

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Untersuchung über die Beteiligung von nicht-selektiven Kationenkanälen
am Ammoniaktransport über das Pansenepithel des Rindes**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Julia Rosendahl
Tierärztin aus Bonn

Berlin 2014

Journal-Nr.: 3723

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: PD Dr. Friederike Stumpff
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Robert Klopfleisch
Dritter Gutachter: PD Dr. Christoph Gabler

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):
ammonia, ammonium, rumen, pH, ruminants, cows, transport, cations, ion
channels, thymol, menthol, capsaicin, camphor, electrophysiology, sheep

Tag der Promotion: 17.11.2014

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen
Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über
<<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-548-0

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2014

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder
Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in
irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet,
vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch
ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der
Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von
jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written
authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2014

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Meiner Familie

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	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 Austauschere 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 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Transporter	37
2.8.5	Rh -Glykoproteine – Säugetieranaloga 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	Mikroelektrodentchnik	65
3.5.1	Aufbau der Mikroelektrode.....	65
3.5.2	Elektrophysiologisches Messprinzip.....	66
3.5.3	Messung des pH_i 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 Ammoniak-elektrode.....	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	Mikroelektrodenenergebnisse.....	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 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 pH_i - Messungen mittels Mikroelektrodenteknik.....	146
5.2.4	Der Effekt von NH_4^+ auf den I_{sc} - Messung in der modifizierten Ussing-Kammer	152
5.2.5	Einfluss von verschiedenen TRP-Modulatoren auf den 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	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

1 Einleitung

Wiederkäuer verfügen über ein dreigliedriges Vormagensystem. Den größten Teil dieses Vormagensystems bildet der Pansen, eine mit Bakterien und Mikroorganismen besiedelte Gärkammer. Die Pansenmikroben ermöglichen dem Wiederkäuer die Spaltung von zellulosehaltigen Pflanzenbestandteilen in Kohlenhydrate. Diese werden wiederum über Pyruvat bis hin zu kurzkettigen Fettsäuren gespalten, die nach Resorption über das Pansenepithel zur Versorgung des Wiederkäuers mit Energie dienen. Von zentraler Bedeutung ist bei diesem Vorgang ferner die mikrobielle Synthese von Proteinen, die in der Regel eine höhere biologische Wertigkeit aufweisen als das Futterprotein. Zum Erbringen einer optimalen Syntheseleistung benötigen die Mikroorganismen neben einer möglichst konstanten Körpertemperatur und ausreichend Energie in Form von fermentierbaren Kohlenhydraten vor allem eine konstante Stickstoffversorgung im Pansen.

Als Stickstoffquelle für die mikrobielle Proteinsynthese dient zunächst das mit dem Futter aufgenommene Protein, welches vor der Verwertung in Spaltprodukte bis hin zum Ammoniak abgebaut wird. Neben dem Futterprotein kann auch sogenannter „Nicht-Protein-Stickstoff“ (Non-Protein-Nitrogen, NPN) zur mikrobiellen Proteinsynthese verwendet werden. Von besonderer Bedeutung ist diesbezüglich der über die Pansenwand und über den Speichel in den Pansen gelangende Harnstoff (Harmeyer und Martens 1980; Kennedy und Milligan 1980; Abdoun et al., 2006; Reynolds und Kristensen 2008).

Stets wird lediglich ein Teil des im Pansen aus Futterproteinen oder anderen Quellen stammenden Ammoniaks in mikrobielles Protein eingebaut. Schätzungsweise 50 bis 70 % des im Pansen entstehenden Ammoniaks werden über die Pansenwand des Schafes resorbiert, zur Leber transportiert und dort über den Harnstoffzyklus entgiftet (Pilgrim et al., 1969). Dieser Harnstoff wird in der Folge entweder über die Niere ausgeschieden oder gelangt über den ruminohepatischen Kreislauf zurück in den Pansen. Bei der heute üblichen proteinreichen Fütterung wird nur ein Teil dieses Harnstoff-Stickstoffs im Pansen zur Proteinsynthese herangezogen; erhebliche Mengen werden erneut in Ammoniak umgewandelt, resorbiert und müssen nochmals in der Leber entgiftet werden. Auf diese Weise können täglich über 20 Mol Stickstoff zwischen dem Gastrointestinaltrakt und der Leber der Hochleistungskuh zirkulieren

(Delgado-Elorduy et al., 2002a; Delgado-Elorduy et al., 2002b). Bei jedem dieser Zyklen wird im Verlauf der Harnstoffsynthese Energie (4 ATP pro synthetisiertem Harnstoffmolekül) aufgewendet und stets wird ein gewisser Anteil des Harnstoffs über die Niere in die Umwelt ausgeschieden. Der Nettoeffekt ist eine für das Rind energieaufwendige Umwandlung von Futterprotein in eine Umweltnoxe. In diesem Zusammenhang ist es aus physiologischer und auch ökologischer Sicht sehr interessant, welches die zugrundeliegenden Mechanismen sind und ob sie beeinflusst werden können.

Sowohl der intraruminale pH-Wert als auch die Gesamtammoniakkonzentration sind fütterungsabhängig und unterliegen damit starken Schwankungen. So kann die Konzentration von Ammoniak im Pansen von Werten von unter $3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Satter und Slyter 1974) bis auf Werte von über $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ansteigen (Wernli und Wilkins 1980; Leonhard-Marek et al., 2010). Klassisch wird davon ausgegangen, dass ein Grund für die hohen Resorptionsraten von Ammoniak aus dem Pansen die Entsorgung dieser zwar lebensnotwendigen, im Übermaß aber giftigen Substanz ist; allerdings erfordern die hohen Effluxraten von Ammoniak aus dem Pansen in der Praxis eine Zufütterung von Protein, um die erwünschte Stickstoffkonzentration im Pansen für eine ungestörte Fermentation sicherzustellen.

Die schwache Base Ammoniak ($\text{pK}_s=9,21$) kann je nach pH-Wert in ungeladener Form als NH_3 oder ionisiert als NH_4^+ vorliegen, wobei nur erstere als lipidgängig und demzufolge für den Transport durch die Lipidmembran geeignet gilt¹. Bei der Resorption über das Pansenepithel des Schafes wurde deshalb lange Zeit von einer Diffusion in Form des NH_3 ausgegangen (McDonald 1948). Seit Jahrzehnten ist aber bekannt, dass die postprandiale Ansäuerung des Panseninhaltes nicht zu der zu erwartenden Abnahme der Ammoniakresorptionsrate führt (Gärtner 1963; Gärtner und von Engelhardt 1964). Weiterhin liegen selbst bei einem pH-Wert von 6,8 lediglich 0,6 % des gesamten Ammoniaks in der Form von NH_3 vor; beim Abfall des pH-Wertes auf 6 kommt es zur Reduktion des lipophilen Anteils auf unter 0,01 %. Bei Fütterungsstudien mit Rindern konnte des Weiteren beobachtet werden, dass eine Steigerung der Konzentratmenge im Futter zu keiner Senkung der Harnstoffausscheidung mit Urin oder Kot, ebenso wenig zu einer Reduzierung der $\text{NH}_3\text{-N}$

¹ In Anlehnung an die in den Ernährungswissenschaften etablierte Sprachkonvention soll hier und im folgenden Verlauf die Gesamtmenge beider Formen als „Ammoniak“ bezeichnet werden. Bei Bedarf wird gezielt auf die jeweilige Unterform (NH_3 oder NH_4^+) hingewiesen.

Emissionen führte (Lascano et al., 2008; Agle et al., 2010; Aguerre et al., 2011). Dies deutet darauf hin, dass trotz der unter konzentratreicher Fütterung deutlich saureren ruminalen pH-Werte (Nocek 1997) die Resorption von Ammoniak aus dem Rinderpansen und die anschließende Emission in die Umwelt unbeeinflusst bleiben.

Seit vielen Jahren wird daher die Möglichkeit diskutiert, ob in Analogie zu zahlreichen anderen Epithelien auch der Pansen über Mechanismen verfügt, Ammoniak in ionisierter Form als NH_4^+ zu resorbieren (Schwartz und Tripolone 1983; Arruda und Dytko 1989). Eindeutig belegt ist bis heute vor allem die Beobachtung, dass es *in vitro* nach Applikation von Ammoniak zu einer Zunahme des Kurzschlussstroms über das Pansenepithel des Schafes kommt, was für eine Absorption der ionisierten Form spricht (Bödeker und Kemkowski 1996; Abdoun et al., 2005). Zudem existieren Hinweise darauf, dass kultivierte Zellen des Pansenepithels des Schafes Kanäle exprimieren, die das Ammonium-Ion leiten (Abdoun et al., 2005). Als Effluxweg für das Ammonium-Ion kommen sowohl nicht-selektive Kationenkanäle als auch Kaliumkanäle in Frage; eine präzise Charakterisierung erscheint überfällig.

Abschließend sei erwähnt, dass der Efflux in der protonierten Form als NH_4^+ zum Transport von Protonen aus dem Pansen beitragen und so einen zusätzlichen Mechanismus zur Regulierung des intraruminalen pH-Wertes darstellen könnte. In diesem Licht betrachtet, hätte der energieaufwendige ruminohepatische Kreislauf eine zusätzliche physiologische Bedeutung: Durch den Influx von Harnstoff würde NH_3 für die Pufferung von Protonen bereitgestellt, die daraufhin als NH_4^+ mit einem Proton beladen den Pansen wieder verlassen könnten.

Ziel der vorliegenden Dissertation war es daher, die Mechanismen für den Transport von Ammoniak über das Pansenepithel des Rindes genauer zu charakterisieren. Dazu wurden zunächst Flux-Messungen über das intakte Epithel in der Ussing-Kammer gemacht. Zum Nachweis einer zellulären Ammoniumleitfähigkeit wurden Patch-Clamp-Experimente an isolierten Pansenepithelzellen durchgeführt. Die Wirkung des Ammoniaks auf den intrazellulären pH-Wert und die Modulierbarkeit der induzierten Ströme durch TRP-Kanal-Agonisten wurden schließlich mittels Punktionen mit „double-barreled“ wie auch mit konventionellen Mikroelektroden am intakten Epithel überprüft.

2 Literaturübersicht

2.1 Aufbau und Funktion des Vormagensystems des Wiederkäuers

Die Fähigkeit der im Pansen ansässigen Mikroorganismen, Zellulose abzubauen und dabei aus harnpflichtigen Substanzen wie Harnstoff und dem daraus entstehenden Ammoniak biologisch hochwertiges Protein zu generieren, bildet die Hauptfunktion des Vormagensystems. Anders als beim Monogastrier, bei dem der Fermentationsprozess erst im Colon erfolgt, kann das im Vormagen entstandene Protein im eigentlichen Magen denaturiert und nachfolgend im Dünndarm vollständig verwertet werden. Mit dieser Leistung übernehmen Wiederkäuer eine Schlüsselrolle in der menschlichen Nahrungsproduktion, da sie pflanzliche Ressourcen, die der Mensch nicht oder nur schlecht verwerten kann, in qualitativ hochwertiges Protein umwandeln (Dijkstra et al., 2013).

Das Vormagensystem des Wiederkäuers ist dreigliedrig: Mit der Nahrung aufgenommenes Futter kommt zuerst in die Haube (Reticulum), die anatomisch zwischen Pansen (Rumen) und Psalter (Omasum) liegt. Hier findet eine Sortierung anhand der Größe der Nahrungsbestandteile statt. Grobe Bestandteile gelangen in den Pansen oder werden bei der Rejektion zurück in die Mundhöhle befördert, wo sie durch erneutes Kauen weiter zerkleinert und eingespeichelt werden. Bereits ausreichend zerkleinerte Bestandteile gelangen hingegen weiter in den Psalter.

Der Pansen ist mikrobiell besiedelt und dient als eine Art Gärkammer mit einer Größe von 100 bis 120 l beim Rind. Nach ausreichender Fermentation wird der Nahrungsbrei (Chymus) aus dem Pansen über die Haube in den Psalter transportiert. Im Psalter finden wichtige Resorptionsvorgänge statt, wobei kurzkettige Fettsäuren („short chain fatty acids“, SCFA²), Na⁺, K⁺ und Cl⁻ sowie begleitendes Wasser absorbiert werden. An den Psalter schließt sich der Labmagen (Abomasum) an, der vom Prinzip her dem einhöhligen Magen der Monogastrier entspricht und im Gegensatz zu den Vormägen eine drüsenhaltige Schleimhaut besitzt.

² Im Folgenden soll die Gesamtmenge an kurzkettigen Fettsäuren (sowohl in protonierter Form (HSCFA) als auch in dissoziierter Form (SCFA)) mit SCFA bezeichnet werden. Bei Bedarf wird gezielt auf die jeweilige Unterform (HSCFA oder SCFA⁻) hingewiesen.

2.1.1 Histologie des Pansenepithels

Der Pansen ist mit einer drüsenlosen Schleimhaut überzogen (*pars nonglandularis*). Dieses mehrschichtige, verhornte Plattenepithel, das durch *tight junctions* und *gap junctions* einen geschlossenen Zellverband bildet, liegt einem stark entfalteten, tief in das Epithel hineinreichenden Papillarkörper auf. Trotz sehr starker mechanischer Beanspruchung sichert dies eine feste Verbindung zwischen *Epithelium mucosae* und *Lamina propria mucosae* (Weyrauch et al., 2009). Eine *Lamina muscularis mucosae* ist nicht vorhanden. Subepithelial befindet sich ein Kapillarnetz. Die sich daran anschließende *Tunica muscularis* besteht aus glatter Muskulatur und ist in zwei Schichten aufgebaut: Die innere Muskelschicht verläuft zirkulär, die äußere hingegen longitudinal. Zur Bauchhöhle hin bildet die *Tunica serosa* den Überzug des Pansens (Liebich 2004). Das *Epithelium mucosae* bildet nicht aktiv bewegliche Schleimhautzotten (*Papillae ruminis*) aus, wobei sowohl die Anzahl als auch die Größe der Pansenzotten einerseits von der Fütterung der Tiere, andererseits von der Absorptionsaktivität der Schleimhaut abhängig ist.

Das Epithel lässt sich in die folgenden vier Schichten differenzieren:

1. *Stratum basale (cylindricum)* aus hochprismatischen Zellen, die mit der Basalmembran über Halbdesmosomen in Verbindung stehen (Basalzellschicht).
2. *Stratum spinosum profundum* und *superficiale* mit 6 bis 10 Zellschichten und breiten Interzellularräumen (Parabasal- und Intermediärzellschicht).
3. *Stratum granulosum*, das sich in *Stratum transitionale* und *Stratum lucidum* unterteilen lässt und sich durch eingelagerte Keratohyalin granula von den anderen Zellschichten abgrenzt (Körnerzellschicht).
4. *Stratum corneum (superficiale)* bestehend aus drei verschiedenen Arten von Hornzellen, in denen das Zytoplasma zu Keratin umgewandelt wird. An dieser Stelle sind nur noch Reste der Zellkerne vorzufinden (Hornzellschicht).

2.1.2 Barriere- und Transportfunktion des Pansenepithels

Der histologische Aufbau ist für die Funktion des Pansens entscheidend. Die ausgebildeten Pansenzotten vergrößern die Oberfläche des Pansenepithels und somit dessen Resorptionskapazität im Sinne der Pansenhomöostase. Gleichzeitig fungiert das

mehrschichtige verhornte Plattenepithel als eine Barriere zwischen Blutkreislauf und lumenalem Panseninhalt. Diese Barriere verhindert den Efflux der im Pansen angesiedelten Bakterien wie auch der von ihnen gebildeten Toxinen ins Blut. Gleichzeitig erlauben die Zellen dieses festen Zellverbands einen streng selektiven Stofftransport.

2.2 Mikrobieller Proteinabbau und Proteinsynthese im Pansen

Beim Wiederkäuer werden mit dem Futter aufgenommene Proteine von den im Pansen vorhandenen mikrobiellen Proteasen zu Oligo-, Di-, und Monopeptiden und schließlich zu AS aufgespalten. Kleinere Peptide und AS werden dann von Mikroorganismen aufgenommen und intrazellulär entweder zu NH_3 und CO_2 abgebaut, oder aber von der mikrobiellen Flora für die Proteinbiosynthese verwandt.

Anders als bei Säugetieren, welche auf die exogene Zufuhr essentieller Aminosäuren mit der Nahrung angewiesen sind, zeichnen sich Wiederkäuer daher durch die Fähigkeit aus, selbst aus stickstoffhaltigen Abfallprodukten wie Harnstoff oder Ammoniak unter der Zuführung von Ketosäuren mittels der im Pansen ablaufenden Fermentationsprozesse mikrobielles Protein bilden zu können (Bryant und Robinson 1962; Allison 1969). Verschiedene Untersuchungen belegen, dass 40 bis 80 % des gebildeten mikrobiellen Stickstoffs aus dem Ammoniakpool stammen (Mercer und Annison 1976; Kennedy und Milligan 1980; Hristov und Broderick 1994).

2.2.1 Ammoniakkonzentration im Pansen

Die für ein optimales mikrobielles Wachstum und die Produktion biologisch hochwertiger Proteine erforderliche Stickstoffkonzentration im Pansen wird in der Fachliteratur mit unterschiedlichen Werten angegeben. Diverse Autoren nennen als optimale Ammoniak-(N) Konzentration 5 bis $11 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Allen und Miller 1976; Okorie et al., 1977; Schwab et al., 2005), hingegen sehen andere Autoren die optimale Konzentration bei $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Satter und Slyter 1974) bzw. $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Kang-Meznarich und Broderick 1980). Je nach Fütterung kann es zu einem Anstieg der Ammoniakkonzentration im Pansen von Rindern und Schafen auf bis

zu 15 bis 20 mmol·l⁻¹ kommen (Satter und Slyter 1974; Wernli und Wilkins 1980; Delgado-Elorduy et al., 2002a; Delgado-Elorduy et al., 2002b; Leonhard-Marek et al., 2010). Eine Zusammenfassung der Ergebnisse von Schwab (2005) zeigt deutlich, dass es ab einer Ammoniak-(N)-Konzentration von > 5 mmol·l⁻¹ zu deutlichen N-Verlusten aus dem Pansen von Rindern kommt (Schwab et al., 2005).

2.2.2 Harnstoffzyklus

Gerade bei hohen Anteilen an Protein im Futter werden große Mengen Ammoniak über das Pansenepithel resorbiert, zur Leber transportiert und dort über den Harnstoffzyklus zu Harnstoff entgiftet (McDonald 1948; Kennedy und Milligan 1980). Die über die Pansenwand resorbierten Mengen liegen zwischen 35 und 65 % des im Pansen vorhandenen Ammoniaks; weitere 10 % verlassen den Pansen des Schafes über den Fluss in den Labmagen (Nolan und Stachiw 1979; Leonhard-Marek et al., 2010), woraus sich schließen lässt, dass gerade einmal ca. 25 bis 55 % des im Pansen vorhandenen Ammoniaks in mikrobielles Protein eingebaut werden. McDonald (1948) stellte selbst bei den damals üblichen proteinarmen Fütterungsbedingungen fest, dass im Schaf täglich 4 bis 5 g Ammoniak-(N) oder 235 bis 294 mmol/Tag über das Pansenepithel resorbiert wurden (McDonald 1948). Neuere Untersuchungen an Rindern ergaben eine Resorptionsmenge von 25 mol/Tag (Delgado-Elorduy et al., 2002a; Delgado-Elorduy et al., 2002b), dieses entsprach ca. 60 % der verfütterten N-Menge.

Im Anschluss an die Entgiftung von Ammoniak zu Harnstoff in der Leber gelangen in Abhängigkeit von der Fütterung erhebliche Mengen Harnstoff zurück in den Pansen (McDonald 1948; Houpt 1959; Decker et al., 1961; Houpt und Houpt 1968; Harmeyer und Martens 1980). Dabei wird der Hauptteil des Harnstoffes (70 bis 95 %) über das Pansenepithel sezerniert, während kleinere Mengen (5 bis 30 %) über den Speichel in den Pansen gelangen (Harmeyer und Martens 1980; Marini und Van Amburgh 2003; Reynolds und Kristensen 2008). Harnstoff dient insbesondere unter Fütterungsbedingungen mit wenig Protein als wichtige Stickstoffquelle für die mikrobielle Proteinsynthese und ermöglicht dem Wiederkäuer die Gewinnung von Protein aus einem metabolischen Abfallprodukt, das

ansonsten mit dem Harn ausgeschieden werden müsste (Schmidt-Nielsen und Osaki 1958; Gärtner et al., 1961; Gärtner 1962; Houpt und Houpt 1968; Harmeyer und Martens 1980).

2.2.3 Die Harnstoffsekretion in den Pansen wird durch Transportproteine vermittelt

Interessanterweise spielte der Harnstoffzyklus des Wiederkäuers eine gewisse Schlüsselrolle bei der Entdeckung des proteinvermittelten Harnstofftransports. Ausgehend von der Beobachtung, dass die Extraktionsrate von Harnstoff aus dem Blut in Abhängigkeit von der Fütterung von der Niere hin zum Pansen verschoben werden kann, wurde schon sehr früh gefolgert, dass der Harnstofftransport bei Rind, Schaf und Ziege durch regulierte Transportproteine realisiert werden muss (Schmidt-Nielsen und Osaki 1958; Gärtner et al., 1961; Gärtner 1962). Doch diese Erkenntnis setzte sich, trotz einer Vielzahl von Studien, die diese Hypothese belegten, nur sehr langsam durch (Nolan und Stachiw 1979; Harmeyer und Martens 1980; Kennedy 1980). Als gesichert gilt dabei, dass der Transport von Harnstoff allein über den chemischen Gradienten energetisiert wird. In Versuchen von Houpt und Houpt (1968) war festzustellen, dass die über die Pansenwand in den Pansen gelangte Harnstoffmenge proportional zur Blut-Harnstoffkonzentration ist, dies spricht gegen ein primär oder sekundär aktives Transportgeschehen (Houpt und Houpt 1968). Durch bakterielle Ureasen, die im Bereich der oberen Schichten des Pansenepithels lokalisiert sind, wird Harnstoff in NH_3 und CO_2 gespalten, wodurch wiederum der Konzentrationsgradient als Triebkraft für den Transport aufrechterhalten bleibt (Houpt und Houpt 1968). Entsprechend bewirkt eine Hemmung dieses bakteriellen Enzyms eine Abnahme des Harnstofftransports (Houpt und Houpt 1968; Remond et al., 1993b).

Die Tatsache, dass keine Hinweise auf ein aktives Transportgeschehen existieren, bedeutet jedoch keinesfalls, dass der Transport durch einfache Lipiddiffusion abläuft. Beim Harnstoff handelt es sich vielmehr um ein polares Molekül mit niedriger Lipidlöslichkeit. Mittlerweile darf es als erwiesen betrachtet werden, dass die an biologischen Membranen beobachtbaren Harnstofftransportraten an die Expression spezifischer Transportproteine gebunden sind (Stewart et al., 2005). So ist die hohe Durchlässigkeit des Erythrozyten für Harnstoff eine Folge der Expression des Harnstofftransporters B (UT-B), die Anreicherung von Harnstoff im Nierenmark ist wiederum an die Expression des Harnstofftransporters A (UT-A) gekoppelt (Sands 2003).

In Bezug auf den Pansen von Schafen und Rindern wird derzeit vor allem über eine Rolle für UT-B am Harnstofftransport diskutiert (Ritzhaupt et al., 1998; Stewart et al., 2005; Ludden et al., 2009). Die Beteiligung von Aquaporinen am Transportgeschehen am Pansen von Rindern erscheint als denkbare Alternative (Rojen et al., 2011). Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* wird eine Zunahme der Harnstoffsekretion mit zunehmender Fettsäurekonzentration und zunehmendem CO₂-Partialdruck beobachtet (Thorlacius et al., 1971; v. Engelhardt und Nickel 1978; Remond et al., 1993b; Remond et al., 2003; Abdoun et al., 2010). Ein Zusammenhang der Harnstoffsekretionsrate mit der parallel zu beobachtenden Ansäuerung des Zytosols wird vermutet. Demgegenüber kommt es nach dem Anstieg der intraruminalen Ammoniakkonzentration zur Reduktion des Harnstofftransportes sowohl *in vivo* (Harmeyer und Martens 1980; Kennedy 1980; Norton et al., 1982) als auch *in vitro* (Lu et al., 2014). Der luminaire pH-Wert offenbart hierbei eine modulierende Wirkung. Es ist ferner bekannt, dass diese Regulationsvorgänge innerhalb von Minuten ablaufen und auf eine akute Regulation der Transportrate bereits exprimierter Transportproteine hindeuten. Demgegenüber können unsere derzeitigen Kenntnisse über den ruminalen Ammoniaktransport bestenfalls als rudimentär bezeichnet werden.

