bei der Textverarbeitung und für das Korrigieren dieser Arbeit.

Frau Dr. Dahms vom Institut für Biometrie und Informationsverarbeitung des Fachbereiches Veterinärmedizin der FU Berlin für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten.

Allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Veterinär Physiologie der FU Berlin für die freundliche Aufnahme, große Hilfsbereitschaft und sehr angenehme Atmosphäre.

Herrn Alexander Radtke für die Hilfe beim Drucken dieser Arbeit.

Meinen Eltern, die durch Ihre finanzielle Unterstützung die Durchführung dieser Arbeit ermöglichten.

Lebenslauf

Name: Jana Kudritzki

Geburtsdatum/-ort: 4.6.1970 in Berlin

Familienstand: ledig

Ausbildung:

Schulbildung:

Grundschule Schellhorn, 1976-1980

Friedrich-Schiller Gymnasium, Preetz, 1980-1982

Gymnasium Bad Tölz, 1982-1988

Fachoberschule München, Ausbildungsrichtung:

Kunst und Gestaltung, 1988-1990

Abschluß: Fachabitur 1990

Hemann-Hesse Gymnasium, Berlin, 1990-1992

Abschluß: Abitur: 1992

Studium:

Veterinärmedizin an der FU-Berlin, 1992-1998

Abschluß: Staatsexamen, 5. 8. 1998

Promotionsstudium am Fachbereich für Veterinärphysiologie der FU Berlin ab Oktober 1998.

Auslandsaufenthalte: 3 monatiger Aufenthalt in Australien mit Praktika bei:

Innisfail Veterinary Surgery

Veterinary services, Malanda

Sprachkenntnisse: Englisch: fließend, Französisch und Spanisch: Grundlagen

Berufliche Tätigkeit:

Assistentin in der tierärztlichen Praxis für Pferde, Katrin Fechner, in 14913 Liepe
ab Juli 1999