2.3 Ammoniak und Ammonium

2.3.1 Physikalische Eigenschaften

Es ist allgemein üblich, den Terminus „Ammoniak“ als Bezeichnung für die Summe zweier physikalisch äußerst unterschiedlichen Formen zu verwenden. Chemisch handelt es sich bei Ammoniak ($pK_s = 9,21$) um das ungeladene Teilchen NH₃. Bei neutralem pH-Wert überwiegt hingegen die protonierte Form NH₄⁺, die als „Ammonium-Ion“ bezeichnet wird. Wie bereits erwähnt wurde, wird auch in dieser Abhandlung in der Regel das Wort „Ammoniak“ verwendet, um auf die Gesamtmenge beider Formen zu verweisen.

Ammoniak manifestiert sich bei Raumtemperatur als stechendes, farbloses Gas. Der Siedepunkt liegt bei -33,43°C, der Schmelzpunkt bei -77,76°C. Es wirkt reizend auf Haut sowie Schleimhäute (IFA und Unfallversicherung 2012). NH₃ ist zwar ungeladen, aber recht polar. Dennoch wurde klassisch von einem Transport des Moleküls durch die Lipidmembran

per diffusionem ausgegangen. Demgegenüber schließt die Ladung des NH_4^+ -Ions den Transport auf diesem Weg sicher aus. Aufgrund des Umstands, dass NH_4^+ einen ähnlichen Radius und eine ähnliche Hydratationsenergie wie K^+ besitzt, kann es aber entsprechende Ionenkanäle passieren (Mudry et al., 2006).

Das Verhältnis zwischen der Konzentration beider Formen hängt vom pH-Wert ab und wird mittels der Henderson-Hasselbalch-Gleichung beschrieben:

$$pH = pK_s + \lg\left(\frac{\text{NH}_3}{\text{NH}_4^+}\right)$$

Bei einem pH-Wert von 7,4 liegt Ammoniak überwiegend in protonierter Form, folglich als Ammonium (NH_4^+) vor ($\sim 98\% \text{ NH}_4^+$, $\sim 1,7\% \text{ NH}_3$). Bei einem pH-Wert um 8 liegen weniger als eines von zehn Ammoniakmolekülen in Form von NH_3 vor, bei einem pH-Wert von 7 ist es weniger als ein NH_3 -Molekül auf 100 NH_4^+ -Moleküle und bei einem pH-Wert von 6 liegt sogar nur weniger als ein Molekül auf 1000 Moleküle welches als freie diffusionsfähige Base NH_3 vorliegt. Beim Absinken des pH-Wertes um eine pH-Einheit müsste sich die Ammoniakkonzentration im Pansen folglich verzehnfachen, um die gleiche Effluxrate wie zuvor zu gewährleisten.

Aufbauend auf der Lipiddiffusionstheorie sollte es von daher möglich sein, durch Zufütterung von genügend energiereichen Kohlehydraten mit absinkendem pH-Wert im Pansen den Efflux von Stickstoff aus dem Pansen zu minimieren, um somit eine bessere Futterproteinverwertung herbeizuführen. Leider trifft diese aus der Theorie entstandene Erwartungshaltung in der Praxis nur sehr bedingt zu.

Seit über 30 Jahren wird die Annahme vertreten, dass die optimale Abstimmung von mikrobieller Proteinsynthese und die gleichzeitige Bereitstellung von ausreichender Energie der Schlüssel zur Leistungssteigerung der Tiere bei gleichzeitiger Verminderung der Ausscheidung von N-haltigen Verbindungen seien. Ungeachtet zahlreicher Versuche, über eine Optimierung der Futterzusammensetzung den Efflux von Ammoniak aus dem Pansen zu vermindern und somit die Effizienz der Umwandlung von Futterprotein in mikrobielles Protein zu erhöhen, gilt jedoch nach wie vor die Faustregel, dass die Stickstoffversorgung des Tieres die Stickstoffausscheidung in die Umwelt bestimmt (Hall und Huntington 2008;

Calsamiglia et al., 2010). Beobachtet wird in diesem Zusammenhang, dass bei steigender Fermentationsrate der Ammoniakemissionen aus dem Pansen ins Blut entsprechend der Gesamtkonzentration von Ammoniak anwächst; ein pH-Wert-bedingtes „Trapping“ von NH_4^+ findet, wenn überhaupt, lediglich in sehr begrenztem Umfang statt. Zur Sicherstellung der Stickstoffversorgung der Pansen-Mikrobiota muss entsprechend eine größere Menge teures Protein verfüttert werden, von dem wieder ein erheblicher Anteil nach Umwandlung in Ammoniak und Emission aus dem Pansen von der Leber zu Harnstoff entgiftet werden muss. Erschwerend kommt hinzu, dass bei den genannten Fütterungsbedingungen mit stark saurem pH-Wert und hohen ruminalen Ammoniakkonzentrationen die Extraktionsrate von Harnstoff aus dem Blut in den Pansen eher sinkt. Das hat zur Folge, dass steigende Harnstoffmengen über die Niere entsorgt und dem Stickstoffkreislauf entzogen werden (Reynolds und Kristensen 2008; Abdoun et al., 2010; Muscher et al., 2010). Weiterer Harnstoff gelangt auch nach Sekretion in das Colon über den Kot in die Umwelt.

2.3.2 Umweltbelastung durch Ammoniak-(N)

Die unzureichende Proteinverwertung von Nutztieren im Allgemeinen und des Wiederkäuers im Speziellen hat weitreichende Folgen für die Umwelt (Kirchgeßner et al., 1993). Der überwiegende Anteil des ausgeschiedenen Stickstoffs wird nach der Spaltung von Harnstoff durch bakterielle Ureasen in Ammoniak und CO_2 umgewandelt. Ersteres kann als flüchtiges Gas (NH_3) entweichen und spielt bei der Bildung direkt wirksamer Klimagase eine Rolle. Bedeutsamer dürfte die Nitrifikation von NH_4^+ zu NO_3^- sein. Bei der anschließenden Umwandlung entstehen neben molekularem Stickstoff (N_2) auch N_2O und NO , die als direkte Treibhausgase in die Atmosphäre entweichen (Wrage et al., 2001; Oenema et al., 2008). N_2O gilt als das drittwichtigste Treibhausgas und hat auf 100 Jahre bezogen eine 298 bis 320 Mal potentere Wirkung als CO_2 (Oenema et al., 2008; Dijkstra et al., 2013). Aus diesem Grund rückt die landwirtschaftliche Tierproduktion in der Diskussion um die Produktion von umweltschädlichen Treibhausgasen zunehmend in den Fokus des Interesses. 2009 stammten nach Angaben der Bundeszentrale für politische Bildung 95 % der NH_3 - und 70 % der N_2O -Emissionen aus der Landwirtschaft, davon waren wiederum 90 % der NH_3 -Emission auf die Haltung von landwirtschaftlichen Nutztieren zurückzuführen (Möller 2009). Diese Angaben verdeutlichen die Folgen der zunehmenden Verfütterung von Futterprotein für die Umwelt.

Die Konsequenzen für den Stoffwechsel und damit für die Gesundheit der Tiere sind derzeit noch nicht absehbar.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollten in diesem Sinne neue Erkenntnisse über die Resorption von Ammoniak aus dem Pansen gewonnen werden. Theoretisch ist es denkbar, dass eine Beeinflussung der Resorptionsmechanismen einen Einfluss auf den Stoffwechsel und die Ausscheidung von umweltbelastenden Stoffen haben könnte.

2.4 Stoffaustausch über Epithelien

2.4.1 Diffusionstheorie nach Overton

Charles Ernest Overton beobachtete bereits 1895 eine Korrelation zwischen der Wirkung von Anästhetika und deren Lipophilie (Overton 1897; Overton 1901). Er schlussfolgerte aus seinen Beobachtungen, dass lipophile Stoffe sehr viel besser über die Lipidmembran der Zelle ins Zytosol gelangen als hydrophile Stoffe. Bis heute steht außer Frage, dass reine Lipidmembranen hochpermeabel für lipophile Stoffe sind, wozu herkömmlich neben den kurzkettigen Fettsäuren auch Ammoniak (NH_3) gezählt wurde.

Während die rasche Diffusion von lipidgängigen Anästhetika über die Blut-Hirn-Schranke und in die Neurone des Zentralen Nervensystems (ZNS) auch heute noch mit Overtons Theorie erklärt wird, mehren sich die Hinweise darauf, dass insbesondere Epithelien als Grenzen des Körperinnenraums über zahlreiche Mechanismen verfügen, um den rein passiven und unkontrollierbaren Influx lipidgängiger Substanzen zu limitieren (Boron 2010). Hierzu zählen die Einlagerung spezieller Lipide wie Cholesterin oder die Überschichtung der Zellmembran mit hydrophilen Proteinen. Ferner wird die Lipidgängigkeit polarer Moleküle wie H_2O heute sehr kritisch diskutiert. Zumindestens beim Wasser geht man heute von einem durch die Expression von Aquaporinen vermitteltem Transportvorgang aus. Auch der Transport des ähnlich polaren NH_3 -Moleküls mittels Lipiddiffusion dürfte kaum in dem Umfang stattfinden, wie herkömmlich postuliert. Eine Beteiligung der Rh-Antigene am NH_3 -Transport über die Membran des Erythrozyten gilt mittlerweile als erwiesen (Winkler 2006). Ferner ist seit etwa 20 Jahren bekannt, dass der intrazelluläre pH-Wert (pH_i) von *Xenopus laevis* Oozyten paradoxerweise abfällt, wenn man sie mit $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ -Lösung

überspült, welches auf einen Influx des Ammonium-Ions hinweist (Burckhardt und Frömter 1992; Keicher und Meech 1994). Ähnliche Beobachtungen sind bei Muskelzellen und Nierentubuluszellen gemacht worden (Aickin und Thomas 1977; Kikeri et al., 1989). Zusammenfassend unterstützen diese Beobachtungen die Aussage, dass an diesen Präparaten der Influx von NH_4^+ größer ist als der Influx von NH_3 .

2.4.2 Epithelialer Transport

Epithelien wie das des Colons oder das des Pansens fungieren als Grenze zwischen dem sterilen Innenraum des Organismus und dem mit Mikroorganismen besiedelten Lumen des Organs. Hierbei übernehmen sie die Funktion, den Organismus vor schädlichen Umwelteinflüssen zu schützen. Sie ermöglichen gleichermaßen den Stoffaustausch mit der Umwelt. So können lebensnotwendige Stoffe wie z. B. Wasser, O_2 , CO_2 , verschiedene Ionen, aber auch Moleküle wie Glukose oder bestimmte Immunglobuline über Epithelien ausgetauscht werden (Fakler und Fahlke 2010). Beim Stofftransport ist zwischen einem parazellulären und transzellulären Transport zu differenzieren. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal ist der aktive und passive Transport (Fromm 2010).

2.4.3 Parazellulärer Transport

Ein Epithel besteht aus Epithelzellen, die eine apikale (definitionsgemäß der funktionellen Außenseite zugewandte) und eine basolaterale (der Blutseite zugewandte) Membran besitzen (Fromm 2010). Bei mehrschichtigen Epithelien wie dem Pansenepithel sind die einzelnen Epithelzellen zwar morphologisch durch Interzellularspalten voneinander abgetrennt, sie bilden aufgrund von Zell-Zell-Kanälen (Gap junctions), die die Zytoplasmata benachbarter Zellen miteinander verbinden, jedoch ein funktionelles Synzytium. Die zu transportierenden Stoffe gelangen durch die apikale Membran der äußersten transportierenden Zellschicht in das Synzytium, um von dort aus durch die *gap junctions* weitergeleitet zu werden. Sie treten durch die basolaterale Membran der innersten Zellschicht letztlich ins Plasma ein.

Die Zwischenräume zwischen den Zellen eines Epithels sind über *tight junction*-Proteine fest miteinander verbunden. Diese *tight junction*-Proteine sind über intrazelluläre Proteine mit dem Zytoskelett der Zellen verknüpft und bilden eine mehr oder weniger dichte Barriere

(Fromm 2010). Ein unkontrollierter Stoffaustausch über die Zwischenräume der Epithelzellen wird so verhindert.

Beim parazellulären Transport handelt es sich zumeist um einen Transport von Elektrolyten oder Wasser über *tight junctions*, der vorwiegend an *leaky* Epithelien zu finden ist (Powell 1981). Stets erfolgt der Transport dabei entlang des elektrochemischen Gradienten, ist also rein passiv (siehe Kap. 2.4.5).

2.4.4 Transzellulärer Transport

Der transzelluläre Transport, der vorwiegend an *tight* oder *moderate tight* Epithelien zu finden ist, umfasst zunächst den Transport über die apikale Zellmembran in die Zelle hinein und im Anschluss daran einen Transport aus der Zelle über die basale Zellmembran. Transzelluläre Transportprozesse können passiv entlang des elektrochemischen Gradienten (siehe Kap. 2.4.5) oder aber aktiv entgegen eines solchen Gradienten erfolgen (siehe Kap. 2.4.6).

2.4.5 Passiver Transport

Passive Transportprozesse werden durch den hydrostatischen Druckgradienten, den Konzentrationsgradienten und den elektrischen Gradienten angetrieben. So erfolgt eine Diffusion ausschließlich entlang eines Gradienten (elektrisch und/oder chemisch) und benötigt keine Zufuhr von Energie in Form von ATP (Fromm 2010). Kommt es infolge des Diffusionsgeschehens zu einer Ladungsverschiebung, so begrenzt das entstehende Potential den weiteren Transport. Die Beziehung zwischen den Gradienten für bestimmte Ionen über eine biologische Membran und dem entstehenden Potential wird anhand der Nernst-Gleichung beschrieben; bei mehreren Ionen gilt die Goldman-Hodgkin-Katz Gleichung (GHK-Gleichung) (Fakler und Fahlke 2010). Das sich aufgrund dieser Gleichungen einstellende Membranpotential wird als „Gleichgewichtspotential“ bezeichnet (siehe Kap. 2.4.8). Im einfachsten Fall strömen Ladungen durch eine Proteinpore („Ionenkanal“) vom elektrochemischen Gradienten getrieben in die Zelle hinein oder aus ihr heraus. Andernfalls kommt es zum gekoppelten Transport mehrerer Ionen mit einem Nettotransport von Ladungen. Dieser Transport wird wiederum vom Gradienten der Ionen getrieben.

Wird für jedes über eine Membran in eine Richtung transportierte geladene Teilchen die gleiche Menge an Ladung in die entgegengesetzte Richtung transportiert, liegt ein elektroneutraler Transportprozess vor. Exemplarisch hierfür ist der Natrium-Protonen-Austauscher (Na^+/H^+ -Austauscher, NHE).

2.4.6 Aktiver Transport

Der aktive Transport findet unter ATP-Verbrauch statt, erfolgt stets transzellulär und wird durch Transmembranproteine vermittelt (Fromm 2010). Beim aktiven Transport ist zwischen primär und sekundär aktiven Prozessen zu unterscheiden, außerdem zwischen einem elektroneutralen und einem elektrogenen Transport.

Der primär aktive Transport entgegen einen elektrochemischen Gradienten erfolgt in der Regel durch Transportproteine, die als ATPasen fungieren und Energie aus der Spaltung von ATP gewinnen können. Klassisches Beispiel für einen solchen Transportmechanismus ist die Na^+/K^+ -ATPase. Sie befindet sich in allen Zellen von Vertebraten, ist in Epithelzellen auf der basolateralen Seite lokalisiert und pumpt pro verbrauchtem ATP-Molekül drei Na^+ in die Zelle hinein und zwei K^+ aus der Zelle heraus. Dieser Nettoladungstransport führt zur Aufrechterhaltung des Kaliumgradienten zwischen dem Innen- und Außenraum, der in den meisten Zellen das Membranpotential determiniert. Der gleichzeitig entstehende Natriumgradient fungiert als Triebkraft für zahlreiche Transporter, darunter befindet sich auch der bereits erwähnte elektroneutrale Na^+/H^+ -Austauscher. Die Koppelung eines solchen passiven Transporters an eine primär aktive „Pumpe“ führt zu einem sekundär aktiven Transportgeschehen.

Der Nachweis eines aktiven Transportes von Natrium gegen einen elektrischen und chemischen Gradienten gelang erstmals 1951 durch Ussing und Zerahn (Ussing und Zerahn 1951). Mit der Entwicklung der sogenannten „short-circuit technique“ gelang es, sowohl den chemischen als auch elektrischen Gradienten über das Gewebe auszuschalten und damit klar zu beweisen, dass im Epithel eine „Natriumpumpe“ vorhanden sein muss. Es sei in diesem Kontext angemerkt, dass es sich bei dem von ihnen verwendeten Froschhautgewebe ebenfalls um ein mehrschichtiges verhorntes Plattenepithel handelte, das somit Ähnlichkeit mit dem

Aufbau des Pansenepithels aufweist. Auch verhornte Plattenepithelien verfügen demnach durchaus über das Potential zu großen Transportleistungen.

2.4.7 Funktion von Ionenkanälen

Ionenkanäle sind integrale Membranproteine, die einen passiven Durchtritt von Ionen durch Zellmembranen zulassen (Fakler und Fahlke 2010). Triebkräfte können in Abhängigkeit davon, ob es sich um geladene oder ungeladene Moleküle handelt, ein chemischer (Konzentrationsgradient) oder ein elektrischer Gradient (Potentialdifferenz) sein, wobei sie auch gemeinsam als elektrochemischer Gradient auf den Ionenfluss einwirken können (Schröder und Diener 2005).

Bei Ionenkanälen wird zwischen Kationen- und Anionenkanälen unterschieden, wobei die Selektivitäten für die permeierenden Ionen stark variieren können. So findet man einerseits hoch-spezifische Kanäle, die nur für ein bestimmtes Ion durchlässig sind (z. B. Natriumkanäle, Kaliumkanäle). Andererseits existieren aber auch nicht-selektive Kanäle, die verschiedene Ionen selbst unterschiedlicher Wertigkeit leiten. Das Kanalverhalten (als „gating“ bezeichnet) einzelner Kanalsorten kann ebenso sehr unterschiedlich ausfallen. Dabei kommt es durch eine Veränderung der Konformation des Proteins zu einer Veränderung des Transportverhaltens; z. B. ausgelöst durch das Membranpotential, die Transmitterkonzentration, mechanische Kräfte oder Temperaturveränderungen (Fakler und Fahlke 2010).

2.4.8 Membranpotential

Unter dem Terminus „Membranpotential“ wird die elektrische Potentialdifferenz zwischen dem Intrazellular- und dem Extrazellularraum verstanden. Es resultiert aus der Diffusion von Ionen über die Membran, entsprechend der unterschiedlichen Verteilung auf den beiden Seiten der Membran. Im Gleichgewichtszustand „elektrochemisches Gleichgewicht“ ist der Ionenfluss aufgrund des chemischen Gradienten gleich groß wie der aufgrund des elektrischen Gradienten.

Das Gleichgewichtspotential kann unter Rückgriff auf die Nernst-Gleichung wie folgt berechnet werden:

Nernst-Gleichung:
$$E = \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \ln \left(\frac{[Ion]_a}{[Ion]_i} \right)$$

E = Membranspannung in V

R = allgemeine Gaskonstante (8,314 J·K⁻¹ · mol⁻¹)

T = Temperatur in K

z = Wertigkeit des Ions

F = Faraday-Konstante (96487 C·mol⁻¹)

a = extrazellulär

i = intrazellulär

Zum Membranpotential tragen sämtliche vorhandenen Ionen in Abhängigkeit von ihrer Konzentration, der Anzahl und Offenwahrscheinlichkeit entsprechender Kanäle und deren Leitfähigkeit für das betreffende Ion bei, wobei die letztgenannten drei Parameter in der Regel zu einer für das betreffende Ion charakteristischen Gesamtleitfähigkeit (Permeabilität P) zusammengefasst werden. Mithilfe der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung (GHK-Gleichung) kann das Membranpotential aus diesen Permeabilitäten und den Ionenkonzentrationen verschiedener Ionen rechnerisch ermittelt werden (Schröder und Diener 2005; Fakler und Fahlke 2010); auch umgekehrt ist es möglich, ausgehend von der Potentialveränderung nach Änderung der Konzentration eines Ions in einer extrazellulären Lösung die Permeabilität der Zellmembran für ein bestimmtes Ion zu bestimmen.

GHK-Gleichung:
$$E = \frac{R \cdot T}{F} \ln \left(\frac{P_K \cdot [K^+]_a + P_{Na} \cdot [Na^+]_a + P_{Cl} \cdot [Cl^-]_i}{P_K \cdot [K^+]_i + P_{Na} \cdot [Na^+]_i + P_{Cl} \cdot [Cl^-]_a} \right)$$

P= Permeabilität für das Ion

2.5 Transportprozesse und Transportproteine am Pansenepithel

Auf der Grundlage der schon angesprochenen Beobachtungen von Overton (siehe Kap. 2.4.1) wurde bei Untersuchungen von Transportvorgängen über das Pansenepithel über Jahrzehnte hinweg allein von passiven Diffusionsprozessen über die Lipidmembran ausgegangen. Entsprechend wurde postuliert, dass die Aufnahme sowohl von Ammoniak als auch von kurzkettigen Fettsäuren alleine durch physikalische Diffusionsprozesse der ungeladenen Form durch die Lipidmembran erklärbar sei (McDonald 1948; Masson und Phillipson 1951; Bugaut 1987).

Erste Widersprüche zu dieser Theorie wurden schon früh deutlich. Auf die Probleme, die sich aus Studien der Harnstoffsekretion in den Pansen ergaben, wurde im Rahmen dieser Dissertation bereits hingewiesen. Sehr früh wurde erkannt, dass neben ungeladenen Molekülen auch geladene Ionen wie Chlorid oder Natrium vom Pansenepithel resorbiert werden (Sperber und Hyden 1952; Dobson und Phillipson 1958). Danielli (1945) postulierte daher bereits sehr früh, dass Ionen durch kleine Poren auf parazellulärem Weg aus dem Pansen herausströmen könnten (Danielli et al., 1945). Zweifel an dieser Theorie kamen jedoch schnell auf, da der *in vivo* vorgefundene Na^+ -Konzentrationsgradient zwischen Pansenlumen und Blut Natrium in den Pansen hineintreiben müsste. Das beim Schaf zwischen Pansenlumen und Blut gemessene Potential von ca. 30 mV (positiv auf der Blutseite) (Dobson und Phillipson 1958) sprach ebenfalls gegen die von Danielli (1945) begründete Theorie. Stattdessen konnte in zahlreichen Untersuchungen *in vivo* wie auch *in vitro* gezeigt werden, dass Na^+ auch gegen ein Konzentrationsgefälle aus dem Pansen heraustransportiert werden kann (Dobson 1959; Stevens 1964; Ferreira et al., 1966b). Heute gilt es als gesichert, dass die Resorption von Natrium durch das Pansenepithel auf transzellulärem Wege stattfindet. Die apikale Aufnahme kann dabei durch einen Kanal oder aber über den bereits erwähnten Na^+/H^+ -Austauscher erfolgen, der unter anderem durch Fettsäuren stimuliert wird, die ins Zytosol strömen und dort dissoziieren (Gäbel und Sehested 1997). Basolateral wird Na^+ durch die Na^+/K^+ -ATPase aktiv ins Blut befördert, wohingegen der Efflux der dissoziierten Fettsäureanionen über einen Kanal realisiert werden könnte (Stumpff et al., 2009b). Doch auch die Vorstellung, dass der Anteil der Fettsäureresorption, der an die Aufnahme von Protonen gekoppelt ist, durch klassische Lipiddiffusion erklärbar ist, gerät heute zunehmend ins Wanken. Zahlreiche Hinweise sprechen für eine Beteiligung von Transportproteinen sowohl an der apikalen Aufnahme (Aschenbach et al., 2009) als auch an der basolateralen Abgabe (Dengler et al., 2013).

Die Resorptionsmechanismen über das Pansenepithel besitzen sowohl eine große Bedeutung für die Pansenhomöostase als auch als Voraussetzung für eine ungestörte Fermentation. Aus diesem Grund folgt ein kurzer Überblick über die im Pansen vorhandenen Transportproteine.

2.5.1 Der Transport von Anionen durch Austauscher und Monocarboxylat-Transporter (MCT)

Neben Na^+ kann auch Cl^- gegen einen elektrogenen Gradienten aus dem Pansen ins Blut resorbiert werden (Sperber und Hyden 1952; Dobson und Phillipson 1958). Das im Verlauf der Fermentation und Stoffwechselfvorgänge gebildete CO_2 kann ungehindert in die Pansenzellen diffundieren. Intrazellulär findet durch das Enzym Carboanhydrase (CA) eine Spaltung in H^+ und HCO_3^- statt. Hierbei fällt HCO_3^- an, das über den $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher zurück ins Lumen gelangen kann, woraus die Aufnahme von Chlorid aus dem Pansen resultiert (Martens und Gäbel 1988).

Gäbel et al. (1991a) stellten bei Versuchen am gewaschenen Schafpansen außerdem fest, dass es einen Zusammenhang zwischen der Absorption von SCFA^- und der Sekretion von HCO_3^- gibt (Gäbel et al., 1991a). Diese Feststellung wurde durch den Nachweis untermauert, dass der Einsatz von 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid (DIDS), einem Blocker von HCO_3^- -Antiportern, zu einer Hemmung der SCFA^- -Absorption führt (Kramer et al., 1996; Sehested et al., 1999). Kramer et al. (1996) postulierten ausgehend davon die Theorie, dass SCFA^- entweder mit Cl^- um die Bindungsstelle des $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers konkurrieren könnten oder der Transport mittels speziellem $\text{SCFA}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher erfolge (Kramer et al., 1996). Einer Aufnahme von lumenalem Azetat und Propionat im Austausch für HCO_3^- in die Pansenepithelzellen von Schafen via Anionenaustauscher konnte inzwischen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden (Aschenbach et al., 2009). Auch am basolateralen Efflux von Anionen dürften Anionenaustauscher beteiligt sein (Dengler et al., 2013). Neben dem Austausch von Anionen wie Cl^- und SCFA^- mit HCO_3^- existieren Hinweise für den Co-Transport mit Protonen über den MCT. Eine sekundär aktive Resorption von Chlorid ist jedoch ausschließlich über diese elektroneutralen Prozesse nicht möglich, sondern zu diesem Zweck muss eine elektrogene Kopplung an die Na^+/K^+ -ATPase vorhanden sein, die die Energie für die Ausschleusung ins chloridreiche Plasma bereitstellt.

2.5.2 Die basolaterale Ausschleusung von Cl^- und SCFA^- über einen Anionenkanal

Apikal werden Natrium und Chlorid jeweils über elektroneutrale Mechanismen (Na^+/H^+ -Austauscher, $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher) in die Epithelzelle aufgenommen. Auf der basolateralen Seite gelangt Natrium elektrogen über die Na^+/K^+ -ATPase aus dem Zytosol der Zelle heraus. Aus diesem Sachverhalt kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass auch Cl^- auf elektrogenem Weg aus der Zelle transportiert werden muss, um einen elektroneutralen Transport dieser beiden Elektrolyte über das Epithel zu erreichen. Der für den elektrogenen Efflux von Cl^- verantwortliche Anionenkanal weist neben einer Leitfähigkeit für Cl^- eine Leitfähigkeit für SCFA^- auf (Stumpff et al., 2009b; Georgi 2011; Georgi et al., 2013). Da der basolaterale Efflux von Anionen über diesen Kanal elektrogen an die Na^+/K^+ -ATPase gekoppelt ist, dürfte der Kanal beim sekundär aktiven Cl^- -Transport über das Epithel eine zentrale Rolle übernehmen. Des Weiteren kann durch ihn ein an den Na^+/H^+ -Austauscher gekoppelter Efflux von Fettsäureanionen stattfinden. Der intrazelluläre pH-Wert des Epithels bleibt dabei im Sinne der epithelialen Homöostase im neutralen Bereich. Daraus resultiert der bereits von Danielli et al. (1945) beobachtete Co-Transport von Natrium und Fettsäureanionen (Danielli et al., 1945); Protonen bleiben zurück und müssen vom Speichel des Wiederkäuers gepuffert werden.

2.5.3 Die Na^+/K^+ -ATPase

Die Na^+/K^+ -ATPase sorgt für die Erhaltung des elektrochemischen Gradienten (siehe Kap. 2.4.6). Unter Standardbedingungen in der Ussing-Kammer mit identischen Lösungen auf beiden Seiten ist die Na^+/K^+ -ATPase verantwortlich für den Kurzschlussstrom über das Epithel. Immunhistochemische Färbungen am Pansenepithel haben diesbezüglich gezeigt, dass die Na^+/K^+ -ATPase in Zellen des *Stratum basale* sehr häufig zu finden ist und mit zunehmender Verhornung in den Schichten *Str. spinosum* und *granulosum* abnimmt (Graham und Simmons 2005).

2.5.4 Die elektroneutrale Natriumresorption am Pansenepithel: Der NHE

Wiederkäuer sezernieren zur Pufferung des Panseninhaltes große Mengen an NaHCO_3 und Na_2HPO_4 . Im Verlauf davon ausgeschüttetes Natrium wird kontinuierlich über die Pansenwand resorbiert, was hauptsächlich über elektroneutrale Mechanismen geschieht. Hauptverantwortlich für die elektroneutrale Natriumresorption ist der bereits erwähnte Na^+/H^+ -Austauscher oder NHE (Chien und Stevens 1972; Martens et al., 1991). Für jedes in die Zelle hinein transportierte Na^+ -Ion wird ein Proton aus dem Zytosol der Zelle hinaus geschleust. Der NHE wurde an verschiedensten Zelltypen nachgewiesen. Hauptwirkung ist die Rückführung zu einem physiologischen intrazellulären pH-Wert (Köttgen et al., 1994; Kenyon et al., 1997; Slepko et al., 2007). Am Pansenepithel von Schafen und Rindern steigt die Resorptionsrate von Na^+ nach der Ansäuerung des Epithels durch Fettsäuren oder CO_2 (Gäbel et al., 1991b; Diernaes et al., 1994; Sehested et al., 1996; Gäbel und Sehested 1997) und es konnten auf struktureller Basis bis heute vier verschiedene Isoformen (NHE1, NHE2, NHE3 und NHE8) identifiziert werden (Schweigel et al., 2005; Graham et al., 2007). Bei funktionellen Nachweisen fanden Rabbani et al. (2011) heraus, dass der apikale Einsatz eines spezifischen NHE1-Blockers (HOE642) keinen Effekt hatte, wohingegen der NHE3-Blocker S3226 zu einer Abnahme des transepithelialen Na^+ -Fluxes führte (Rabbani et al., 2011). Nachdem andere Arbeiten gezeigt haben, dass NHE1 am Pansen exprimiert wird (Sehested et al., 1996; Müller et al., 2000), schlussfolgerten die Autoren, dass der basolaterale NHE1 primär an der pH_i -Regulation beteiligt ist. Dagegen trägt der NHE3 zur apikalen Na^+ -Aufnahme und damit zum transepithelialen Na^+ -Transport bei (Rabbani et al., 2011).

Sowohl Wolfram et al. (1989) als auch Gäbel et al. (1990) wiesen ferner nach, dass eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) die Reduzierung des elektroneutralen Na^+ - Transports mit sich bringt (Wolfram et al., 1989; Gäbel et al., 1999). Angesichts des bereits mehrfach gezeigten Umstandes, dass cAMP generell stimulierend auf den NHE1 und hemmend auf NHE3 wirkt (Azarani et al., 1995a; Azarani et al., 1995b; Kandasamy et al., 1995; Zhao et al., 1999), sprechen diese Ergebnisse für ein Expressionsmuster mit apikaler Expression von NHE3 und basolateraler Expression von NHE1 am Pansenepithel (Wolfram et al., 1989; Gäbel et al., 1999; Stumpff 2011).

2.5.5 Die elektrogene Natriumleitfähigkeit des Pansenepithels

Im Rahmen der Untersuchung des elektrogenen Natriumtransports über das Epithel des Vormagens von Schafen stellte sich heraus, dass sich dieser von dem klassischen epithelialen Natriumkanal (ENaC) anderer Epithelien unterscheidet: Während der ENaC Kanal durch Amilorid im mikromolaren Bereich blockiert wird, ist der elektrogene Natriumtransport des Pansenepithels des Schafes nicht Amilorid-sensitiv (Schultheiß 1995; Rübhelke 1998). Eine nähere Untersuchung von isolierten Epithelien des Psalters und Pansens von Schafen zeigte, dass der mukosale Entzug von divalenten Kationen (wie Ca^{2+} und Mg^{2+}) zur Steigerung des Kurzschlussstroms über das Epithel führt (Leonhard et al., 1990; Rübhelke 1998; Lang und Martens 1999; Schultheiss und Martens 1999). Auch bei Punktionsversuchen mittels Mikroelektrodenteknik bestätigte sich der Einfluss von divalenten Kationen. Der Entzug von Ca^{2+} und Mg^{2+} führte zu einer Depolarisation der apikalen Membran und einer Abnahme des apikalen fraktionellen Widerstandes (Lang und Martens 1999; Schultheiss und Martens 1999), was auf einen vermehrten Einstrom von Kationen hindeutet. Diese Ca^{2+} und Mg^{2+} -sensitive Leitfähigkeit ist außer für Na^+ auch für andere monovalente Kationen permeabel und ist als ein Hinweis für den Transport durch einen nicht-selektiven Kationentransport anzusehen.

2.5.6 Eine nicht-selektive Kationenleitfähigkeit am Pansenepithel

Die nicht-selektiven Kationenkanäle stellen eine sehr heterogene Gruppe von Kanälen dar, die in verschiedene Kanalfamilien weiter untergliedert werden können. Es ist zu vermuten, dass die Kanäle dieser Gruppen phylogenetisch sehr alt sind und daher nicht über die spezialisierten Selektivitätsfilter oder Spannungssensoren von hoch selektiven Na^+ -, Ca^{2+} - oder K^+ -Kanälen verfügen. Trotz insgesamt niedriger Selektivität unterscheiden sich die verschiedenen Kanäle bezüglich ihrer Permeabilität für verschiedene Kationen. Typisch sind negative Wechselwirkungen bis hin zum Block zwischen verschiedenen Kationen, was für eine lange Porenregion mit vielfältigen Interaktionsmöglichkeiten spricht (Clapham 2003).

Dementsprechend zeigte sich in Versuchen an Epithelien des Vormagensystems von Schafen eine Ca^{2+} sensitive Leitfähigkeit nicht nur für Na^+ sondern auch für K^+ , Rb^+ , Cs^+ und Li^+ (Rübhelke 1998; Schultheiss und Martens 1999; Leonhard-Marek 2002).

Patch-Clamp-Experimente an isolierten Pansenepithelzellen des Schafes bestätigten die Expression einer nicht-selektiven Kationenleitfähigkeit, die durch den Entzug divalenter Kationen aktivierbar ist und bei der eine Permeabilitätssequenz von $K^+ > Cs^+ > Na^+$ beobachtet wurde (Stumpff et al., 2004a; Stumpff et al., 2004b; Leonhard-Marek et al., 2005). Es konnte zudem der Nachweis dafür erbracht werden, dass es sich bei dem durch divalente Kationen hervorgerufenen Block des Natriumtransports um einen spannungsabhängigen Block handelt. Bei einer Depolarisierung der Zelle nimmt die Leitfähigkeit für Na^+ zu, denn die extrazellulären divalenten Kationen werden von der Membran abgestoßen (Leonhard-Marek et al., 2005). Dies könnte die Beobachtung erklären, dass eine Depolarisation des intakten Pansenepithels *in vitro* zu einer Steigerung der Leitfähigkeit von Na^+ führt (Lang und Martens 1999). Insgesamt sprechen diese Beobachtungen dafür, dass die elektrogene Resorption von Na^+ durch die Vormägen über nicht-selektive Kationenkanäle erfolgt. Der Block durch divalente Kationen erfolgt vermutlich in spannungsabhängiger Weise durch eine einfache Verlegung der Porenregion (Lang und Martens 1999). Diese Kanäle dürften ausschließlich apikal zu finden sein, da bei basolateraler Expression mit dem Influx von Na^+ ein Kurzschluss der für den epithelialen Transport essentiellen Na^+/K^+ -ATPase folgen würde.

2.5.7 Die Kaliumleitfähigkeit des Pansenepithels

Steigende Kaliumkonzentrationen (ruminal bzw. mukosal) bedingen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine Depolarisation des transepithelialen Potentials am Pansen von Schafen (Ferreira et al., 1966a; Ferreira et al., 1966b). Gleichzeitig konnte anhand von Mikroelektroden-Experimenten gezeigt werden, dass mukosales K^+ zu einer Depolarisation der apikalen Membran mit Abnahme des fraktionellen apikalen Widerstandes führt (Leonhard-Marek und Martens 1996). Die Leitfähigkeit von K^+ über das Pansenepithel des Schafes kann mukosal sowohl durch Quinidin als auch durch Verapamil und basolateral durch Ba^{2+} geblockt werden. Dies lässt auf eine apikal und basolateral pharmakologisch unterschiedlich beeinflussbare Kaliumleitfähigkeiten schließen (Harrison et al., 1975; Bödeker und Kemkowski 1996; Leonhard-Marek und Martens 1996). Lange Zeit wurde außerdem ein parazellulärer Efflux von K^+ aus dem Pansen postuliert, dagegen deutet die Wirksamkeit der Blocker auf einen eher transzellulären Transport von K^+ über Ionenkanäle hin (Stevens und Hume 1995; Stumpff 2011). Es scheint wahrscheinlich, dass beide Prozesse einen Beitrag zum Gesamttransport von K^+ leisten.

Der in Einzelkanalmessungen („single-channel“) nachgewiesene hoch-selektive Kaliumkanal (Abdoun et al., 2005) dürfte hingegen in erster Linie auf der basolateralen Seite der Schafpansenepithelzellen lokalisiert sein und der Rezirkulation des über die Na^+/K^+ -ATPase in die Zelle hinein gepumpten Kaliums dienen (Stumpff 2011). Eine zusätzliche apikale Expression hoch-selektiver Kaliumkanäle kann nicht ausgeschlossen werden, ist im Experiment aber nicht sicher von der nicht-selektiven Kationenleitfähigkeit abgrenzbar.

2.5.8 Magnesiumkanäle

Die Magnesiumabsorption aus dem Pansen wird durch eine Erhöhung der luminalen K^+ -Konzentration (Care et al., 1984; Martens et al., 1987; Leonhard-Marek und Martens 1996) und Steigerung der luminalen NH_4^+ -Konzentration (Martens und Rayssiguier 1980; Care et al., 1984; Gäbel und Martens 1986; Martens et al., 1988) gehemmt. Diese Ergebnisse deuten auf einen potentialabhängigen Mechanismus für die Mg^{2+} -Absorption hin (Martens et al., 1987; Leonhard-Marek und Martens 1996). An isolierten Zellen des Pansenepithels des Schafes konnten Schweigel et al. (1999) zeigen, dass das Membranpotential als treibende Kraft für die Absorption von Mg^{2+} fungiert, womit sie auf einen Mg^{2+} -Transport via Kanal oder Carrier schließen (Schweigel et al., 1999). An Pansenepithelzellen des Schafes konnten inzwischen drei verschiedene Mg^{2+} -Transportproteine nachgewiesen werden (TRPM7, MagT1 und $\text{Mg}^{2+}/\text{Na}^+$ -Austauscher) (Schweigel et al., 2008). Vor diesem Hintergrund wäre ein Transport über MagT1, ein selektiver Mg^{2+} -Kanal, der in allen eukaryotischen Zellen vorkommt, möglich (Goytain und Quamme 2005). Der TRPM7 gehört zur Familie der TRP-Kanäle, die als nicht-selektive Kationenkanäle eine Leitfähigkeit für monovalente und divalente Kationen besitzen (Nilius et al., 2007). Nachdem die Interaktion zwischen monovalenten Kationen wie z. B. Na^+ und K^+ sowie divalenten Kationen mehrfach gezeigt werden konnte (s. Kap. 2.6.4), liegt ein elektrogener Transport von Mg^{2+} über den TRPM7 sehr nahe.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Anionen wie z. B. HCO_3^- und SCFA^- eine stimulierende Wirkung auf die Mg^{2+} -Absorption haben. Dies deutet auf einen zusätzlichen elektroneutralen Aufnahmemechanismus hin, bei dem die Mg^{2+} -Absorption über einen $\text{Mg}^{2+}/2\text{H}^+$ -Antiporter oder Mg^{2+} -Anionen-Co-Transporter mediiert wird (Leonhard-Marek et al., 1998; Schweigel und Martens 2003). Anders als der zuvor beschriebene Weg ist dieser

Aufnahmemechanismus nicht elektrogen und demzufolge vom apikalen Potential unabhängig. Der basolaterale Efflux von Mg^{2+} erfolgt sekundär aktiv über einen Na^+/Mg^{2+} -Austauscher (Leonhard-Marek und Stumpff 2005; Schweigel et al., 2006). Zusammenfassend ist davon auszugehen, dass die Mg^{2+} -Resorption apikal sowohl durch elektroneutrale als auch elektrogene Transportwege stattfindet, wobei der basolaterale Efflux elektroneutral ist.

2.5.9 Harnstoffsekretion über Harnstofftransporter und Aquaporine (AQP)

Auf die Bedeutung der Harnstoffsekretion für die Homöostase von Stickstoff und Protonen im Pansen wurde bereits hingewiesen, wie auch auf dessen fütterungsabhängige Regulation (Schmidt-Nielsen und Osaki 1958; Gärtner et al., 1961; Gärtner 1962; v. Engelhardt und Nickel 1965; Haupt und Haupt 1968; Harmeyer und Martens 1980).

Sowohl im Pansen- und Darmepithel von Schafen (Ritzhaupt et al., 1997; Ritzhaupt et al., 1998; Stewart et al., 2005) als auch im Pansen des Rindes (Marini und Van Amburgh 2003; Stewart et al., 2005; Rojen et al., 2011) konnte der Harnstofftransporter UT-B nachgewiesen werden. Analog zur Verteilung der Na^+/K^+ -ATPase (Graham und Simmons 2005) zeigte sich in der Arbeit von Peters (2007), dass die Zellen des *Str. basale* eine signifikant höhere Expression des UT-Bs aufweisen als Zellen des *Str. spinosum* oder *Str. granulosum* (Peters 2007). Diese Feststellung lässt auf eine effektive Aufnahme von Harnstoff aus dem Blutplasma und eine Erleichterung des Harnstofftransportes in den folgenden Schichten schließen (Peters 2007), die durch die zahlreich ausgebildeten Zell-zu-Zell-Verbindungen (*gap-junctions*) generiert werden (Graham und Simmons 2005).

Auch humane Aquaporine (AQP3, AQP7, AQP9 und AQP10) besitzen eine Leitfähigkeit für Harnstoff (Litman et al., 2009). Bei einer näheren Untersuchung des AQP3 in Erythrozyten wurde deutlich, dass die Leitfähigkeit für Wasser und Glycerol durch den extrazellulären pH-Wert beeinflusst wird (Zeuthen und Klaerke 1999). Die Autoren zeigten, dass eine schrittweise Absenkung des pH-Wertes zu einem bevorzugten Transport von Glycerol gegenüber Wasser führt. Der Verlauf stellte sich als glockenförmige Kurve dar (Zeuthen und Klaerke 1999).

Im Pansenepithel von Kühen werden die Aquaporine AQP3, AQP7, AQP8 und AQP10 ebenfalls exprimiert und eine Beteiligung am Transport von Harnstoff wird hauptsächlich hinsichtlich des Zusammenhangs einer vermehrten Expression dieser Aquaporine bei steigender Stickstoffkonzentration im Futter als wahrscheinlich erachtet (Rojen et al., 2011). Interessant ist des Weiteren, dass sowohl Abdoun et al. (2010) als auch Lu et al. (2014) bei ihren Versuchen am Pansenepithel von Schafen zeigen konnten, dass der luminaire pH-Wert einen Einfluss auf die Urea-Sekretion in den Pansen hat und sich dieser als glockenförmige Kurve zeigt, entsprechend den Beobachtungen an Aquaporinen (Lu et al., 2014; Zeuthen und Klaerke 1999; Abdoun et al., 2010). Auf der Basis von diesen Erkenntnissen können sowohl der UT-B als auch Aquaporine am Transport von Urea in den Schafpansen beteiligt sein (Lu et al., 2014).

2.6 Ammoniaktransport aus dem Pansen

Der Nachweis, dass Ammoniak über die Pansenwand resorbiert wird und anschließend im Portalblut von Schafen nachgewiesen werden kann, wurde schon im Jahr 1948 erbracht (McDonald 1948). Bereits früh wurde bemerkt, dass Ammoniak aufgrund des im Pansen physiologisch vorhandenen pH-Wertes von unter 7 überwiegend in Form des hydrophilen NH_4^+ vorliegen muss (Phillipson und McAnnally 1942; Briggs et al., 1957; Hogan 1961) (s. Kap. 2.3.1). Bis in die heutige Zeit hielt sich dennoch die Theorie, alleine die lipophile Diffusion des ungeladenen NH_3 sei für den Efflux verantwortlich.

2.6.1 Der Einfluss des chemischen und elektrischen Gradienten auf den Efflux von Ammoniak

Die zwei Haupteinflussfaktoren auf den Efflux von Ionen aus dem Pansen sind der chemische und der elektrische Gradient (Hogan 1961). Der auf der Blutseite 30 mV positive elektrische Gradient zwischen Pansenlumen und Blut (Dobson und Phillipson 1958; Dobson 1959; Ferreira et al., 1966b) wirkt einem Efflux des NH_4^+ -Ions entgegen (Hogan 1961). Allerdings ist die Konzentration von NH_4^+ im Blut von Schafen geringer als im Pansenlumen (McDonald 1948; Lewis et al., 1957). Daraus resultiert ein chemischer Gradienten als Triebkraft für den Efflux von NH_4^+ aus dem Pansen. Ausgehend von einer ruminalen Ammoniakkonzentration von $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Satter und Slyter 1974; Wernli und Wilkins 1980; Delgado-Elorduy et al.,

2002a; Delgado-Elorduy et al., 2002b; Leonhard-Marek et al., 2010) und einer Konzentration im Portalblut in Höhe von ca. $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (McDonald 1948) ergibt sich ein Gleichgewichtspotential von 80,0 mV (Blutseite positiv), unterhalb dem ein Efflux des Ammonium-Ions möglich ist. Bei einer Konzentration im Pansen von $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ liegt das Gleichgewichtspotential bei 43,0 mV und folglich im Bereich des physiologischen transepithelialen Potentials. Ein Efflux des Ammonium-Ions kommt unter diesen Bedingungen demnach zum Erliegen.

Der Efflux von NH_3 bleibt hingegen vom transepithelialen Potential unberührt, so dass der Efflux in dieser Form des Ammoniaks alleine vom Konzentrationsgradienten bestimmt wird, wobei die Konzentration von NH_3 in entscheidender Weise vom pH-Wert beeinflusst wird. *In vivo* und *in vitro* Experimente zeigen, dass eine Steigerung der Ammoniakkonzentration im Pansen zu einer Steigerung der Ammoniakkonzentration im Portalblut von Schaf und Ziege führt (Lewis et al., 1957; Gärtner et al., 1961; Remond et al., 1993a). Gleichfalls zeigte sich erwartungsgemäß, dass sich die Effluxrate abhängig vom ruminalen pH-Wert verhält (Hogan 1961; Gärtner 1963; Gärtner und von Engelhardt 1964). Im Rahmen von Versuchen an fistulierten Schafen stellte sich jedoch heraus, dass die konzentrationsabhängige Steigerung der Resorption zwar bei einem pH-Wert von 6,5 nachweisbar war, nicht aber bei einem ruminalen pH-Wert von 4,5 (Hogan 1961). Hogan (1961) schlussfolgerte aus diesem Ergebnis, dass es aufgrund der Verschiebung des pH-Wertes zu einer Veränderung des Transportmechanismus für Ammoniak kommt (Hogan 1961).

Ausgehend von einer Ammoniakkonzentration von bis zu 350 mg/l ($20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) (Satter und Slyter 1974; Wernli und Wilkins 1980; Delgado-Elorduy et al., 2002a; Delgado-Elorduy et al., 2002b; Leonhard-Marek et al., 2010) im Panseninhalt bzw. 15 mg/l (ca. $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) im Blut (McDonald 1948) zeigt sich, dass bei einem ruminalen pH-Wert von 6,5 ein chemischer Gradient von ca. 3 zu 1 die Diffusion aus dem Pansen ins Portalblut begünstigt. Bei einem pH-Wert von 4,5 herrscht hingegen ein chemischer Gradient von 1 zu 33 in Richtung Pansen, zumal die Konzentration von NH_3 im Pansen in den nanomolaren Bereich abgesunken ist und fast ausschließlich NH_4^+ vorliegt. Wie schon von Hogan (1961) ausgeführt wurde, begünstigt der chemische Gradient für NH_3 in dieser Situation die Diffusion von NH_3 aus dem Portalblut in Richtung Pansen, womit wiederum eine Diffusion von NH_3 aus dem Pansen heraus unmöglich wird (Hogan 1961). Der auch bei diesem pH-Wert beobachtete Transport von

Ammoniak aus dem Pansen ins Blut muss demzufolge auf anderem Wege als durch Diffusion des NH_3 -Moleküls geschehen.

Zu einer ähnlichen Schlussfolgerung gelangte Gärtner (1963) auf der Grundlage einer Untersuchung der Bewegungen von $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ über das isolierte Pansenepithel von Rindern *in vitro*. Es wurden hierbei Fluxe bei insgesamt vier pH-Werten (pH 7,8; 6,8; 6,0 und 5,0) untersucht. Bei jedem einzelnen pH-Wert fanden sich stets eine lineare Korrelation zwischen der eingesetzten Konzentration von Ammoniak (NH_3 und NH_4^+) und der Fluxrate. Bei den beiden im sauren liegenden pH-Werten (pH 5,0 und 6,0) floss jedoch nur geringfügig weniger NH_3 und NH_4^+ durch das Pansenepithel als bei pH 7,8 und 6,8. Bei einem Transport in Form von NH_3 hätte die transportierte Menge beim Sprung von pH 5,0 auf pH 7,8 um einen Faktor von über 500 ansteigen müssen, doch stattdessen beobachtete Gärtner (1963) lediglich einen Anstieg um einen Faktor von etwa 1,5 (Gärtner 1963).

2.6.2 Der Einfluss von kurzkettigen Fettsäuren auf die Resorption von Ammoniak

Auch aus klinisch-praktischen Erwägungen kam die Lipiddiffusionstheorie ins Wanken. So weiß man aus zahlreichen Studien, dass die Verabreichung einer Diät mit großen Mengen leichtverdaulicher Kohlenhydrate bei Rindern zu einem stark sauren pH-Wert führt (Nocek 1997). Dies sollte wiederum die Resorption von Ammoniak in Form von NH_3 praktisch zum Erliegen bringen. Anhand von *in vivo* Versuchen konnte ein Abfall der Stickstoffausscheidungen aus dem Rinderpansen nach Erhöhung des Konzentratanteils im Futter bisher nicht beobachtet werden (Lascano et al., 2008; Agle et al., 2010; Aguerre et al., 2011).

SCFA sind das Hauptprodukt des mikrobiellen Kohlenhydratabbaus im Pansen und zugleich die Ursache für den fallenden pH-Wert infolge kohlenhydratreicher Fütterung. Es zeigte sich schon vor vielen Jahren, dass SCFA im Gegensatz zu Laktat einen direkt steigernden Effekt auf die Resorption von Ammoniak besitzen (Hogan 1961; Bödeker et al., 1992a; Remond et al., 1993a; Remond et al., 1993b). Diese Ergebnisse wurden mit einer intrazellulären Interaktion zwischen dem lipophilen NH_3 und protoniertem HSCFA erklärt. In Abhängigkeit vom intrazellulären pH-Wert kommt es im Inneren der Epithelzelle zu einer Dissoziation von HSCFA in H^+ und SCFA^- , einer Übertragung des Protons auf das NH_3 -Molekül und damit zur

Aufrechterhaltung des Konzentrationsgradienten für NH_3 (Bödeker et al., 1992a). Es ist darauf hinzuweisen, dass Bödeker et al. (1992a) in diesem Zusammenhang schon ausführte, dass dieses auf der Lipiddiffusion basierende Model nicht zu erklären vermag, wie der anschließende basolaterale Efflux des entstehenden NH_4^+ -Ions sowie des Fettsäureanions zu begründen seien. Interessanterweise weist Bödeker et al. (1992a) in diesem Kontext darauf hin, dass der Efflux des Fettsäureanions durch den hohen elektrochemischen Gradienten über der basolateralen Membran begünstigt wird (Bödeker et al., 1992a). Für die Anionen der Fettsäuren permeable Kanäle konnten dementsprechend mittlerweile an isolierten Zellen des Pansenepithels nachgewiesen werden (Stumpff et al., 2009b; Georgi et al., 2013).

Da der molekulare Radius und die Hydratationsenergie des NH_4^+ -Ions nahezu identisch zu der des K^+ -Ions ist, scheint ein Efflux von NH_4^+ durch die seit langem bekannten basolateralen Kaliumkanäle des Pansenepithels möglich (Harrison et al., 1975; Leonhard-Marek und Martens 1996; Abdoun et al., 2005). Dieser dürfte jedoch durch das basolateral eher ungünstige elektrochemische Potential eingeschränkt werden. Wenn man von einer Ammoniakkonzentration in Höhe von ca. $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ im Blut von Schafen (McDonald 1948) und einer Potentialdifferenz über die basolaterale Membran in Höhe von -70 mV ausgeht, ergibt sich nach Nernst, dass eine Anreicherung von $12 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ bzw. bei einer Potentialdifferenz von -50 mV eine Anstieg auf $6,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Ammonium im Zytosol der Zelle erfolgen muss, bevor ein kanalmediierter Netto-Efflux möglich wird. Eine gewisse Anreicherung von Ammonium in den Zellen des Epithels ist daher zu erwarten.

2.6.3 Der Einfluss von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ auf die Resorption von Ammoniak

Das $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Puffersystem stellt einen der wichtigsten Puffer im Vormagensystem des Wiederkäuers dar. Mit dem Speichel gelangen große Mengen an HCO_3^- in den Pansen und führen gemeinsam mit über die Pansenwand sezerniertem HCO_3^- zur Stabilisierung des pH-Wertes des Schafpansens (Masson und Phillipson 1951). Analog zu den Untersuchungen mit SCFA konnte ein positiver Effekt von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ auf die Resorption von Ammoniak nachgewiesen werden (Remond et al., 1993b). Außerdem fanden Bödeker et al. (1992b) heraus, dass es durch die Hemmung des Enzyms CA, das die Hydratisierung von Kohlendioxid zu Kohlensäure und die Dehydratisierung in umgekehrte Richtung katalysiert, zu einer Abnahme des Ammoniak-Fluxes aus dem Pansen von Schafen kommt. Ähnlich der

intrazellulären Übertragung von Protonen von HSCFA auf NH_3 führt das bei der Fermentation in großem Umfang gebildete CO_2 zur Ansäuerung des Zytosols. Dies wiederum stimuliert eine rasche sowie vollständige Protonierung von NH_3 zu NH_4^+ nach der Aufnahme in die Epithelzelle und hält den Konzentrationsgradienten für NH_3 aufrecht. Fehlt das Enzym CA, ist dies nicht möglich und der Ammoniak-Flux sinkt (Bödeker et al., 1992b). Wiederum bleibt dabei aber die Frage unbeantwortet, in welcher Form Ammoniak die basale Seite der Epithelzellen verlässt (Bödeker et al., 1992b).

2.7 Der Transport des Ammonium-Ions (NH_4^+) aus dem Pansen

2.7.1 Der Einfluss des pH-Wertes auf die Absorptionsrate von Ammoniak

Im Vorangegangenen wurde bereits dargelegt, dass die Hypothese, dass der Transport von Ammoniak über das Pansenepithel nicht alleine über die Diffusion der ungeladenen Form NH_3 erklärbar ist, schon Jahrzehnte alt ist (Hogan 1961; Siddons et al., 1985). Auch Gärtner und von Engelhardt (1964) stellten bei ihren Experimenten fest, dass die Resorptionsrate von Ammoniak nicht in dem Maße ansteigt wie es gemäß der Henderson-Hasselbach-Gleichung zu erwarten wäre. So postulierten sie erstmals explizit die Resorption in Form des ionisierten NH_4^+ (Gärtner und von Engelhardt 1964). Bödeker et al. (1990) wiederholten die *in vitro* Versuche von Gärtner (1963) an fistulierten Schafen *in vivo* bei drei verschiedenen pH-Werten (5,8; 6,8 und 7,7). Sie konnten auf diesem Wege abermals bestätigen, dass die Resorptionsrate proportional zur Gesamtkonzentration von Ammoniak verläuft, es aber bei der Verschiebung des $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ -Verhältnisses keinen Zusammenhang zwischen vorliegender Menge an NH_3 und der Netto-Ammoniakresorption gibt (Bödeker et al., 1990). Zur Erklärung wurde zunächst die Vermutung aufgestellt, dass im Bereich der absorptiven Oberfläche eine Titration von NH_4^+ zu NH_3 stattfinden könnte und dann NH_3 über die Pansenwand resorbiert wird (Bödeker et al., 1990).

In der Tat weiß man heute, dass z. B. das Rh-Antigen die Umwandlung von NH_4^+ zu NH_3 katalysiert, welches nachfolgend durch eine im Rh-Antigen befindliche Pore in entsprechende Zellen diffundieren kann (Winkler 2006). Allerdings handelt es sich bei diesem Prozess um einen elektroneutralen Transportvorgang. Demgegenüber weisen Untersuchungen am

Pansenepithel von Schafen eindeutig auf einen elektrogenen Transport des geladenen Ammonium-Ions hin (Bödeker und Kemkowski 1996; Abdoun et al., 2005).

2.7.2 Der Einfluss der Ammoniumresorption auf den Kurzschlussstrom

Mit der von Ussing und Zerahn (1951) etablierten Ussing-Kammer-Technik (Ussing und Zerahn 1951) wiesen Bödeker und Kemkowski (1996) am Pansenepithel von Schafen einen K^+ - und NH_4^+ -induzierten positiven Kurzschlussstrom nach (Bödeker und Kemkowski 1996). Zudem konnte der Ammoniaktransport über das Epithel durch die Veränderung des transepithelialen Potentials beeinflusst werden. So war der Ammoniak-Flux bei einem transepithelialen Potential von -25 mV (Polarität auf serosaler Seite) signifikant höher als bei einem Potential von +25 mV (Bödeker und Kemkowski 1996). Bei weiteren Untersuchungen stellte sich heraus, dass sowohl der K^+ - als auch der NH_4^+ -induzierte Strom durch Quinidin geblockt werden konnte. Bei Quinidin handelt es sich um ein großes Kation, das insbesondere die Porenregion von Kaliumkanälen blockiert. Interessanterweise reagierte nur der K^+ -induzierte transepitheliale Strom auf die Zugabe von Ba^{2+} , nicht aber der NH_4^+ -induzierte Strom (Bödeker und Kemkowski 1996). Insgesamt sprechen diese Befunde für einen NH_4^+ -Transport via Kationen-Kanäle im Pansen, zumal der Übertritt von NH_3 wegen der fehlenden Ladung keinen transepithelialen Strom induzieren dürfte. Weiterhin dürfte auch ein elektrischer Gradient oder der Einsatz von K^+ -Kanalkblockern keinen Effekt auf die Diffusion von NH_3 haben (Bödeker und Kemkowski 1996). Die Wirkung von Quinidin deutet darüber hinaus gegen einen Efflux auf dem parazellulären Weg und lässt einen kanalmedierten Transportprozess als wahrscheinlicher erscheinen.

Den Nachweis, dass der durch Ammoniak induzierte Kurzschlussstrom in einem Zusammenhang mit dem Transport des ionisierten NH_4^+ steht, erbrachte Abdoun (2005). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass bei einem pH-Wert von 6,4 ca. 70 % des vorhandenen Ammoniaks in Form von NH_4^+ über das Pansenepithel von Schafen transportiert werden, wohingegen bei einem pH-Wert von 7,4 die Resorption in Form von NH_3 überwiegt (Abdoun et al., 2005). Damit sprechen gewichtige Argumente für die Hypothese, dass NH_4^+ -Ionen durch Kanäle ins Epithel aufgenommen werden können. Um welche Kanäle es sich hierbei ganz genau handelte, konnte jedoch auf der Basis der verwendeten Methoden nicht geklärt werden.

Zum Zeitpunkt der durch Abdoun (2005) durchgeführten Studie war bereits bekannt, dass das Pansenepithel über eine K^+ -Leitfähigkeit verfügt (Ferreira et al., 1966a; Ferreira et al., 1966b; Leonhard-Marek und Martens 1996). Die Schlussfolgerung, ein Transport von NH_4^+ via K^+ -Kanälen sei möglich, lag daher nahe. Die Mobilität beider Ionen unterscheidet sich in wässriger Lösung nicht (Berry und Coleman 1998); und auch die Energie, die notwendig ist, um die Hydrathülle abzustreifen, ist bei beiden Kationen sehr ähnlich (K^+ : $-314 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$; NH_4^+ : $-293 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ hingegen Na^+ : $-398 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) (Neuenschwander 2012). Dementsprechend konnte eine Permeabilität von Kaliumkanälen für NH_4^+ schon an vielen anderen Geweben nachgewiesen werden. Es existieren dabei unterschiedliche K^+ -Kanäle, die je nach Typ durch unterschiedliche Substanzen blockierbar sind und auch variable Transportverhältnisse von NH_4^+/K^+ aufweisen (Latorre und Miller 1983). Die fehlende Hemmung von Ba^{2+} auf den NH_4^+ -induzierten Strom könnte daher auf unterschiedliche K^+ -Kanäle im Pansenepithel hindeuten, von denen nicht alle eine NH_4^+ -Leitfähigkeit besitzen (Bödeker und Kemkowski 1996). Die Annahme, dass das Pansenepithel Leitfähigkeiten für NH_4^+ exprimiert, wird durch die Ergebnisse von Patch-Clamp-Messungen untermauert (Abdoun et al., 2005).

2.7.3 Der Einfluss von Ammonium auf den pH_i von isolierten Zellen des Pansenepithels

Um den Mechanismus der pH-Regulation kultivierter Zellen zu untersuchen, gilt die NH_3/NH_4^+ -Präpulsstechnik als Standardverfahren (Boron und De Weer 1976). Es wurde von Müller et al. (2000) zur Ansäuerung von Pansenepithelzellen des Schafes herangezogen. Die Autoren konnten in dieser Arbeit zeigen, dass neben dem NHE auch HCO_3^- -abhängige Transporter wie der Na^+/HCO_3^- -Cotransporter an der intrazellulären pH-Regulation von Pansenepithelzellen beteiligt sind (Müller et al., 2000). Diese Daten lassen aber ebenso Rückschlüsse auf den Transport von NH_3/NH_4^+ durch Zellen des Pansenepithels zu, obwohl dies nicht das erklärte Ziel dieser Untersuchungen war.

Werden kultivierte Pansenepithelzellen in ein NH_4Cl -haltiges Medium gegeben, kommt es vermutlich durch einen massiven Einstrom von NH_3 mit nachfolgender Bindung von Protonen, zunächst zu einem deutlichen Anstieg des pH_i . Ist der Konzentrationsgradient für NH_3 ausgeglichen, ist eine Phase zu beobachten, in der es zu einer leichten Ansäuerung kommt. Ähnliches beobachtet man bei einem Großteil von Zellen unterschiedlichster

Herkunft. Schon Boron und De Weer (1976) vermuteten, dass in dieser Phase NH_4^+ aufgrund des elektrischen Gradienten in die Zelle hineinströmt. Werden die Zellen anschließend in ein NH_4Cl -freies Medium gegeben, kommt es zu einem starken Abfall des pH_i unterhalb des Ausgangswertes gefolgt von einer langsamen Rückregulierung zum Ausgangswert (Müller et al., 2000). Diese Ansäuerung nach Entfernung von Ammonium ist das Ziel der NH_4Cl -Präpulsstechnik und wird durch einen Ausstrom von NH_3 bewirkt. Dabei bleiben die während des Präpulses mit NH_4^+ in die Zelle transportierten H^+ -Ionen im Zellinneren zurück und führen zur erwünschten Ansäuerung der Zellen. Die durch die NH_4^+ -Präpulsstechnik erzielbare Ansäuerung von Pansenepithelzellen (Müller et al., 2000) darf von daher als weiteres Indiz für die Permeabilität der Zellen für die geladene Form des Ammoniaks (NH_4^+) angesehen werden.

2.7.4 Der Einfluss von Ammonium auf den elektroneutralen Na^+ -Transport bei unterschiedlichen mukosalen pH-Werten

Wie bereits dargelegt, wurde bei den Versuchen von Müller et al. (2000) deutlich, dass der Influx von NH_4^+ zu einer Ansäuerung des intrazellulären pH-Wertes von Pansenepithelzellendes Schafes führt, der anschließend durch die Aktivität des Na^+/H^+ -Austauschers (NHE) rückreguliert wird (Müller et al., 2000). In späteren Ussing-Kammer-Experimenten wurde der Zusammenhang zwischen einer Ammoniumexposition und der Aktivierung des NHE auch am intakten Pansenepithel des Schafes untersucht (Abdoun et al., 2005). Im experimentellen Ablauf sind aber gravierende Unterschiede festzustellen, die für das Verständnis des Nachfolgenden von großer Bedeutung sind: Zunächst verwendeten Abdoun et al. (2005) intakte Epithelien, bei denen lediglich die mukosale Seite mit NH_4Cl behandelt wurde, wohingegen die basolaterale Seite fortlaufend mit NH_4Cl -freier Lösung umspült wurde (Abdoun et al., 2005). Ferner wurde NH_4Cl nicht in Form eines Präpulses kurzzeitig appliziert, sondern konnte über einen längeren Zeitraum hinweg auf die mukosale Seite des Epithels einwirken.

Die Effekte von Abdoun et al. (2005) waren abhängig vom pH-Wert. Bei einem mukosalen pH-Wert von 7,4 kam es zur Hemmung der elektroneutralen Na^+ -Resorption, bedingt durch eine Hemmung des Na^+/H^+ -Austauschers. Die Autoren führten dies auf einen vermehrten Transport von NH_3 ins Zytosol und eine damit verbundene Alkalinisierung zurück. Wurde der pH-Wert dagegen auf 6,4 eingestellt, kam es zu einer Steigerung des elektroneutralen Na^+ -

Transportes mittels Na^+/H^+ -Austauscher (Abdoun et al., 2005). In diesem Fall überwog ganz offensichtlich der Influx von Ammoniak in Form von NH_4^+ in die Zelle. Im alkalischen Zytosol kam es zur (partiellen) Dissoziation mit nachfolgendem basolateralem Efflux in Form von NH_3 . Die zurückbleibenden Protonen bewirkten eine Ansäuerung des Zytosols mit Stimulation des Na^+/H^+ -Austauschers (Abdoun et al., 2005). In der gleichen Arbeit wurden auch Ammoniak-Fluxe über das Pansenepithel von Schafen gemessen, wobei sich bei einem pH von 6,4 beobachten ließ, dass ungefähr 70 % der Gesamtmenge apikal als NH_4^+ aufgenommen wurden, während bei pH 7,4 80 % der Aufnahme auf Influx von NH_3 zu basieren schienen.

In der Arbeit von Abdoun et al. (2005) wurde von Seiten der am intakten Epithel arbeitenden Autoren primär an einen Transport von NH_4^+ über die am Pansenepithel damals bereits sicher nachgewiesene Kaliumleitfähigkeit gedacht (Bödeker und Kemkowski 1996; Leonhard-Marek und Martens 1996; Abdoun et al., 2005). Wie bereits dargelegt, dürfte insbesondere der basolaterale Efflux über Kanäle mit hoher Kaliumselektivität erfolgen, da ein basolateraler Influx von Na^+ den gerichteten Transport von Na^+ unterbinden dürfte. Im Patch-Clamp-Teil von Abdoun et al. (2005) zeigten sich jedoch schon zum damaligen Zeitpunkt Hinweise auf die Beteiligung von nicht-selektiven Kationenkanälen am Transport von NH_4^+ . So wurde in der Diskussion dieser Arbeit vermerkt, dass in den Patch-Clamp-Versuchen das Ziel verfolgt wurde, die Beteiligung der nicht-selektiven Kationenkanäle am Gesamtstrom der Einzelzelleitungen durch die Wahl der Pipettenlösung zu minimieren (Abdoun et al., 2005). Eine Beteiligung nicht-selektiver Kationenkanäle am Transport von NH_4^+ wurde demzufolge seitens dieser Arbeit keinesfalls ausgeschlossen. An diese Beobachtungen schließt die vorliegende Arbeit an.

2.8 Welche Transportproteine gibt es für Ammoniak und Ammonium?

Nicht nur am Pansen von Wiederkäuern (McDonald 1948), sondern auch im Dickdarm (Cermak et al., 2002) und in der Niere (Weiner und Verlander 2011) wird Ammoniak resorbiert und von letzterer zudem sezerniert, wobei die Ammoniakausscheidung in Form von NH_3 oder NH_4^+ eng mit der lebenswichtigen Regulierung des Säure-Base-Haushaltes verknüpft ist. In Verbindung mit der in dieser Arbeit vorgenommenen genaueren

Charakterisierung der Ammoniakresorption am Pansen werden im nachfolgenden Unterkapitel die bekannten Transportwege für Ammoniak kurz erörtert.

2.8.1 $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ -Austausch über einen NHE-vermittelten Transport

Der im proximalen Teil des Nierentubulus apikal lokalisierte NHE3 ist an der Sekretion von NH_4^+ in das Tubuluslumen beteiligt. Die im Zytosol der Tubuluszellen liegende Bindungsstelle für H^+ lässt ebenfalls die Bindung von NH_4^+ zu und ermöglicht damit auch die NH_4^+ Sekretion ins Tubuluslumen im Austausch für Na^+ (Weiner und Verlander 2011). In Versuchen konnte diesbezüglich gezeigt werden, dass auch luminales H^+ mit luminalem Na^+ , Li^+ und NH_4^+ um die Bindungsstelle konkurriert (Aronson et al., 1983). Dementsprechend kann das gleiche Protein einen Na^+/Na^+ - oder Li^+/H^+ -Austausch vermitteln, dabei ist auch ein NH_4^+/H^+ - und H^+/Li^+ -Austausch denkbar (Kinsella und Aronson 1981).

Der basolateral im Bereich des dicken aufsteigenden Teils der Henle-Schleife lokalisierte $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ -Austauscher (NHE1 und NHE4) (Chambrey et al., 2001) ist ebenfalls am Austausch von intrazellulärem NH_4^+ und interstitiellem Na^+ beteiligt (Weiner und Verlander 2011). In Bezug auf die Charakterisierung deuten Untersuchungen darauf hin, dass NHE1 im Gegensatz zu NHE4 eine nur sehr untergeordnete Rolle bei der Regulierung der $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ Homöostase spielt (Bourgeois et al., 2010; Weiner und Verlander 2011).

2.8.2 NH_4^+ -Transport über K^+ -Kanäle

K^+ und NH_4^+ besitzen, wie bereits erwähnt (siehe Kap. 2.7.2), eine nahezu identische Konfiguration der äußeren Elektronenhülle. Aus diesem Grund dürften Transportproteine, die eine Bindungsstelle für K^+ aufweisen, in der Regel gleichermaßen über eine Affinität für das ähnlich beschaffene Ammonium-Ion verfügen. Vor diesem Hintergrund ist es sehr naheliegend, dass NH_4^+ auch K^+ -Kanäle passieren kann (Good 1994; Weiner und Hamm 2007). Dabei unterstützt das unter basalen Bedingungen intrazelluläre negative Potential eher die Absorption von NH_4^+ als dessen Abgabe, obwohl letztere bei entsprechenden Gradienten ebenso denkbar ist (Weiner und Verlander 2011).

Im Rahmen von *in vitro* Experimenten an proximalem Tubulusepithel von Mäusen konnte dargelegt werden, dass es nach einer luminalen Erhöhung der K^+ -Konzentration zu einer vom Na^+/H^+ -Austauscher unabhängigen Stimulation der NH_4^+ -Sekretion kam (Nagami 1990). Dass ein solcher Transport am Tubulussystem der Niere vorhanden ist, belegen ferner Versuche, bei denen es durch die Zugabe von 5-(N-Ethyl-N-isopropyl)amiloride (EIPA), einem Hemmstoff des Na^+/H^+ -Austauschers, zu keiner Veränderung der Ammoniakresorption kam. Wurde zusätzlich Ba^{2+} , ein potenter, nicht selektiver K^+ -Blocker zugegeben, wurde dagegen eine Abnahme der Ammoniaksekretion nachgewiesen (Simon et al., 1992).

Ein weiteres Indiz für einen engen Zusammenhang zwischen dem Transport von K^+ und NH_4^+ ist die Wirkung von Aldosteron. Physiologisch kommt es durch die Ausschüttung von Aldosteron im distalen Nephronabschnitt zum vermehrten Einbau von ENaC-Kanälen und der Na^+/K^+ -ATPase (Fakler und Fahlke 2010), was wiederum zu einer gesteigerten Rückresorption von Na^+ und Wasser führt. Bei krankhaft bedingtem Hyperaldosteronismus kommt es zur klassischen Symptomtrias Hyponatriämie, Hypokaliämie und systemischer Alkalose. In Verbindung mit der beschriebenen verstärkten Rückresorption von Na^+ kommt es dabei zur Depolarisation der Zellen und einer daraus resultierenden kompensatorischen Sekretion von K^+ und NH_4^+ , die sich in einer systemischen Alkalose manifestiert (Fakler und Fahlke 2010). Analog zum Pansen gibt es im Tubulusepithel der Niere verschiedene Arten von K^+ -Kanälen. Welche Kanalspezies für die NH_4^+ -Sekretion jeweils verantwortlich sind, konnte bis heute nicht endgültig geklärt werden.

2.8.3 Rolle der Na^+/K^+ -ATPase

Die Na^+/K^+ -ATPase ist, wie bereits beschrieben, basolateral lokalisiert und sorgt für die Aufrechterhaltung des elektrochemischen Gradienten. In der Niere wird dieser Transportweg auch für die Aufnahme von NH_4^+ über die K^+ -Bindungsstelle genutzt (Weinstein 1994; Weiner und Verlander 2011). Der Anteil an der gesamten NH_4^+ -Absorption aus dem Interstitium über diese ATPase scheint eher gering zu sein und lässt auf eine Rückkopplung bei zu hohen interstitiellen NH_4^+ -Konzentrationen schließen (Good 1994).

2.8.4 NH_4^+ -Transport über $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Transporter

Der Natrium-Kalium-2-Chlorid-Co-Transporter ($\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Co-Transporter), der am dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife lokalisiert ist, stellt ebenfalls einen Absorptionsmechanismus für NH_4^+ dar (Good 1988; Good 1994). Kinne et al. (1986) konnten in ihren Versuchen hierzu die Beobachtung machen, dass NH_4^+ anstelle von K^+ via $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Co-Transporter absorbiert werden kann (Kinne et al., 1986).

2.8.5 Rh -Glykoproteine – Säugetieranaloga zu MEP/AMT bei Bakterien, Hefen und Pflanzen

Die in Säugetieren vorkommende Rh-Glykoproteinfamilie ist ein Analogon der in Bakterien, Hefen und Pilzen nachgewiesenen Mep/AMT-Proteinfamilie, deren Mitglieder als Ammoniaktransporter dienen (Winkler 2006; Weiner und Verlander 2011). Es sind bislang drei verschiedene Proteine in Säugetieren identifiziert worden. Hierbei handelt es sich um die folgend einzeln beschriebenen:

- Das RhAG-Protein (*Rhesus-associated glycoprotein*) ist Teil des Rh-Komplex in Erythrozyten und ist am elektroneutralen Transport von NH_3 beteiligt (Weiner und Verlander 2011).
- Das RhBG-Protein (*Rhesus type B glycoprotein*) konnte in vielen anderen Organen wie z. B. Niere, Leber, Haut, Hoden, Lunge und Gastrointestinaltrakt nachgewiesen werden (Lee et al., 2013). Nakhoul et al. (2005) schlossen aus ihren Experimenten, dass RhBG einen elektrogenen Transport von NH_4^+ vermittelt (Nakhoul et al., 2005). Neuere Studien postulieren einen Netto- NH_3 -Transport, wobei lange Jahre die Frage, ob es sich um einen NH_4^+/H^+ -Austauscher handelt, kontrovers diskutiert wurde (Ludewig 2004; Zidi-Yahiaoui et al., 2005; Mak et al., 2006).
- Das RhCG-Protein konnte in der Niere, in den Hoden, in der Lunge, in der Leber, im Gastrointestinaltrakt und im ZNS nachgewiesen werden (Lee et al., 2013). Ähnlich dem Glykoprotein RhBG herrscht auch bei diesem Glykoprotein Uneinigkeit darüber, ob ein Transport in Form von NH_3 (Zidi-Yahiaoui et al., 2005), in Form von NH_4^+ , ein NH_4^+/H^+ -Austausch oder ein Transport beider Formen des Ammoniaks möglich ist (Bakouh et al., 2004).

Problematisch erweist sich bei allen Studien an überexprimierenden Zellsystemen die praktisch ubiquitäre Präsenz von Kaliumkanälen und anderen Transportern endogenen Ursprungs, durch die immer gewisse Mengen von NH_4^+ transportiert werden können und folglich einen vermeintlichen Transport von NH_4^+ durch das überexprimierte Protein vortäuschen. In diesem Zusammenhang bedenkenswert ist ein von Winkler (2006) als einem der Pioniere der Erforschung der Rh-Glykoproteinfamilie vorgebrachtes Argument (Winkler 2006). Die ganze Rh-Glykoproteinfamilie wurde entdeckt, als man nach Mechanismen suchte, mit denen z. B. Bakterien oder Pflanzenzellen geringste Spuren von Stickstoff aus einer Nährlösung herausziehen konnten („ammonia scavenging“). Dieses gelingt durch eine außerordentlich hohe Permeabilität der Zellmembran für NH_3 , welches im Zytosol sofort zu NH_4^+ umgewandelt wird. Auf diesem Wege kommt es zur Anreicherung von NH_4^+ im Zytosol. Eine für NH_4^+ permeable Pore in der Zellmembran würde bei den herrschenden Konzentrationsgradienten hingegen zu einem Efflux von NH_4^+ führen. Diese Sicht scheint sich zunehmend durchzusetzen und auch Weiner und Verlander (2003, 2010, 2011) und Boron (2010) sehen die Amt/MEP/Rh-Proteinfamilie mittlerweile als Gaskanäle für den Transport von NH_3 (Weiner und Verlander 2003; Boron 2010; Weiner und Verlander 2010; Weiner und Verlander 2011).

2.8.6 H^+/K^+ -ATPase

Die H^+/K^+ -ATPase gehört zur P-Typ-ATPase-Familie (Weiner und Verlander 2011). Diese, auf der apikalen Seite des Sammelrohrs der Niere lokalisierte ATPase, ermöglicht die Sekretion von NH_4^+ . Aufgrund von Versuchen, bei denen ein K^+ -Entzug zu einer gesteigerten NH_4^+ Sekretion führte, konnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass NH_4^+ wieder über die Bindungsstelle von K^+ aus der Zelle heraus gelangt (Nakamura et al., 1999).

2.8.7 Harnstofftransporter UT-B

Untersuchungen an *Xenopus leavis* Oozyten unterstützen die Annahme, dass der Harnstofftransporter UT-B (SLC14A1) neben der Permeabilität für H_2O , Harnstoff und CO_2 auch eine Leitfähigkeit für NH_3 besitzt (Geyer et al., 2013b).

2.8.8 Aquaporine (AQP)

Aquaporine sind Kanäle im Nierenepithel, die eine Regulierung des Wasserhaushalts gewährleisten. H_2O und NH_3 zeichnen sich durch ähnliche Polarität und molekulare Größe aus und ein Transport durch Aquaporine wird diskutiert (Weiner und Verlander 2011). Es konnte zudem bereits gezeigt werden, dass einige der Aquaporine eine Permeabilität für NH_3 besitzen (Litman et al., 2009; Geyer et al., 2013a). So konnte bei Experimenten mit *Xenopus laevis* Oozyten eine Permeabilität für NH_3 durch das Aquaporin 1 nachweisen werden (Nakhoul et al., 2001; Musa-Aziz et al., 2009). Darüber hinaus sind auch AQP3, AQP8 und AQP9 zu den NH_3 -transportierende Aquaporinen zu zählen (Holm et al., 2005).

2.9 Nicht-selektive Kationenkanäle (NSCC)

Eine weitere in Bezug auf das Thema dieser Dissertation sehr interessante Kanalfamilie, die bereits im Zusammenhang mit der elektrogenen Natriumresorption am Pansen kurz beschrieben wurde, stellen die NSCC dar (s. Kap. 2.5.6). Nicht nur am Pansen, sondern auch an anderen Organen wie z. B. dem Oesophagus (Awayda et al., 2004) oder in der Lunge (Kemp und Kim 2004), aber ebenso im Colon (DeSoignie und Sellin 1994), finden sich Leitfähigkeiten mit einer außerordentlichen Ähnlichkeit zu der des Pansens sowie mit deutlicher Abgrenzung zu den klassischen ENaC-Kanälen des distalen Tubulus der Niere oder des Colons (Rossier et al., 2002). Aktuelle Studien am Caecum des Schweins deuten ebenfalls auf einen elektrogenen Transport von Ammonium hin (Stumpff et al., 2013), der durch ähnliche Kanäle wie etwa die am Kaninchen näher charakterisierten nicht-selektiven Kationenkanäle erfolgen könnte (DeSoignie und Sellin 1994). Besonders interessant ist dabei, dass bereits Burckhardt und Frömter (1992) bei ihren Untersuchungen an *Xenopus laevis* Oozyten eine Beteiligung von NSCC an der Leitfähigkeit von $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ über die Zellmembran in Betracht zogen (Burckhardt und Frömter 1992). Aus der äußerst großen Vielfalt von nicht-selektiven Kationenkanälen soll nun die Gruppe näher beschrieben werden, deren Expression am Pansen aufgrund der Ergebnisse dieser Dissertation am wahrscheinlichsten erscheint.

2.9.1 TRP-Kanäle – eine nicht-selektive Kationenkanalfamilie

TRP-Kanälen, die erstmalig 1999 an *Drosophila melanogaster* entdeckt wurden, bilden eine große Familie nicht-selektiver Kationenkanälen, die hinsichtlich ihres strukturellen Aufbaus in die folgenden sieben Unterfamilien unterteilt werden: TRPC (classical oder canonical), TRPV (Vanilloid), TRPM (Melastatin), TRPP (Polycystin), TRPML (Mucolipin), TRPN (no mechanoreceptor potential C) und TRPA (Ankyrin) (Vennekens et al., 2002; Clapham 2003; Clapham et al., 2003; Vriens et al., 2004; Montell 2005). Sämtliche TRP-Kanäle bilden sechs Transmembransegmente mit einer Pore zwischen dem fünften und sechsten Segment aus und besitzen jeweils einen zytosolischen C und N Terminus, wobei die Länge und Sequenz der intrazellulären Termini zwischen den einzelnen Unterfamilien stark variieren und damit als ein wichtiges Einteilungskriterium für die Untergruppen herangezogen werden können (Clapham 2003; Clapham et al., 2003; Vriens et al., 2004; Owsianik et al., 2006). Alle Mitglieder der TRP-Familie besitzen eine hohe Leitfähigkeit für Na⁺, wohingegen die Leitfähigkeiten der anderen Kationen wie auch die Art der Aktivierung sehr heterogen ausfallen (Montell et al., 2002; Pedersen et al., 2005; Owsianik et al., 2006). TRP-Kanäle sind an sensorischen Wahrnehmungen, wie beispielsweise Sehen, Riechen, Schmecken und Hören, mechanischen und thermischen Reizen sowie an der Regulation auf osmotische Veränderungen beteiligt (Caterina et al., 1997; McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002b; Peier et al., 2002a; Suzuki et al., 2003; Venkatachalam und Montell 2007). Auf zellulärer Ebene ermöglichen TRP-Kanäle einzelnen Zellen auf ihre Umgebung zu reagieren (Venkatachalam und Montell 2007). So sind TRP-Kanäle in Endothelzellen etwa maßgeblich an der Regulierung des Gefäßtonus beteiligt (Freichel et al., 2001). Auch die Freisetzung von lebenswichtigen Hormonen wie Insulin (Togashi et al., 2006; Cheng et al., 2007) oder die Sekretion von Speichel aus den Speicheldrüsen (Singh et al., 2001) beruht auf der Aktivierung von TRP-Kanälen. Weitere Beispiele, bei denen die TRP-Kanäle einen Einfluss auf verschiedene Organfunktionen haben, sind die Harnblasenentleerung (Togashi et al., 2006), die Regulierung des Ca²⁺- und Mg²⁺-Haushaltes über die intestinale Resorption, Rückresorption in der Niere (Hoenderop et al., 2003) und der Ein- und Ausbau im Knochengewebe (van der Eerden et al., 2005; Dimke et al., 2011).

Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt konnten in sehr vielen Geweben wie z. B. im ZNS, in der Haut, im Herzen, in der Lunge, Prostata, Gefäßendothelien, in glatten Muskelzellen, peripheren Blutzellen, im Blasengewebe, in der Mundhöhle und in vielen Bereichen des

Gastrointestinaltraktes, wie z. B. dem Colongewebe, TRP-Kanäle nachgewiesen werden (Gamberucci et al., 2002; Riccio et al., 2002; Andrade et al., 2006; Albert et al., 2009; Van Haute et al., 2010; Holzer 2011a; Holzer 2011b; Kaji et al., 2011; Wang et al., 2011; Jardin et al., 2013; Nilius und Biro 2013).

2.9.2 TRP-Kanäle im Gastrontestinaltrakt

Im Gastrointestinaltrakt sind bereits über 20 verschiedene TRP-Kanäle nachgewiesen worden, die einerseits als Detektoren auf mechanische, chemische oder physikalische Reize reagieren und zur Schmerzempfindung führen, als *Transducer* an der Steuerung der Motilität und des Blutflusses nach Aktivierung von Rezeptoren dienen oder als Ionenkanal am Transport beteiligt sind (Holzer 2011a). TRP-Kanäle sind darüber hinaus an wichtigen absorptiven wie auch sekretorischen Prozessen beteiligt. Exemplarisch sind die Kanäle TRPV5, TRPV6, TRPM6 und TRPM7 für die intestinale Ca^{2+} und/oder Mg^{2+} -Resorption relevant (Bianco et al., 2007; Benn et al., 2008; Suzuki et al., 2008; Holzer 2011a; Holzer 2011b). Die Expression des TRPM7 am Pansen wurde bereits erwähnt (Schweigel et al., 2008). Demgegenüber scheint der TRPV6 zumindest beim Schaf hauptsächlich vom Jejunum, nicht aber vom Pansen exprimiert zu werden (Wilkens et al., 2006; Wilkens et al., 2009).

Es ist bekannt, dass TRP-Kanäle durch eine Vielzahl an Stimuli wie z. B. Hitze, verschiedene Botenstoffe oder auch pflanzliche und meist sehr geschmacks- und geruchsintensive Substanzen, wie z. B. Capsaicin, Menthol oder Senföl, aktiviert werden können (Venkatachalam und Montell 2007; Vriens et al., 2008). Die Mundhöhle ist aus physiologischer Perspektive ein Ort, an dem viele mechanische, thermische, aber auch chemische Reize wirken. Deshalb ist es nicht verwunderlich, dass in der Mundhöhle, genauer im Bereich der Backenschleimhaut, der Zunge und des Gaumens, TRPV Kanäle (TRPV3, TRPV4, TRPV5) und der TRPM8 (primär bukkal) durch die TRP-Agonisten Kampher, Capsaicin und Menthol aktiviert werden können (Wang et al., 2011). Carvacrol, Carveol, Thymol und Borneol sind starke Aktivatoren des TRPV3-Kanals (Vogt-Eisele et al., 2007). Der erstmalig in der Prostata nachgewiesene TRPM8-Kanal konnte ebenfalls in sensorischen Neuronen des dorsalen Spinalganglions und Trigemiusnervs, aber auch im Magenfundus, in der Gefäßmuskulatur und im Blasenepithel identifiziert werden (McKemy et al., 2002; Nealen et al., 2003; Stein et al., 2004; Mustafa und Oriowo 2005; Yang et al., 2006).

In sensorischen Nerven wird der TRPM8 als ein nicht-selektiver Kationenkanal beschrieben, der durch Temperaturen $< 25^{\circ}\text{C}$ oder kühlende Substanzen, z. B. Menthol, aktiviert wird (Vriens et al., 2008). Menthol fungiert dabei lediglich als ein Vertreter einer sehr großen Menge an Stoffen, die ursprünglich aus Pflanzen isoliert wurden und inzwischen als sehr spezifische Modulatoren von TRP-Kanälen gelten (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002b; Voets et al., 2005; Vriens et al., 2008).

2.9.2.1 Eigenschaften und Aktivierungsmechanismus

Generell gelten Substanzen wie Menthol, Thymol oder auch Capsaicin als spezielle TRP-Modulatoren, obwohl die exakten Eigenschaften und der Mechanismus der Aktivierung nach wie vor nicht gänzlich bekannt sind. Laut Clapham (2003) sind mögliche Gründe hierfür einerseits die zum Teil begrenzten Kenntnisse aller in Frage kommenden Liganden, andererseits ist aber auch das Problem im Blick zu behalten, dass die meisten TRP-Kanäle bis heute nur in überexprimierenden Systemen und nicht in der nativen Umgebung untersucht wurden (Clapham 2003).

TRP-Kanäle bilden Tetramere und besitzen keinen Spannungssensor. Dies schließt eine spannungsabhängige Modulation durch divalente Kationen allerdings keineswegs aus. Grundsätzlich kann zwischen einer indirekten Aktivierung über second-messenger und der direkten Interaktion zwischen Kanal und Ligand differenziert werden (Montell 2011). Die einfachste Variante ist die direkte Interaktion (z. B. Temperaturveränderung oder Menthol) mit dem Kanal, welche die Aktivierung initiiert (Montell 2011). Es konnte so z. B. gezeigt werden, dass vier unabhängige Bindungsstellen im Bereich der Transmembransegmente S2 bis S4 für Menthol am TRPM8 existieren (Janssens und Voets 2011).

Die indirekte Aktivierung erfolgt dagegen über second-messenger und anhand des Verlaufs kann zwischen speichervermittelten Kanälen (store-operated channels, SOC), rezeptorvermittelten Kanälen (receptor operated channels, ROC) und einer Vesikel-Fusions-Theorie (vesicle fusion hypothesis) unterschieden werden (Firth et al., 2007).

Bei der SOC-Aktivierung tritt ein G-Protein gekoppelter Signalweg auf. Dabei führt die Bindung von Inositoltriphosphat (IP₃) am IP₃-Rezeptor zur Entleerung der intrazellulären Ca²⁺-Speicher. Der Anstieg des Ca²⁺-Spiegels im Zytosol aktiviert daraufhin sekundär den

TRP-Kanal und ein vermehrter Einstrom von Kationen führt zur Depolarisation des Ruhemembranpotentials der Zellen.

ROCs werden dagegen durch Diacylglycerol (DAG) und Phosphokinase C (PKC) aktiviert (Clapham 2003; Firth et al., 2007).

2.10 Zusammenfassung für die eigene Fragestellung

Die Ergebnisse der Experimente in den letzten Jahren deuten darauf hin, dass Ammoniak bei einem physiologischen pH-Wert im Pansen zu einem großen Teil in ionisierter Form über das Pansenepithel transportiert wird. An anderen Organen wie etwa der Niere sind bereits mehrere mögliche Transportproteine für den Transport von Ammoniak und Ammonium charakterisiert (für eine Übersicht siehe Weiner und Verlander 2011).

Zahlreiche Untersuchungen zeigten, dass elektrogene Mechanismen an der Aufnahme von Ammonium über das Pansenepithel des Schafes beteiligt sind. Gut belegt ist am Pansenepithel dieser Spezies die Expression von Kaliumkanälen (Leonhard-Marek und Martens 1996; Abdoun et al., 2005) und von nicht-selektiven Kationenkanälen, die neben Na^+ und K^+ *in vitro* auch Li^+ und Cs^+ transportieren (Lang und Martens 1999; Schultheiss und Martens 1999; Leonhard-Marek 2002; Leonhard-Marek et al., 2005).

Während der basolaterale elektrogene NH_4^+ -Efflux fast zwingend über einen Kaliumkanal mit hoher Selektivität für K^+ stattfinden muss, da bei basolateral lokalisierten NSCC der Natriumgradient nicht aufrecht erhalten werden könnte, erscheint eine Beteiligung des apikalen nicht-selektiven Kationenkanals am Transport von NH_4^+ über den Schafpansen als eine durchaus denkbare Möglichkeit. Unbekannt ist derzeit aber noch, ob diese Kanäle für das NH_4^+ -Ion permeabel sind und ob der Pansen des Rindes ähnliche Kanäle exprimiert.

Ausgehend von den oben dargelegten Ausführungen können die Ziele der vorliegenden Dissertation in den folgenden Fragen formuliert werden:

- I. Exprimiert das Pansenepithel des Rindes nicht-selektive Kationenkanäle und sind diese permeabel für das Ammonium-Ion?
- II. Gibt es Hinweise, die bei der molekularbiologischen Identifizierung des zugrundeliegenden Transportproteins helfen könnten?
- III. Gibt es Möglichkeiten, diesen Transportmechanismus zu beeinflussen?

IV. Basierend auf diesen Ergebnissen soll auch die Frage diskutiert werden, ob die Resorption von Ammoniak aus dem Pansen ein Zufallsprodukt der physikalischen Eigenschaft des Organs ist oder ob hinter dem Resorptionsgeschehen eine physiologische Funktion stehen könnte.

3 Material und Methoden

Übersicht über die verwendeten Methoden

Die Untersuchungen zum Transport von Ammonium über das Pansenepithel des Rindes erfolgten durch verschiedene *in vitro* Methoden.

1. Bestimmung des NH_3 - und NH_4^+ - Fluxes mittels Ammoniak elektrode nach Inkubation in der Ussing-Kammer
2. Patch-Clamp-Methode (Messungen in *Whole-Cell*-Konfiguration)
3. Mikroelektrodenteknik
 - a. Ionenselektive („Double-barreled“) Mikroelektroden
 - b. konventionelle, einlumige Mikroelektroden
 - c. Messungen ohne Punktion

3.1 Herkunft des Epithels

Die für die Messungen und die Isolierung von primären Pansenzellen verwendeten Pansenepithelien von Rindern stammten von Schlachthöfen aus der Umgebung Berlins. Die Tiere kamen aus verschiedenen Betrieben. Es wurde keine Statistik bezüglich Alter, Geschlecht oder Fütterung der Tiere geführt.

3.1.1 Gewinnung, Präparation und Transport des Epithels

Die Tiere wurden mittels Bolzenschuss betäubt und durch anschließenden Blutentzug getötet. Entlang des Schlachtbandes wurde der Pansen durch das Schlachthofpersonal entnommen und uns zur Gewinnung des Epithels vorgelegt. Die Entnahme des ca. 10 cm^2 großen Gewebestückes erfolgte aus dem ventro-lateralen Bereich des Pansens (Übergang des ventralen Pansensacks zum Vorhof). Zur Entfernung von groben Futterbestandteilen wurde das gewonnene Gewebe mit reichlich Transportpufferlösung (Zusammensetzung siehe Anhang Tab. 21) gewaschen. Das Epithel wurde durch „Stripping“ von seiner Fett- und Muskelschicht befreit und während des Transports in einer warmen (37°C), mit Carbogen (95 % O_2 und 5 % CO_2) begasten Transportpufferlösung (pH-Wert 7,4) transportiert. Der Transport dauerte ca. 90 Minuten. Insgesamt erstreckte sich die Zeitspanne vom Töten des

Tieres bis zum Beginn der Versuche auf ca. 180 Minuten. Beim Erreichen des Labors wurde das Epithel in frische Transportpufferlösung gegeben und bis zum Versuchsbeginn bei 37°C weiterhin mit Carbogen begast.

3.2 Ussing-Kammer-Versuche

Die verwendete Ussing-Kammer-Methode basiert auf der im Jahre 1951 von dem dänischen Wissenschaftler Hans Ussing entwickelten *in vitro* Methode zur Messung des Kurzschlussstroms über isoliertes Gewebe (Ussing und Zerahn 1951). Dabei wurde das Gewebe zwischen zwei Plexiglaskammern eingespannt. Zum Schutz vor Epithelschäden an den Kontaktstellen („edge damage“) wurden Silikonringe verwendet. Die Querschnittsfläche der untersuchten Epithelstücke betrug bei den zum Einsatz gekommenen Kammern 3,14 cm². Oberhalb der zwei nun durch das Gewebe geteilten Kammerhälften befand sich jeweils eine doppelwandige Glassäule. In jede dieser Glassäulen wurden 16 ml der jeweiligen Pufferlösung gefüllt und durch das innerhalb der Glaswände befindliche und zirkulierende Wasser auf 37°C erwärmt. Die Begasung mit Sauerstoff führte zu einer andauernden Zirkulation der Versuchslösungen innerhalb der Kammern. Tygonschläuche verbanden die jeweilige Kammerhälfte mit der entsprechenden Glassäule.

Zur Messung der elektrophysiologischen Parameter, etwa des transepithelialen Stroms (I_{sc}), der Gewebeleitfähigkeit (G_t) und der transepithelialen Potentialdifferenz (PD_t), waren zwei gewebe-nahe und zwei gewebe-ferne Elektroden vorhanden. Diese mit Kaliumchloridlösung (3 mol·l⁻¹) getränkten Agarbrücken fungierten als Verbindung zu den Ag/AgCl- Elektroden. Eine computergesteuerte Voltage-Clamp-Anlage (Einrichtung für Windows, Version 2.02 Mußler, Aachen) ermöglichte das Anlegen eines Stroms, ferner die Potentialmessung und Datenerfassung.

3.2.1 Messprinzip

In der Ussing-Kammer kann unter folgenden Bedingungen gearbeitet werden:

a) Open-circuit

Die Potentialdifferenz (PD_t) wird nicht beeinflusst und direkt gemessen. In regelmäßigen Abständen werden von der gewebe-fernen Elektrode Strompulse (ΔI ; Stärke: 100 μA ;

Dauer: 200 ms) über das Epithel geschickt. Die daraus resultierende kurzzeitige Veränderung der Potentialdifferenz (ΔPD_t) dient der Berechnung des Widerstands (R_t) bzw. der Leitfähigkeit (G_t) sowie des Kurzschlussstroms (I_{sc}).

$$R_t = \frac{\Delta PD_t}{\Delta I_{sc}}$$
$$G_t = \frac{I_{sc}}{R_t}$$

b) Short circuit

Die über dem Gewebe anliegende Potentialdifferenz (PD_t) wird durch eine Stromquelle auf 0 mV geklemmt. Unter dieser Voraussetzung existiert kein elektrischer Gradient zwischen mukosaler und serosaler Seite des Gewebes. Besteht ebenso wenig ein chemischer Gradient, so sind alle gemessenen (Netto)-Iontentransporte als aktive Transporte zu sehen.

c) Voltage Clamp

Unter diesen Bedingungen wird die transepitheliale Potentialdifferenz (PD_t) durch eine Stromquelle auf ein bestimmtes Potential (z. B. -40 mV) geklemmt.

3.2.2 Versuchsablauf der Ussing-Kammer-Versuche

Zu Beginn des Messtages wurden zunächst die Elektrodeneigenpotentiale und Flüssigkeitswiderstände der verwendeten Pufferlösungen gemessen und für die spätere automatische Korrektur abgespeichert. Die Äquilibrierungszeit unter „open-circuit“-Bedingungen betrug nach dem Einbau der Pansenepithelien ca. 20 Minuten. Anschließend wurden die Epithelien kurzgeschlossen ($PD_t = 0$ mV). Die Dauer der Messungen lag bei insgesamt 150 Minuten. Sowohl zu Beginn als auch zum Ende der Messungen wurden die pH-Werte der serosalen Pufferlösungen gemessen und zur späteren Berechnung der Ammoniumtransportrate herangezogen. Nach Beendigung des Versuchs wurde der serosale Puffer aus jeder Kammer in ein je 50 ml fassendes Zentrifugenröhrchen gefüllt und es wurde 1 ml einer $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCl-Lösung dazugegeben. Aufgrund der Zugabe der HCl und der damit verbundenen Verschiebung des pH-Wertes in den sauren Bereich lag Ammoniak praktisch nur in Form von NH_4^+ vor, wodurch ein Entweichen des gasförmigen NH_3 verhindert wurde. Die

Proben waren somit „konserviert“ und wurden bis zur Messung mittels Ammoniak elektrode bei 4°C oder -20°C gekühlt gelagert.

3.2.3 Verwendete Pufferlösungen

Auf der mukosalen Seite wurde ein mit 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) auf pH 6,4 gepufferter NaCl-Puffer verwendet, dem je nach Versuchsgruppe NH₄Cl oder NMDGCl zugesetzt wurde. Hierdurch entstanden drei Gruppen:

- a) Mukosaler Puffer ohne Ammoniumchlorid (0 mmol·l⁻¹; Kontrollgruppe)
- b) Mukosaler Puffer mit 10 mmol·l⁻¹ Ammoniumchlorid (10 mmol·l⁻¹)
- c) Mukosaler Puffer mit 40 mmol·l⁻¹ Ammoniumchlorid (40 mmol·l⁻¹)

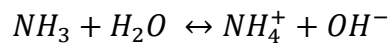
Serosal wurde in allen Gruppen der gleiche Puffer eingesetzt, der im Prinzip dem mukosalen Puffer ohne NH₄Cl (Kontrollgruppe) entsprach. In Bezug auf die geplanten Bestimmungen der pH-Werte und der Ammoniak-Flux-Messungen wurde allerdings auf alle Substanzen verzichtet, die eine pH-Wert puffernde Wirkung aufweisen. Die pH-Wert wurde mittels HCl oder TRIS auf 7,4 eingestellt und unmittelbar vor dem jeweiligen Versuchsbeginn überprüft. Die Osmolarität der Lösungen wurde mittels Gefrierpunktmessung unter Verwendung eines Osmometers (Firma Roebling Messtechnik) bestimmt und, falls nötig, mit Mannitol auf 300 ± 5 mosmol·l⁻¹ eingestellt. Die exakte Zusammensetzung der einzelnen Pufferlösungen befindet sich im Anhang (siehe Tab. 22).

3.3 Bestimmung des NH₃- und NH₄⁺-Fluxes über das Pansenepithel mittels Ammoniak elektrode

In bisherigen Studien wurde primär die apikale Aufnahme von Ammoniak untersucht. In diesem Versuch sollte untersucht werden, in welcher Form der Nettotransport von Ammoniak erfolgt. Dazu wurde der Flux von NH₃ und NH₄⁺ über das Pansenepithel mittels Ammoniak elektrode ermittelt, die Veränderung des pH-Wertes des (ungepufferten) serosalen Puffers wurde parallel verfolgt.

3.3.1 Aufbau und Messprinzip

Die in den Versuchen genutzte Ammoniakelktrode (Fa. Thermo Fisher Scientific) setzt sich aus einer pH-Elektrode und einer Referenzelektrode zusammen, die beide in einem gemeinsamen Außenelektrolyten liegen (siehe Abbildung 1). Eine gas-permeable Membran trennt diesen Außenelektrolyten von der zu messenden Probe. Die sehr dünne Außenelektrolytschicht, die sich zwischen der konvexen Glasmembran der pH-Elektrode und der gas-permeablen Membran befindet, ermöglicht die Messung von sehr geringen NH_3 -Konzentrationen. Die Änderung durch Eintritt von NH_3 -Gas über die gas-permeable Membran wird durch folgende Gleichung erfasst:



Über die Membran in die Elektrode diffundiertes NH_3 wirkt als Base und bedingt einen Anstieg des pH-Wertes im Außenelektrolyten. Dieser pH-Anstieg führt an der für H^+ -Ionen durchlässigen Glasmembran der pH-Elektrode wiederum zu einer Potentialdifferenz.

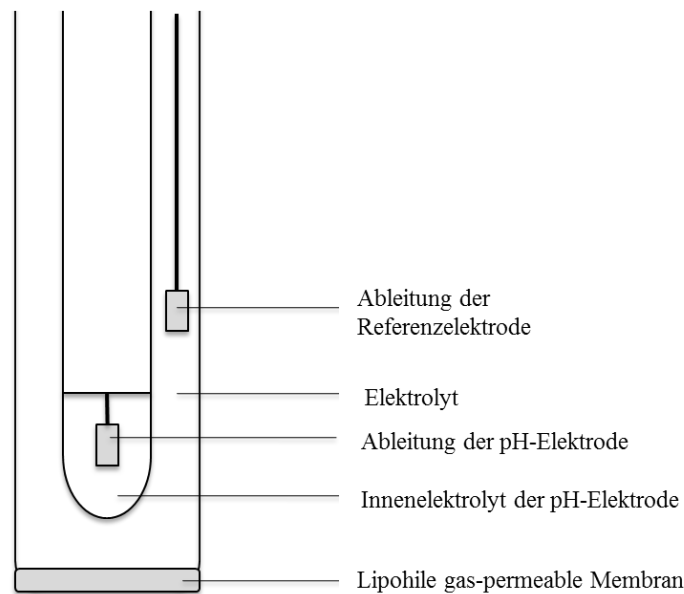


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der verwendeten Ammoniakelktrode (Fa. Thermo Fisher Scientific).

3.3.2 Bestimmung der Elektrodensteilheit

Die Ammoniak elektrode wurde über ein „PowerLab“ (ADInstruments) an einen Computer angeschlossen. Die Datenerfassung erfolgte über das Programm „Chart5 für Windows“ (ADInstruments). Vor dem Beginn der Messungen musste die Elektrodensteilheit überprüft werden. Durch die Verdünnung einer $0,1 (10^{-1}) \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NH_4Cl -Lösung (Thermo) wurde eine Standardreihe hergestellt. Die Elektrode wurde in 100 ml serosalen Puffer eingetaucht, wobei darauf zu achten war, dass sich keine Luftblasen unter der Membran der Ammoniak elektrode befanden. Ein Magnet rührer stellte eine gleichmäßige Durchmischung sicher. Nun wurden 1 ml Alkaline-Reagent (Fa. Thermo Fisher Scientific) und 1 ml $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NH_4Cl Standard zum serosalen Puffer hinzugegeben. Sobald sich die Messwerte stabilisiert hatten, wurden erneut 10 ml desselben ($10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NH_4Cl) Standards zugefügt und es wurde wieder bis zu einer Stabilisierung des Messwerts abgewartet. Die Differenz dieser beiden Werte ergab die Elektrodensteilheit, die im Bereich von 54 bis 60 mV liegen sollte.

3.3.3 Messung der Proben mittels Additionsmethode

10 ml der zu messenden Probe wurden in ein Glasgefäß gefüllt. Dieses Glasgefäß wurde speziell für die Messung dieser Proben in der Art hergestellt, dass der Totraum minimal und das Gefäß zum Zeitpunkt der Messung ungeachtet der sich darin befindlichen Elektrode fest verschlossen war (siehe Abbildung 2). Ein an der Seite angebrachter Schlauch ermöglichte die Zugabe von NaOH, ohne ein Entweichen des NH_3 -Gases zu ermöglichen. Zum gleichmäßigen Umwälzen wurde in das Probengefäß ein Magnet rührer gegeben und die Ammoniak elektrode hineingebracht.

Angesichts des Umstandes, dass die Probe zuvor zur Konservierung des darin befindlichen NH_3 mit HCl versetzt wurde, wurde dafür gesorgt, dass alle enthaltenen Ammonium-Ionen deprotoniert wurden. Zu diesem Zweck wurde direkt vor der Messung 1 ml einer $10 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaOH über den Schlauch in das Probengefäß gegeben. Nach der Stabilisierung des Messwerts wurde 1 ml Standard NH_4Cl zugegeben und wiederum bis zur Stabilisierung des Messwertes gewartet. Zwischen den einzelnen Messungen wurde die Elektrode gründlich mit destilliertem Wasser gespült. Die Messwerte wurden anhand der zuvor gemessenen Standardlösungen ($1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ und $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NH_4Cl) in $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NH_3 umgerechnet.



Abbildung 2: Die Abbildung zeigt das für die Messung der Ammoniak-Fluxe in dieser Arbeit entwickelte Messgefäß. An der Oberseite befindet sich die mit einem Abdichtring versehene Öffnung, durch welche die Ammoniak-Elektrode in die Probe eingetaucht wird. Zur Reduzierung des Totraums wurde der untere Teil des Gefäßes mit Plastik befüllt. Ein fest eingebauter Schlauch erlaubt die Zugabe von NaOH, ohne hierzu das Gefäß öffnen zu müssen, womit ein Entweichen des NH_3 -Gases verhindert wird. Der verwendete Magnetrührer gewährleistet eine kontinuierliche Umwälzung der Probe.

Im nächsten Schritt wurden die zuvor ermittelten pH-Werte einbezogen und der NH_4^+ -Gehalt mittels Henderson-Hasselbalch-Gleichung ermittelt. Unter Berücksichtigung gemessener Standardlösungen ($10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ - $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ NH_4Cl) konnten die erhobenen Messwerte in $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NH_3 umgerechnet werden.

Das Elektrodenpotential (E_p) ergibt sich rechnerisch wie folgt:

$$E_p = a \cdot \ln[\text{NH}_3] + b$$

E_{p1} = Elektrodenpotential bei $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NH_3

E_{p2} = Elektrodenpotential bei $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NH_3

b = E_p bei $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NH_3

a = $(E_{p2} - E_{p1}) / \ln(10)$

y = NH_3 [$\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$] bei E_{p2}

Dank der Anwendung der Additionsmethode konnten selbst sehr geringe Konzentrationen in den Proben gemessen werden. Für die Berechnung der Konzentration an NH_3 [$\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$] in der Probe galt die folgende Gleichung:

$$C_{\text{probe}} [\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}] = Q \cdot C_{\text{Standard}}$$

C_{Standard} = Konzentration der verwendeten Standard- NH_4Cl -Lösung [$\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$]

Wobei für Q galt:

$$Q = \frac{(p \cdot r)}{[(1 + p) \cdot 10^{\Delta E/S} - 1]}$$

$$\Delta E = E_2 - E_1$$

E1 = Elektrodenpotential nach Zugabe von NaOH

E2 = Elektrodenpotential nach Zugabe der Standard-NH₄Cl-Lösung

$$p = V_{\text{Standard}} / (V_{\text{ISA}} + V_{\text{Probe}})$$

$$r = (V_{\text{ISA}} + V_{\text{Probe}}) / V_{\text{Probe}}$$

V_{Standard} = Volumen des gemessenen Standards [ml]

V_{ISA} = Volumen an zugegebener NaOH [ml]

V_{Probe} = Volumen der Probe [ml]

s = Elektrodensteilheit

Das Probenvolumen musste weiterhin um die Menge der zugegebenen HCl korrigiert werden:

$$f = 1 - \left(\frac{V_{\text{HCl}}}{V_{\text{Probe}}} \right)$$

$$C_{\text{ProbeEND}} = \frac{C_{\text{Probe}}}{f}$$

f = Verdünnungsfaktor durch zugegebene Menge an HCl

V_{HCl} = Volumen zugegebener HCl [ml]

C_{ProbeEND} = NH₃-Konzentration in der Probe nach Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors bei einem pH-Wert von 13 [mmol·l⁻¹]

Zur Berechnung des Anteils an NH₄⁺ unter Rückgriff auf die Gleichung von Henderson und Hasselbalch wurden erneut die pH-Werte der Proben herangezogen. Somit ergab sich wie folgt:

$$NH_4^+ [\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}] = \frac{C_{\text{ProbeEND}}}{(10^{(\text{pH} - \text{pK}_s)} + 1)}$$

$$NH_3 [\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}] = C_{\text{ProbeEND}} - NH_4^+$$

b = Ep bei 1 mmol·l⁻¹NH₃

a = Ep 2 - Ep 1 / ln (y)

y = NH₃ [mmol·l⁻¹] bei Ep2

pK_s (NH₃) = 9,21

pH = pH der Probe

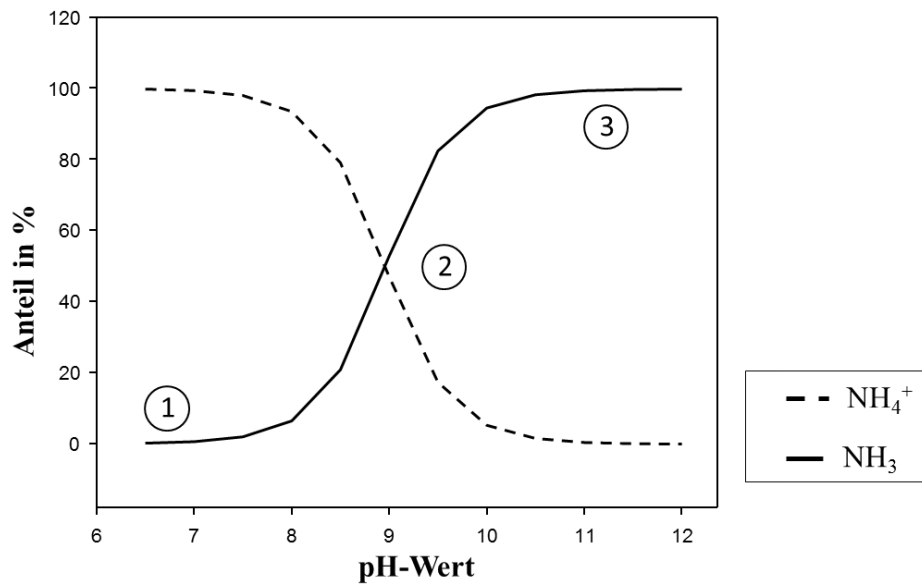


Abbildung 3: Graphische Darstellung der pH-Abhängigkeit des Gleichgewichts zwischen NH_3 und NH_4^+

- 1) Es ist nur NH_4^+ vorhanden
- 2) Das Verhältnis zwischen NH_4^+ und NH_3 beträgt 1:1
- 3) Es ist nur NH_3 vorhanden

Aus den in der Probe gemessenen Konzentrationen [$\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$] von NH_3 bzw NH_4^+ wurde nun der Flux über das Pansenepithel berechnet:

$$\text{Flux} [\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}] = \frac{C \cdot V_{\text{Kammer}}}{(F \cdot T) \cdot 1000}$$

C = gemessene Konzentration in der Probe [$\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$]

V_{Kammer} = Ussing-Kammer-Volumen [ml]

F = Querschnittsfläche des Epithels [cm^2]

T = Dauer des Versuches [h]

3.3.4 Statistische Auswertung

Die Versuchsergebnisse werden als arithmetisches Mittel der Einzelwerte angegeben (MW; *mean*) \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM; *standard error of the mean*). Die Anzahl der Tiere wurde mit N, jene der Epithelien mit n angegeben. Sowohl die Auswertung als auch die Prüfung auf Signifikanz wurden mittels SigmaPlot 11.0 durchgeführt. Zur Prüfung der Ergebnisse wurde der ANOVA on Ranks Test (Dunns Methode) mit einem Signifikanzniveau von $p = 0,05$ verwendet.

3.4 Patch-Clamp-Methode

3.4.1 Isolierung und Kultivierung von primären Pansenzellen des Rindes

Zur Kultivierung einer primären Pansenepithelzellkultur des Rindes wurde eine modifizierte Form der Methode nach Galfi et al. (1981) verwendet (Galfi et al., 1981). Das aus dem ventralen Pansensack entnommene Pansenstück wurde im Anschluss an die Entnahme ausreichend mit Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freier Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) gewaschen, der 4 % Penicillin-Streptomycin zugesetzt wurden. Der Transport ins Labor fand ebenfalls in diesem Puffer bei einer Temperatur von 4°C statt.

Im Labor wurde das Gewebe in frische Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freie DPBS-Lösung gegeben. Mit einer Metzenbaumschere wurden vorsichtig 100 bis 150 Pansenzotten des Pansenepithels präpariert. Die losen Zotten wurden nach erneutem Waschen mit DPBS unter ständigem Rühren in eine auf 37°C erwärmte 0,25 %-ige Trypsinlösung gegeben. Jede halbe Stunde wurde der Überstand mit den darin enthaltenen abgelösten Epithelzellen durch Gaze filtriert, wodurch die Zellen von Pflanzenbestandteilen und Zellresten befreit wurden, und durch frisches Trypsin ersetzt. Hierbei wurde jeweils ein Tropfen unter dem Mikroskop auf vorhandene Basalzellen hin untersucht. Falls Basalzellen festzustellen waren, wurde der Überstand 5 Minuten bei 4°C und 200 x g zentrifugiert und das Zellpellet in DPBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, bevor das Zellpellet in 4 ml Medium 1 (siehe Anhang Tab. 18) gelöst wurde. Das Aussähen erfolgte in kollagenisierten Zellkulturschalen (\varnothing 53 mm, Biochrom). Die Zellen wurden 24 Stunden lang im Medium 1 bei 37°C; 5 % CO_2 und Wasserdampfsättigung inkubiert. Im Anschluss daran wurden die

Zellen zweimal mit DPBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen, anschließend wurde die Zellkulturschale mit Medium 2 (siehe Anhang Tab. 18) aufgefüllt. In den darauffolgenden Tagen wurde das Medium an jedem zweiten Tag gewechselt.

3.4.2 Trypsinierung der isolierten Pansenepithelzellen

Sobald ca. 80 % der Zellkulturschale von Zellen bedeckt waren, wurden sie passagiert. Zu diesem Zweck wurden die Zellen zunächst zweimal mit DPBS gewaschen und in der Folge davon mit ca. 1 ml 0,25 %-iger Trypsin-EDTA-Lösung überschichtet. Zur Inkubation wurden die Zellen für ca. 10 bis 15 Minuten in den Brutschrank gestellt. Zu dem Zeitpunkt, an dem sich der Großteil der Zellen abgelöst hatte, konnte die Trypsinreaktion durch die Zugabe von Medium 2 (enthält Ca^{2+} und 10 % fetales Kälberserum) abgestoppt werden.

3.4.3 Aussähen der Zellen

Nach einer Woche Inkubationszeit im Brutschrank in Medium 2 konnten die Zellen für Patch-Clamp-Experimente auf Glascoverslips ausgesät werden. Die Deckgläschen (\varnothing 13 mm) wurden zuvor drei Stunden lang bei 180°C sterilisiert. Jeweils vier Deckgläschen wurden in eine Zellkulturschale (\varnothing 34 mm) gelegt und die trypsinierten Zellen (siehe Abschnitt: Trypsinierung) sowie ca. 1 ml Medium 2 dazugegeben. Nach einer Inkubationszeit von ca. 60 Minuten konnte mit den ersten Experimenten begonnen werden. Das standardmäßig am Institut verwendete Protokoll zur Isolation von primären Pansenepithelzellen ist im Detail im Anhang zur vorliegenden Dissertation beschrieben.

3.4.4 Prinzip der Patch-Clamp-Methode

Die verwendete Patch-Clamp-Technik ist eine etablierte Messmethode zur Bestimmung von Membranpotentialen und Ionenströmen an isolierten Zellen. Begründet wurde die Methode von Erwin Neher und Bert Sakmann, die für diese revolutionäre Technik 1991 den Nobelpreis für Medizin und Physiologie erhielten (Neher und Sakmann 1976). Durch diese Methode wurde es erstmals möglich die Funktion von Ionenkanälen direkt zu untersuchen.

Eine mit Elektrolytlösung gefüllte Pipette, in deren Inneren sich eine Messelektrode befindet (siehe Abbildung 4), wird auf die Zellmembran einer isolierten Zelle gedrückt. Der Bereich ($\varnothing 1\ \mu\text{m}$), der unterhalb der Pipette liegt, wird als „Patch“ (dt.: „Flicken“) bezeichnet.

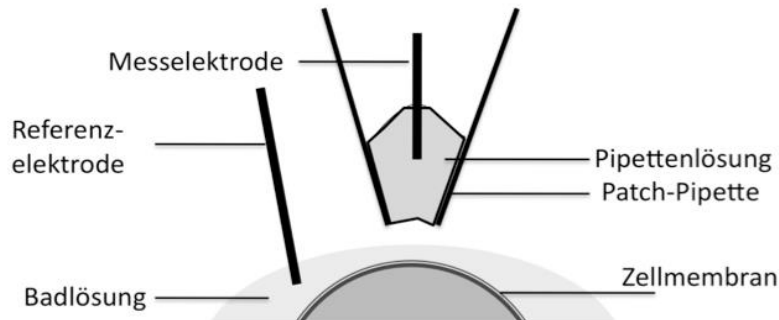


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Patch-Clamp-Methode

Als in der Pipette befindliche Messelektrode fungiert ein chlorierter Silberdraht. Er wird gemeinsam mit einer in der Perfusionslösung der Kammer liegenden Referenzelektrode an einen Patch-Clamp-Verstärker angeschlossen. Der Vorteil der Patch-Clamp-Methode gegenüber anderen Voltage-Clamp-Verfahren besteht in einer höheren Auflösung der im Pico-Ampere-Bereich liegenden Ströme. Als Folge der sehr engen Anheftung der Membran an die Pipette (Zwischenraum $< 1\text{nm}$) ergibt sich ein Anstieg des Abdichtungswiderstands in den Gigaohm-Bereich, was als „Gigaseal“ (dt.: „Versiegelung“) bezeichnet wird. Die damit verbundene Abnahme des Hintergrundrauschens ermöglicht es, selbst Einzelkanalströme in hoher Auflösung zu messen.

3.4.4.1 Patch-Clamp-Konfigurationen

In Abhängigkeit davon, ob nach dem Aufsetzen der Patch-Pipette der darunterliegende Membranteil aus der Zelle herausgelöst wird oder die Zelle intakt bleibt, sind verschiedene Patch-Clamp-Konfigurationen zu differenzieren. Wird durch das Aufsetzen der Pipette auf der Zellmembran ein Gigaseal erzielt, spricht man von „**Cell-Attached-Konfiguration**“ (siehe Abbildung 5).

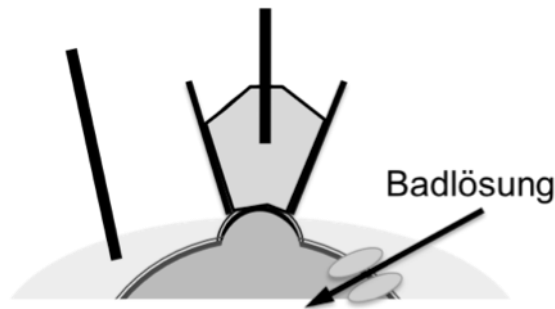


Abbildung 5: Darstellung der Cell-Attached-Konfiguration

Die Pipette wird auf die Zellmembran aufgesetzt, wobei keine Verbindung zum Intrazellulärraum der Zelle besteht. Wird nunmehr durch weiteren Unterdruck in der Pipette eine Ruptur der Membran unter Beibehaltung der Verbindung zwischen Zelle und Pipette herbeigeführt, spricht man von einer „**Whole-Cell-Konfiguration**“ (siehe Abbildung 6).

Die Pipettenlösung steht nun in einem direkten Kontakt zum Zytoplasma der Zelle und fließt in das Zellinnere. Hierdurch besteht die Möglichkeit, Zellen mit exakt definierten Lösungen zu füllen. Die Ableitung findet über die gesamte Zellmembran statt, da der Gigaseal intakt bleibt und das Innere der Zelle sowie die Pipette gegenüber der äußeren Badlösung isoliert.

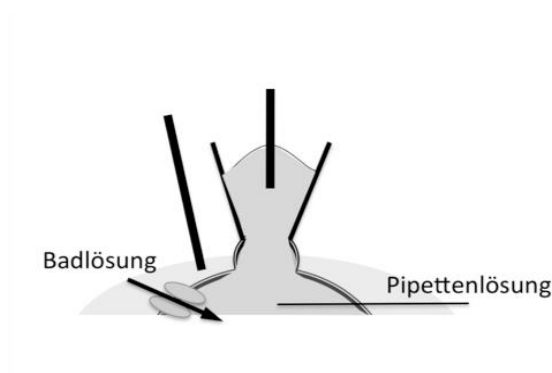


Abbildung 6: Darstellung der Whole-Cell-Konfiguration

Weiterhin kann nach Erlangung der Cell-Attached-Konfiguration durch Anheben der Pipette ein Membranfleck aus der Zelle herausgelöst werden. Ausgehend davon gelingen Messungen in der sogenannten „**Single-Channel-Konfiguration**“, die allerdings im Rahmen der Versuche für diese Arbeit nicht zum Einsatz kam und demzufolge nicht weiter erläutert werden soll.

3.4.4.2 Aufbau der Messeinheit

Die mittels Patch-Clamp-Technik gemessenen sehr kleinen, im pA-Bereich liegenden, elektrischen Ströme müssen aufgrund ihrer Anfälligkeit für Störströmungen ausreichend abgeschirmt sein. Folglich befand sich die Messkammer innerhalb eines Faraday'schen Käfigs, in dem zusätzlich sämtliche leitenden Teile geerdet wurden. Zum Ausschluss von Störungen mechanischer Art wurde die Messkammer auf einem druckluftgefederten Tisch positioniert. Alle zusätzlichen Geräte wie Perfusionspumpen, die Steuereinheit des Mikromanipulators (Eppendorf PatchMan, Brinkmann Instruments, Inc., New York, USA), Messverstärker mit integriertem Analog-Digital-Wandler (EPC9, HEKA Elektronik Lamprecht) und Computer waren auf einem von der Messkammer getrennten Tisch platziert.

Die ca. 5 mm dicke, aus Plexiglas gefertigte Kammer hatte einen Durchmesser von 0,5 cm. In der Mitte dieser Scheibe befand sich eine Vertiefung und der Boden war durchbrochen. Die auf der Oberseite mit Zellen bedeckten Deckgläschen wurden mit Silikonpaste von unten an der Kammer befestigt. Zur optischen Kontrolle befand sich oberhalb der Messkammer ein inverses Mikroskop. Der oberhalb der Kammer zusätzlich geschaffene Raum wurde für den Zu- und Ablauf der Badperfusion, die Patch-Pipette und die Beleuchtung benötigt. Um eine konstante Perfusion von $2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ in der Messkammer zu ermöglichen, mündeten Zu- und Ablauf der Perfusionsanlage gegenüber voneinander in die Kammer. Die Perfusionslösungen befanden sich während der Versuche in 50 ml Einmalspritzen (HEILAND Vet, Hamburg), die als Aufbewahrungsbehälter dienten. Ausgehend von den Aufbewahrungsbehältnissen wurden die Lösungen durch Polyamidschläuche (Tygon Standardschläuche, ISMATEC, Wertheim-Mondfeld) über zwei Schlauchpumpen (ISMATEC, Wertheim-Mondfeld) in einen Manifold (8-channel Milimanifold, ALA Scientific Instruments, Westbury, NY, USA) gepumpt, der schließlich in die Messkammer mündete. Ein Lösungswechsel zwischen den bis zu acht verschiedenen Versuchslösungen konnte durch eingebaute Dreiwegehähne realisiert werden.

3.4.4.3 Elektrophysiologische Messung mit Patch-Pipetten

Die Herstellung der im Versuch verwendeten Patch-Pipetten erfolgte aus Borosilikatglaskapillaren (GC150T7,5) (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). Mit einem

DMZ-Universal-Puller (Zeitz-Instruments, München, Germany) wurden die Pipetten vor jeder Messung frisch gezogen, was in drei Erhitzungs- und Zugintervallen geschah. Im Anschluss daran wurden sie durch ein viertes Erhitzungsintervall poliert. Dieses Pullprogramm führte zu einer stumpf zulaufenden Spitze der Pipetten, was das unbeabsichtigte Durchstehen der Zellmembran der Zellen verhinderte. Der optimale Pipettenwiderstand betrug ca. 4 M Ω .

Die Patch-Pipette wurde je nach Versuchsreihe mit Natriumglukonatlösung (Na-Glukonat) oder Kaliumglukonatlösung (K-Glukonat) befüllt. Nach Entfernung eventueller Luftblasen in der Pipette wurde sie an dem Pipettenhalter des Vorverstärkers befestigt, der über den Mikromanipulator steuerbar war. Eine Einmalspritze, die über einen Silikonschlauch luftdicht mit der Pipette verbunden war, ermöglichte die Erzeugung eines Unterdrucks in der Pipette. Die Verbindung zwischen metallischen Leitern und Elektrolytlösungen erfolgte über mit 500 mmol·l⁻¹ KCl chlorierte Silberdrähte (\varnothing 0,4 mm). Die Badelektrode stand mit der Perfusionslösung in der Kammer über eine Agarbrücke in Verbindung.

3.4.4.4 Verwendete Pufferlösungen

Alle verwendeten Pufferlösungen wurden mit Chemikalien der Firma Merck und der Firma Carl Roth nach der entsprechenden Rezeptur (siehe Anhang Tab. 23, 24) hergestellt. Die Lösungen zum Befüllen der Patch-Pipetten werden als „Intra-Lösung“ bezeichnet. Der pH-Wert wurde mit TRIS bzw. HCl auf 7,2 eingestellt. Sämtliche Lösungen zur Perfusion der Messkammer wurden auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Die Osmolarität aller Patch-Lösungen wurde mittels Gefrierpunktmessung mit einem Osmometer (Firma Roebling Messtechnik) bestimmt und, falls nötig, mit Mannitol auf 300 ± 2 mosmol·l⁻¹ eingestellt.

3.4.4.5 Versuchsablauf der Patch-Experimente

An jedem der Versuchstage wurden die Zellen frisch auf Deckgläschen ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von ca. 60 Minuten im Brutschrank (37°C; 5 % CO₂) wurde ein Deckgläschen herausgenommen und mit Silikon von unten an die Messkammer geklebt. Nach dem Einbau der Kammer wurde die Perfusion mit Standardpufferlösung gestartet. Eine neue Pipette wurde gezogen und mit Pipettenlösung befüllt. Im Anschluss an das Einspannen der Pipette in den Pipettenhalter wurde sie in die Badlösung eingetaucht. Mit der Software TIDA erfolgte die

Korrektur der sogenannten „Offset-Spannung“ auf Null. Somit lag die eingestellte Sollspannung während der Messung auch wirklich an. Zur Bestimmung des Pipettenwiderstandes wurde eine definierte Spannung in Form eines 10 mV-Rechteckimpulses appliziert. Aufbauend auf dem Ohm'schen Gesetz ($R = U / I$) wurde der Widerstand automatisch berechnet. Bei einem Pipettenwiderstand von 3 bis 4 M Ω wurde unter dem Mikroskop eine geeignete Zelle ausgewählt und die Pipette mittels Mikromanipulator an die Zelloberfläche geführt. Der Kontakt zur Zelloberfläche zeigte sich in einem signifikanten Anstieg des Widerstands auf über 10 M Ω .

Infolge der Erzeugung eines feinen Unterdrucks in der Pipette wurde eine feste Verbindung zwischen Zelle und Pipette hergestellt. Dies bedingte einen Anstieg des Widerstands in den Gigaohm-Bereich sowie einen deutlichen Abfall der auf den Sollspannungsimpuls basierenden Stromantwort. Die angezeigten Ströme manifestierten sich annähernd als durchgehend flache Linie mit zwei kapazitiven Artefakten jeweils am Anfang und Ende des Spannungspulses. Diese Artefakte entstehen durch Umladungsprozesse an der Zelle und der Pipette und wurden durch die Software TIDA kompensiert. Durch ruckartiges Anlegen eines Unterdruckes wurde die Membran durchbrochen und es wurde ein elektrischer Zugang durch die Pipettenöffnung geschaffen (Whole-Cell-Konfiguration)(Georgi 2011).

Da der Stromfluss bei der Ganzzelleableitung über die gesamte Membran erfasst wird, ergibt sich eine Veränderung der Stromantwort. Der Widerstand unter der Pipette verringerte sich wohingegen sich die Stromantwort vergrößerte. Nach einer durch die Software durchgeführte Kompensation der Kapazität wurde mit den Messungen durch Anlegung der verschiedenen Pulsprotokolle begonnen.

3.4.4.6 Vorzeichenkonvention

Die Potentialdifferenz über der Zellmembran entspricht der an der Pipette anliegenden Spannung. Die Stromrichtung wird definitionsgemäß auf Kationen bezogen. Unter einem „Einwärtsstrom“ versteht man den Einstrom von Kationen durch die Zellmembran in die Pipette, wobei das Vorzeichen negativ ist. Positive Ströme entsprechen dem Ausstrom von Kationen aus der Pipette durch die Membran bzw. den Kanal in die Badlösung. Dies wird mit dem Begriff „Auswärtsstrom“ bezeichnet (mit positivem Vorzeichen). Allerdings bewirkt

auch der Einstrom von Anionen durch die Membran einen solchen positiven Strom. Zur genauen Differenzierung sind deshalb weitere Messschritte (Blocker, Ionensubstitutionsexperimente) erforderlich.

3.4.4.7 Analyse und Auswertung der Patch-Clamp-Daten

Zur Auswertung wurden Daten aus 15 Einzelexperimenten (n) einbezogen. Die quantitativen Angaben lagen als Mittelwerte (MW, mean) mit Standardfehler (\pm SEM, standard error of the mean) vor.

3.4.4.8 Auswertung von Stromstärken durch die Normierung der Ströme auf die Zellkapazität

Zur statistischen Analyse der Membranströme wurden jeweils Stromwerte bei einem Pipettenpotential in Höhe von -120 mV (Einwärtsstrom) und +100 mV (Auswärtsstrom) herangezogen. Die gemessenen Stromwerte der einzelnen Zellen variieren aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe stark. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die gemessenen Stromwerte auf die Kapazität normiert, wobei die mit dem Computerprogramm TIDA ermittelten Kapazitäten der Zellen herangezogen wurden. Die Stromdichte (pA/pF) wurde anschließend mit SigmaPlot 11.0 berechnet. Auf diese Weise besteht die Möglichkeit, Ergebnisse aus Messungen mit unterschiedlichen Pipettenlösungen zueinander in Relation zu setzen.

3.4.4.9 Strom-Spannungs-Kurve und Umkehrpotential

Misst man den Membranstrom bei verschiedenen Haltepotentialen und trägt beide gegeneinander auf, erhält man eine Strom-Spannungs-Kurve. Der Schnittpunkt dieser Kurve mit der Spannungsachse liefert das Umkehrpotential der Zelle, das jener Spannung entspricht, bei welcher kein Strom mehr fließt.

Das Umkehrpotential entspricht dem Membranpotential der Zelle unter den gewählten Versuchsbedingungen. Es gilt die Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung. Somit lassen sich bei bekannten Ionenkonzentrationen (Pipetten- und Badlösung) Rückschlüsse auf die Leitfähigkeit der Membran für die verschiedenen Ionen ziehen. Leitet ein Kanal in einem

Potentialbereich besser als in einem anderen, wird er als „gleichrichtender Kanal“ (engl.: rectifier) bezeichnet (für eine Zusammenfassung sh. Brinkmann 2007). Führt die Depolarisation zu einer Zunahme der Leitfähigkeit für positive Ionen, wird dies als „auswärtsrektifizierend“ bezeichnet. Demgegenüber bedeutet der Ausdruck „einwärtsrektifizierend“, dass es durch eine Hyperpolarisation zu einer Steigerung der Leitfähigkeit kommt. Aufgrund der Hyperpolarisation strömen positive Ionen in die Zelle und führen automatisch zu einer Repolarisation, wobei sich beim inward rectifier die Leitfähigkeit für positive Ionen verringert.

In beiden Fällen können Ionen in die eine wie auch die andere Richtungen durch den jeweiligen Kanal strömen, wobei die Richtung letztlich vom jeweils angelegten Potential abhängt. Eine gekrümmte Strom-Spannungs-Kennlinie kann auf die Tatsache hinweisen, dass der Kanal einen Spannungssensor hat (voltage dependent potassium channels, Kv) oder zytosolische Ionen spannungsabhängig blockieren (inward rectifying K⁺ channel, Kir). Gemäß der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung ergibt sich aufgrund einer Ungleichverteilung der Ionen bei spannungsunabhängiger Leitfähigkeit eine gekrümmte Kennlinie (Brinkmann 2007).

Auch zur Differenzierung der Ionenströme von Leckströmen werden die Strom-Spannungs-Kurve und das Umkehrpotential herangezogen. Kommt es durch Leckströme zum Verlust des Seals, wird die Strom-Spannungs-Kurve linear und es kann kein Potential zwischen dem Innen- und Außenraum der Zelle aufgebaut werden. Des Weiteren wird ein Umkehrpotential von 0 mV erwartet (Georgi 2011). Um sicherzustellen, dass keine Leckströme, sondern tatsächlich nur Ströme über die Zellmembran in die Auswertung der beschriebenen Versuchsreihe gelangten, wurden ausschließlich Zellen einbezogen, die eine gekrümmte Strom-Spannungs-Kurve sowie ein negatives Umkehrpotential in Standardpuffer-Lösung aufwiesen.

Treffen Lösungen unterschiedlicher Zusammensetzungen aufeinander, entstehen aufgrund der unterschiedlichen Diffusionsgeschwindigkeiten der verschiedenen Ionenspezies an der Grenze Potentialdifferenzen, die „Liquid Junction Potential“ (LJP) genannt werden. Da diese Potentialdifferenzen teilweise 10 mV übersteigen können, mussten die gemessenen Potentiale zunächst nach der Methode von Barry und Lynch (1991) um diesen Spannungsfehler korrigiert werden (Barry und Lynch 1991).

3.4.4.10 Pulsprotokolle

Zur Charakterisierung des Membranstromes wurden zwei Pulsprotokolle verwendet, die nachstehend näher beschrieben werden.

Pulsprotokoll 1

Ausgehend von einem Haltepotential von -40 mV wurde die Spannung stufenweise in 20 mV-Schritten von +100 mV auf -120 mV herabgesenkt. Jeder Spannungspuls dauerte 20 ms und wurde von einer Rückkehr zum Haltepotential für jeweils 200 ms gefolgt. Dieses Pulsprotokoll wurde im Verlauf der Messung kontinuierlich fortgeführt und mit einer Frequenz von 100 Hz aufgezeichnet. Diese Art der Aufzeichnung hat den Vorteil, dass hierdurch prompte Änderungen der Stromantworten bei Lösungswechseln registriert werden können.

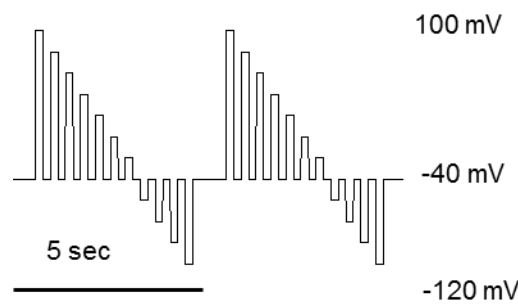


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Pulsprotokolls 1 (kontinuierliches Pulsprotokoll) zur Charakterisierung des Membranstroms

Pulsprotokoll 2

Zusätzlich zu den kontinuierlichen Protokollen wurden Pulsprotokolle mit 10 mV-Abständen erzeugt. Ausgangspunkt war auch hier ein Haltepotential in Höhe von -40mV. Die Aufzeichnung erfolgte mit einer Frequenz von 5 Hz. Für das Erreichen einer besseren Übersicht wurden zu unterschiedlichen Zeiten erhaltene Stromantworten auf Spannungen zwischen -120 mV und 100 mV übereinander dargestellt.

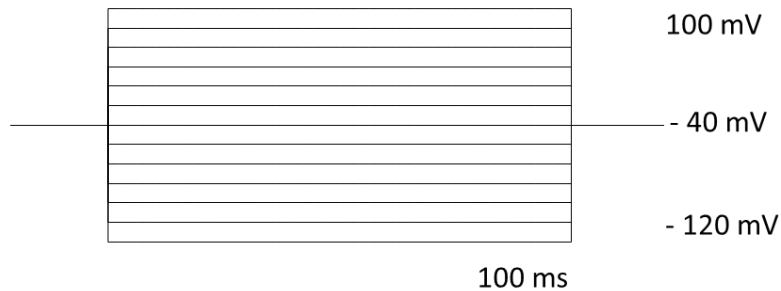


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Pulsprotokolls 2 zur Charakterisierung des Membranstroms

3.4.5 Statistische Auswertung

Die Prüfung hinsichtlich signifikanter Unterschiede wie auch die graphische Darstellung ist mit SigmaPlot 11.0 durchgeführt worden. Bei unabhängigen Stichproben wurde der ungepaarte t-Test nach Student bzw. der Rank Sum Test (Student-Newman-Keuls) verwendet. Im Fall von abhängigen Stichproben erfolgte die Testung auf signifikante Unterschiede unter Verwendung des gepaarten t-Tests nach Student bzw. des Sign Rank Tests. Lag die Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5 % ($p < 0,05$), wurde von einem signifikanten Unterschied ausgegangen.

In den laufenden Messungen wurde im Anschluss nach Abfolge aller Versuchslösungen eine schrittweise Rückführung zurück auf die Standardlösung durchgeführt (bezeichnet als washout (w)). Eine tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse befindet sich im Anhang (siehe Tabelle 26-28).

3.5 Mikroelektrodenteknik

3.5.1 Aufbau der Mikroelektrode

Die verwendete Mikroelektrodenmethode ist eine Kombination aus der von Ussing (1951) begründeten Ussing-Kammer-Methode (Ussing und Zerahn 1951) und der Mikroelektrodenteknik. Das Epithel wurde waagrecht und mit mukosaler Seite nach oben in eine aus Plexiglas gefertigte modifizierte Ussing-Kammer eingespannt (\varnothing 0,9 cm; Fläche: 0,6362 cm²). Erneut wurde zum Schutz vor Schäden an den Rändern des Epithels jeweils zwischen Kammer und Epithel ein Silikonring gelegt. Die Kammer war auf einem kleinen, beweglichen Stativ befestigt und wurde durch vier an den Ecken befindliche Schrauben dicht verschlossen. Die beiden so entstehenden Kammern (mukosal und serosal) wurden durch je ein eigenes Perfusionssystem (4-Kanal-Stativ-Pumpe, Ismatec SA) versorgt. Dieses Perfusionssystem war derart aufgebaut, dass für beide Kammerhälften unabhängige Kreisläufe vorhanden waren.

Insgesamt standen maximal acht verschiedene Lösungen zur Verfügung, die sich während der Aufbewahrung in 60 ml Spritzen (HEILAND Vet, Hamburg) befanden und mit 100 % O₂ begast wurden. Über Dreiwegehähne konnte gezielt gesteuert werden, welche Lösung das eingespannte Epithel in der jeweiligen Kammerhälfte umspülen sollte. Zur Erwärmung der Lösungen auf 37°C liefen die dünnen Perfusionsschläuche durch eine Wärmeaustauscherpumpe, bevor sie über einen Manifold in die jeweilige Kammerhälfte mündeten. Die in beiden Kammern vorhandenen Absaugvorrichtungen (Masterflex R/S, Cole Parmer Instrument Company) garantierten sowohl einen schnellen als auch sicheren Lösungswechsel. Ein über der Messkammer installierter Mikromanipulator (MF 500) eröffnete zudem die Möglichkeit, die Mikroelektrode in feinen μm -Schritten zu bewegen. Zusätzlich befanden sich oberhalb der Apparatur ein Mikroskop und eine Kaltlichtquelle.

Die Messeinheit befand sich zum Schutz vor Störungen auf einem druckluftgefederten Tisch. Die Pumpen und Aufbewahrungsbehältnisse für die Lösungen waren auf einem von der Messeinheit getrennten Tisch montiert.

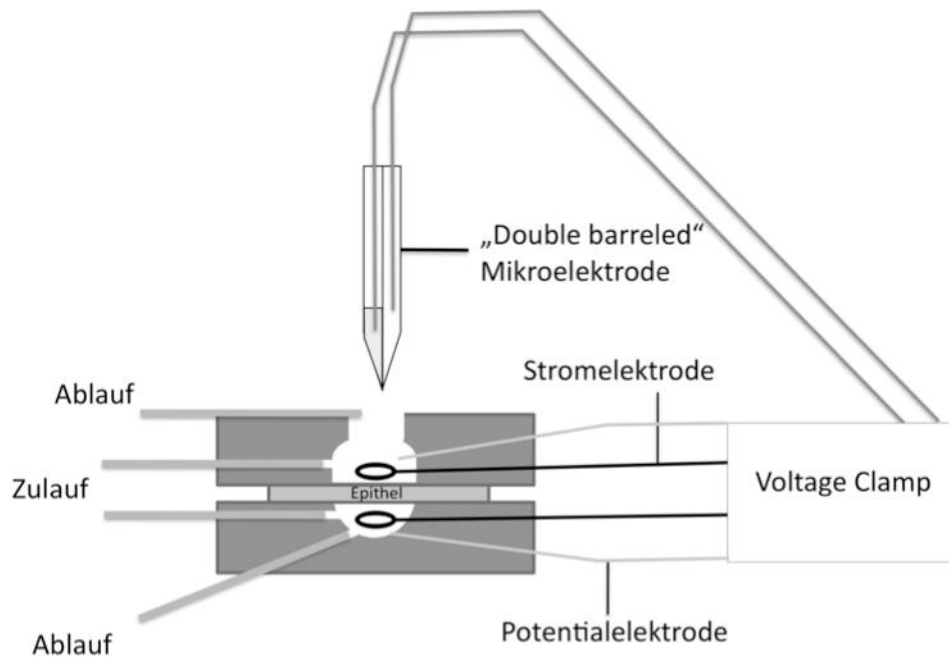


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Mikroelektrodenapparatur

3.5.2 Elektrophysiologisches Messprinzip

Analog zur konventionellen Ussing-Kammer-Methode waren zur Bestimmung der transepithelialen Potentialdifferenz (PD_t) zwei gewebe-nahe Agarbrücken vorhanden, die mit Ag/AgCl-Elektroden verbunden waren. Zur Einspeisung eines transepithelialen Stroms (I) waren ferner zwei gewebe-ferne, ringförmige Ag/AgCl-Elektroden notwendig. Wie bei Strecker (2011) wurde die Messkammer mit einer Voltage-Clamp-Anlage (Ussing-Kammer-Einheit) in Baueinheit mit einem Mikroelektrodenverstärker (beides Fa. Biomedical Instruments, Germering) verbunden (Strecker 2011). Die Datenübermittlung fand über einen „PowerLab“ (ADInstruments) statt. Zur Datenerfassung und kontinuierlichen Aufzeichnung der Messungen kam das Programm „Chart5 für Windows“ (ADInstruments) zum Einsatz.

Im Einzelnen wurden aufgezeichnet:

- Transepitheliale Potentialdifferenz (PD_t) in mV
- Gewebeleitfähigkeit (G_t) in mS (entsprechend des reziproken Werts des Gewebewiderstandes $G_t = 1/R_t$)
- Transepithelialer Strom (I_t) in μA

Die in den Versuchen verwendete Klemmapparatur kann in verschiedenen Betriebsarten benutzt werden:

Unter „open-circuit“-Bedingungen wird die PD_t nicht beeinflusst und es ist eine direkte Messung des elektrogenen Transportprozesses möglich. Unter diesen Bedingungen kann nach Applizierung eines kurzen Strompulses (ΔI), der eine vorübergehende Änderung der PD_t bedingt, sowohl G_t als auch I_t auf Basis des Ohm'schen Gesetzes berechnet werden.

Unter „voltage-clamp“-Bedingungen wird die PD_t durch die Einspeisung eines externen Stroms über die Stromelektroden auf ein bestimmtes Potential geklemmt. Wird dabei das transepitheliale Potential exakt auf 0 mV geklemmt, spricht man von „short circuit“-Bedingungen. Dabei wird der elektrische Gradient durch die Anlegung eines Klemmstroms aufgehoben. Die Bewegung von Ionen erfolgt in diesem Fall entweder längs des chemischen Gradienten oder durch epitheliale Transportprozesse energetisiert.

Die bei den Messungen zu dieser Dissertation aufgezeichneten Klemmströme (I_t in μA) wurden im Rahmen der Auswertung in den Kurzschlussstrom normiert auf die Gewebefläche (I_{sc} in $\mu A \cdot cm^{-2}$) umgerechnet. Dabei gilt:

$$I_{sc} = \frac{I_t}{A}$$

Hierbei ist:

I_t = Klemmstrom in μA

I_{sc} = Kurzschlussstrom ($\mu A \cdot cm^{-2}$)

A = Fläche der Messkammer ($0,6362 cm^2$)

Die Vorzeichenkonvention wurde bewusst so ausgewählt, dass ein positiver transepithelialer Strom einer Kationenresorption – von mukosal nach serosal – oder einer Anionensekretion – von serosal nach mukosal – entspricht. Bei einem negativen Strom gilt die umgekehrte Situation.

3.5.3 Messung des pH_i mit ionenselektiven Mikroelektroden

Zur Messung des intrazellulären pH_i kamen doppelumige „double-barreled“ Mikroelektroden zum Einsatz. In eine der Kapillaren wurde ein für H^+ -Ionen selektives Ionophor eingefüllt; die andere Kapillare enthielt $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl-Lösung und wurde zur Messung des apikalen Membranpotentials verwendet. Eine Änderung der H^+ -Ionenkonzentration führte zu einer Potentialveränderung über dem Ionophor, die sich nach der Korrektur um den Wert des apikalen Membranpotentials proportional zur vorhandenen H^+ -Ionenkonzentration verhielt.

Zur Herstellung der „double-barreled“ Mikroelektroden wurden Borosilikatglaskapillaren verwendet. Jeweils eine Kapillare GC120F10 und eine GC150F15 (Harvard Apparatus, Kent, UK) wurden parallel in zwei von Schrumpfschläuchen (Deray-H-set 1/8“, DSG-Canusa, Meckenheim, Deutschland) ummantelten Core-Cable-Ends (4x10, 611889, Conrad Bauelemente, Conrad Elektronik, Hirschau, Deutschland) gesteckt, so dass der Mittelteil der Kapillaren frei lag und das Ende der größeren Kapillare etwas herausragte. Für die Fixierung wurden die Elektroden ca. 10 Minuten lang bei 190°C in einem Ofen erwärmt. Zur Herstellung der Pipette kam ein programmierbarer Multipipetten-Zieher zum Einsatz (PMP-107, Mikrodata Instrument Inc, South Plainfield, NJ, USA). Die beiden voneinander getrennten Kapillaren wurden im Bereich der Spitze derart verschmolzen, dass beide in einer sehr feinen Spitze mündeten.

Ein Kanal diente dabei zur Messung der apikalen Membranpotentialdifferenz. Der andere Kanal ermöglichte die Messung des intrazellulären pH-Wertes. Dieser pH-Kanal erhielt zunächst durch eine Silanisierung mit Dichlormethylsilan (Sigma-Aldrich) eine hydrophobe Beschichtung. Zu diesem Zweck wurde die bei Strecker (2011) beschriebene Silanisierungsapparatur genutzt (Strecker 2011). Der zu silanisierende Kanal wurde mit dem auf 90°C erhitzten Glas verbunden, in das $200 \mu\text{l}$ Dichlordimethylsilan (Sigma-Aldrich) gegeben wurden. Der Referenzkanal wurde über einen englumigen Gummischlauch an Druckluft (ca. 1 bar) angeschlossen und auf diesem Wege vor übertretendem Silan geschützt. Die Dauer der Silanisierung belief sich auf 30 Minuten. Danach wurden die Elektroden für 120 Minuten bei 190°C im Ofen erhitzt.

Der silanisierte Kanal wurde unmittelbar nach der Entnahme aus dem Backofen mittels einer Hamilton Syringe (Type 7000.50C; $0,5 \text{ ml}$, MedChrome, Germany) mit $0,3 \mu\text{l}$ Hydrogen

Ionophor I-Cocktail A (Sigma Aldrich) gefüllt (Stumpff 2011). Dank der Silanisierung entstand eine feste Verbindung zwischen der nunmehr hydrophoben Glaswand der Kapillare und dem eingefüllten flüssigen Ionenaustauscher. Damit das Ionophor bis in die Spitze absinken konnte, wurden die befüllten Elektroden über Nacht mit der Spitze nach unten in einem Behältnis gelagert, dessen Boden durch eine Schicht $\text{CaCl}_2(\text{MgSO}_4)$ bedeckt war. Hierdurch entstand eine H_2O freie Atmosphäre.

Am Vorabend des angesetzten Versuchstermins oder direkt am Versuchstag selbst wurden die Elektroden durch sogenanntes „backfilling“ vom stumpfen Ende her mit Lösungen befüllt, die zuvor bei 40°C im Backofen entgast wurden. Die pH-sensitive Seite wurde mit einer aus $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl und $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Hepes (pH 7,4) bestehenden Lösung, welche als „backfill-solution“ bezeichnet wird, gefüllt. Für die Referenzseite wurde $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl Lösung verwendet (siehe Abbildung 10). Zum Schleifen der nun gefüllten hoch-ohmigen Mikroelektroden auf einen gewünschten Widerstandswert von $50 \text{ M}\Omega$ wurde ein Beveller (BV-10, Sutter Instrument Company, Novato, CA, USA) verwendet. Die beiden Kapillaren wurden über frisch chlorierte Silberdrähte mit einem hoch-ohmigen Mikroelektrodenverstärker (F-223 A Dual Elektrometer, WPI) verbunden. Dieser ermittelte jeweils das vorhandene Potential über den beiden Kapillaren.

Am Morgen des Messtages mussten die ionenselektiven Mikroelektroden geeicht und auf ihre Verwendbarkeit hin überprüft werden. Dazu wurde zunächst der Widerstand des Referenzkanals bestimmt. Ausschlusskriterium war ein Widerstand $< 10 \text{ M}\Omega$. Die Eichung der Mikroelektroden wurde mit Standardpufferlösungen (pH 7,4 und pH 6,4) durchgeführt. Die zu eichende Elektrode wurde in die Halterung des Mikromanipulators eingeklemmt, an den Mikroelektrodenverstärker angeschlossen und in die mit Eichlösung gefüllte Messkammer eingetaucht. Der Referenzkanal, der die apikale Potentialdifferenz messen sollte, erhielt die Kennzeichnung A, der ionenselektive Kanal (mit Ionophore befüllt) hingegen die Bezeichnung B (siehe Abbildung 10). Die Differenz der beiden Kanäle entsprach dem pH-Wert (A minus B) (Strecker 2011). Zuerst wurden beide Kanäle in der Eichlösung pH 7,4 auf 0 mV abgeglichen. Bei dem folgenden Wechsel der Eichlösung auf pH 6,4 wurde darauf geachtet, dass sich das Potential des Referenzkanals nicht wesentlich änderte und gleichermaßen im Verlauf keinen Drift zeigte. Nur wenn der Referenzkanal ein stabiles Potential hielt und auf dem pH-Kanal (A minus B) der Lösungswechsel von pH 7,4 auf pH

6,4 in einer Veränderung von mindestens 40 mV nachvollzogen werden konnte, war es möglich, die Mikroelektrode für die geplanten Messungen einzusetzen.

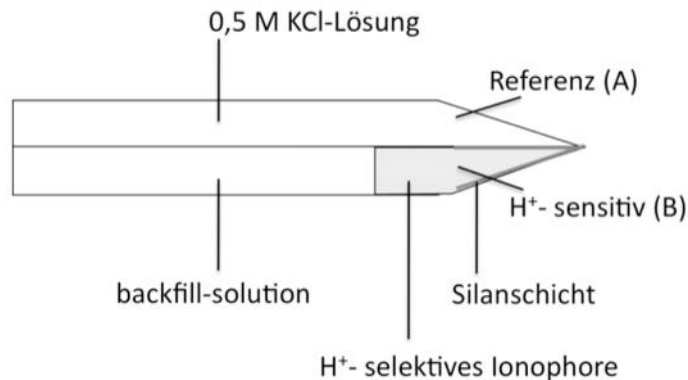


Abbildung 10: Schematische Darstellung der gefüllten „double-barreled“ Mikroelektrode

3.5.4 Elektrophysiologische Messung mit konventionellen, einlumigen Mikroelektroden

Die „einfachen“ oder auch als „single-barrel“ bezeichneten Mikroelektroden wurden mittels eines programmierbaren Multipipetten-Ziehers aus einer GC150F15 (Harvard Apparatus, Kent, UK) Borosilikatkapillare gezogen (PMP-107, Mikrodata Instrument Inc, South Plainfield, NJ, USA). Die Kapillare wurde mit $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl gefüllt und vorhandene Luftblasen aus der Kapillare entfernt (siehe Abbildung 11). Ein an der Kapillare befestigter chlorierter Silberdraht verband die Mikroelektrode mit einem hoch-ohmigen Mikroelektrodenverstärker (F-223 A Dual Elektrometer, WPI), der das vorhandene Potential über der Kapillare erfasste.

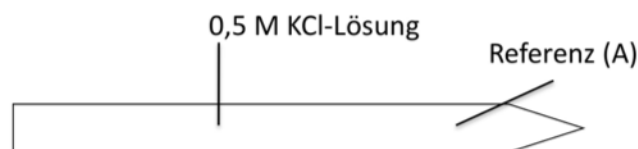


Abbildung 11: Schematische Darstellung der gefüllten konventionellen Mikroelektrode

3.5.5 Ablauf des Mikroelektrodenversuchs mit Punktion

Im Anschluss an den Transport wurde das Gewebe im Labor in frische Pufferlösung gegeben (siehe Anhang Tab. 21), so dass eine fortlaufende Begasung mit Carbogen sichergestellt war. Bei allen verwendeten Pufferlösungen ist kurz vor Versuchsbeginn der pH-Wert mit einem pH-Meter (IL MICRO-pH-A; Schott Instruments) gemessen und falls nötig nachgestellt worden. Das Eigenpotential der an die Messkammer angeschlossenen Elektroden wurde auf 0 mV abgeglichen. Daraufhin wurde ein ca. 3 cm² großes Epithelstück zugeschnitten und waagrecht in die Ussing-Kammer eingespannt und auf mukosaler sowie serosaler Seite mit einem Standard-NaCl-Puffer (pH 7,4) perfundiert. Dem Gewebe wurde eine „Äquilibrationszeit“ von ca. 10 Minuten gegeben, bevor die Punktion startete.

Die Mikroelektrode wurde über der Messkammer installiert und konnte mittels Mikromanipulator gezielt gesteuert werden. Auf das Eintauchen der Elektrode und den Abgleich auf 0 mV folgte die Punktion des Gewebes. Die erfolgreiche Punktion einer Zelle war durch einen sowohl plötzlichen als auch deutlichen Abfall der Potentialdifferenz, dem negativen Ruhemembranpotential der Zellen entsprechend, zu identifizieren.

Gelang es, eine stabile Punktion zu erzielen, wurde jeweils nach einer zuvor definierten Zeitspanne (10 oder 15 Minuten) ein mukosaler Lösungswechsel vorgenommen. Die auf der serosalen Seite verwendete Lösung war in allen Mikroelektrodenversuchen die serosale Standardpufferlösung (NaCl pH 7,4; Zusammensetzung siehe Anhang Tab. 25). Zum Ende jeder Messung wurde die gleiche Perfusionslösung wie zu Beginn appliziert. Die Messung galt als stabil, wenn die Abweichung der über den Referenzkanal gemessenen apikalen Potentialdifferenz zwischen dem Anfang und Ende der Messung kleiner als 5 mV war.

Im Fall von Messungen mit „double-barreled“ Mikroelektroden wurde die Pipette nach Beendigung der Messung zunächst in der apikalen Pufferlösung belassen, um auf diese Weise eine abschließende Eichung der Elektrode durchzuführen. Auf der Basis dieser gemessenen Eichwerte wurde das ermittelte Potential des pH-Kanals in mV in pH-Einheiten des pH_i umgerechnet (SigmaPlot 11).

3.5.6 Elektrophysiologische Messung in der Mikroelektrodenapparatur ohne Punktion

Nach dem Abgleich des Elektrodeneigenpotentials auf 0 mV wurde das Gewebe in die Ussing-Kammer eingespannt. Nach einer Äquilibrationszeit von 15 Minuten unter „open-circuit“-Bedingungen wurde das transepitheliale Potential auf 0 mV geklemmt (short-circuit). Der mukosale Lösungswechsel wurde je nach 10 bis 15 Minuten vorgenommen. Analog zu den Messungen mit Mikroelektroden wurde die serosale Seite stets mit dem Standardpuffer (NaCl pH 7,4) perfundiert.

3.5.7 Versuchsansätze und Einsatz von Testsubstanzen

Zur genaueren Bestimmung des Transportweges von Kationen über das Pansenepithel kamen verschiedene Testsubstanzen (Sigma-Aldrich) zum Einsatz.

Anhand des elektrophysiologischen Parameters I_{sc} kann gefolgert werden, ob es durch die verwendete Substanz zu einer Beeinflussung, d. h. Aktivierung oder Hemmung, des Kationentransports über das Epithel kommt. Alle verwendeten Substanzen (mit Ausnahme von Bumetanid) wurden ausschließlich auf der mukosalen Seite des Epithels eingesetzt.

Die Testsubstanzen wurden in geeigneter Konzentration in Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Ethanol gelöst, aliquotiert und eingefroren. Die Zugabe zur Pufferlösung erfolgte stets im Verhältnis 1:1000, wobei im Folgenden immer die erreichte Endkonzentration angegeben ist.

Um Lösungswechselartefakte auszuschließen, erfolgte die Zugabe durch Hinzupipettieren in den Vorratsbehälter während des laufenden Experimentes. Die Durchmischung erfolgte durch die Begasung und auf ein Umstellen des Dreiwegehahnes konnte so verzichtet werden. Um das Auftreten von Effekten durch das Lösungsmittel auszuschließen, wurden Kontrollversuche durchgeführt. Weder bei der Zugabe von DMSO noch bei der Zugabe von Ethanol kam es zu einer Veränderung des transepithelialen Stroms.

3.5.8 Pufferlösungen

Alle verwendeten Pufferlösungen wurden mit Chemikalien der Firma Merck und Firma Carl Roth unter Einhaltung der angegebenen Rezeptur (siehe Anhang Tabelle 25) hergestellt. Die erforderlichen pH-Werte wurden mittels HCl oder TRIS eingestellt. Die Osmolarität der Lösungen wurde, wie bereits im Vorangegangenen beschrieben, mittels Gefrierpunktmessung mit einem Osmometer (Firma Roebeling Messtechnik) bestimmt und falls nötig mit Mannitol auf $295 \pm 5 \text{ mosmol}\cdot\text{l}^{-1}$ eingestellt.

Der Standardpuffer (NaCl) wie auch der $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NH_4^+ -Puffer enthielten $70 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Natrium. In einer Versuchsreihe wurde Na^+ durch eine äquimolare Menge NMDG^+ (N-Methyl-D-Glucamin) ersetzt. Dieses Kation zeichnet sich durch die identische Ladung wie Natrium aus, kann aber aufgrund seiner großen molekularen Struktur nicht die für Na^+ zur Verfügung stehenden Transportwege nutzen. Zum Einsatz kamen so ein $110 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NMDG^+ -Puffer, der weder Na^+ noch NH_4^+ enthielt (Pufferbezeichnung $110 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NMDG^+), und ein $70 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NMDG^+ -Puffer, der kein Natrium, aber $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NH_4^+ enthielt. Wie schon zuvor wurde der pH Wert auf 6,4 eingestellt (Pufferbezeichnung $70 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NMDG^+ $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NH_4^+) für die exakte Zusammensetzung siehe Anhang Tab. 25).

Zur Untersuchung der Wirkung von Mg^{2+} und Ca^{2+} wurde ein Mg^{2+} - und Ca^{2+} -freier Puffer mit $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) genutzt. EDTA bildet besonders stabile Chelatkomplexe mit zweiwertigen Kationen (Pufferbezeichnung $70 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NMDG^+ $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NH_4^+ EDTA-Puffer) (siehe Tabelle 25).

3.5.9 Auswertung und Statistik

Die Datenerhebung ist abhängig vom jeweiligen Versuchsaufbau:

Bei Messungen mittels „double-barreled“-Mikroelektroden wurden für jede der verwendeten Lösungen nach 5, 10 und 12 Minuten Messpunkte festgelegt. Im Ergebnisteil wurden die Daten für 10 Minuten nach Lösungswechsel herangezogen, da zu diesem Zeitpunkt jeweils ein vollständiger Lösungswechsel sowie das Erreichen eines Plateaus sicher gestellt war. Im Anhang befindet sich zusätzlich eine tabellarische Übersicht der Messwerte 5 Minuten nach Lösungswechsel (siehe Tabellen 30-32).

Bei Experimenten mittels konventionellen Mikroelektroden wurde jeweils ein Messpunkt vor dem Lösungswechsel (Standardinkubation), sowie außerdem der Datenpunkt der maximalen Veränderung nach dem Lösungswechsel definiert (Datenpunkt der maximalen Veränderung). Zusätzlich wurde der Datenpunkt 10 Minuten nach Auswaschung der Lösung (bezeichnet als washout (w)) hinzugezogen.

Messungen, bei denen andere Messpunkte zur Auswertung herangezogen wurden, sind ausdrücklich im Ergebnisteil genannt. Dargestellt sind im Folgenden sowohl die elektrophysiologischen Parameter (transepitheliale Potentialdifferenz (PD_t) oder transepithelialer Strom (I_{sc}) und apikale Potentialdifferenz (PD_a)) sowie, falls gemessen, der intrazelluläre pH-Wert (pH_i). Es wurden die Absolutwerte ebenso wie die Differenzwerte der einzelnen Parameter erhoben und in Form des arithmetischen Mittels und des Standardfehlers des Mittelwerts (SEM) angegeben.

Die Anzahl der Tiere, von denen die Pansenepithelien stammten, ist mit N angegeben. Der Stichprobenumfang, der zur statistischen Auswertung herangezogen wurde, umfasst jeweils die Anzahl der Epithelien n. Da die Epithelien von verschiedenen Tieren stammten wurden bei der statistischen Auswertung daher nur gepaarte Daten miteinander verglichen. Es wurde ausschließlich die Reaktion des gleichen Epithels auf verschiedene Behandlungen untersucht. Ein Vergleich von Epithelien verschiedener Herkunft fand nicht statt. Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$) festgelegt. Exemplarisch ist für jede Versuchsreihe eine Originalmessung (labchart 7.0) dargestellt.

Zur statistischen Auswertung wurde SigmaPlot 11.0 verwendet. Die Daten wurden mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung hin getestet. Normalverteilte Daten wurden mittels „One way Repeated Measures ANOVA“ (Student-Newman-Keuls) auf Signifikanz geprüft. Andernfalls wurde eine Signifikanzprüfung durch Nutzung von „Repeated Measures ANOVA on Ranks“ (Student-Newman-Keuls) vorgenommen. In Einzelfällen wurden paarweise Vergleiche (Student t-Test bzw. Rank Sum Test) durchgeführt. Tauchten spezifische Fragen auf und wurde zudem eine andere Prüfung hinsichtlich Signifikanz angesetzt, wird dieser Sachverhalt im Ergebnisteil explizit genannt.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Ussing-Kammer-Versuche und Messung der Ammoniak-Fluxe mittels Ammoniakelektrode

Frühere Ussing-Kammer-Experimente am Pansenepithel des Schafes haben gezeigt, dass es durch die Zugabe von Ammoniak zu einer Depolarisation des transepithelialen Potentials und einem Anstieg des transepithelialen Stroms kam (Abdoun et al., 2005). In Abhängigkeit vom jeweils vorliegenden pH-Wert konnte bei pH 6,4 und 6,9 eine Zunahme des Na^+ -Fluxes von mukosal nach serosal gemessen werden. Die Autoren schlossen aus diesen Ergebnissen auf eine vermehrte Aktivität des NHE, ausgelöst durch eine NH_4^+ -induzierte Ansäuerung des Zytosols (Abdoun et al., 2005). Die Frage, in welcher Form Ammoniak weiter serosal transportiert wurde, blieb dabei ungeklärt. Daher sollte nun der Ammoniak-Flux über das gesamte Pansenepithel des Rindes untersucht werden. Ausgehend von der Annahme, dass Ammoniak überwiegend in Form von NH_3 auf der Blutseite ankommt, wäre mit einem Anstieg des serosalen pH-Wertes zu rechnen.

Zur Überprüfung wurden Ussing-Kammer-Experimente mit drei Versuchsgruppen vorgenommen. Die Kammern der Kontrollgruppe wurden mukosal mit einem NH_4^+ -freien Puffer gefüllt, Kammern der 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ und 40 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NH_4^+ -Gruppen wurden mit den entsprechenden Lösungen befüllt. Als serosaler Puffer kam bei sämtlichen Kammern ein NH_4^+ -freier Puffer zum Einsatz (siehe Anhang Tab. 22). Während des Versuchs wurden der Kurzschlussstrom und die Leitfähigkeit aufgezeichnet. Anschließend wurde der serosale pH-Wert gemessen sowie der serosale Puffer zur Bestimmung des $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ -Verhältnisses aufgefangen und mittels Ammoniakelektrode bestimmt.

4.1.1 Elektrophysiologische Parameter Kurzschlussstrom I_{sc} und Gewebeleitfähigkeit G_t

Der I_{sc} der Kontrollgruppe lag bei $0,77 \pm 0,1 \mu\text{Eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ($20,64 \pm 2,68 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$) ($N = 8; n = 41$). Wurden 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NMDG^+ der mukosalen Lösung durch eine äquimolare Menge NH_4^+ substituiert, lag der Kurzschlussstrom bei $1,18 \pm 0,15 \mu\text{Eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ($31,63 \pm 4,02 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$) ($N = 8; n = 40$). Wurde die Konzentration auf 40 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NH_4^+ angehoben, so lag der

transepitheliale Strom bei $1,85 \pm 0,15 \mu\text{Eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ($49,58 \pm 4,02 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$) und war demzufolge signifikant größer als in der Kontrollgruppe oder in der $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{NH}_4^+$ -Gruppe ($N = 8$; $n = 43$; $p < 0,05$).

Tabelle 1: Tabellarische Zusammenfassung des Kurzschlussstroms I_{sc}

Nr.	Gruppe	$I_{sc} (\mu\text{Eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1})$				p vs 1	p vs 2	p vs 3
		n	MW	Median	SEM			
1	Kontrolle (0 mM NH_4^+)	41	0,77	0,79	0,1		n. s.	< 0,001
2	10 mM NH_4^+	40	1,18	0,97	0,15	n. s.		
3	40 mM NH_4^+	43	1,85	1,77	0,15	< 0,001	< 0,001	

Die Leitfähigkeit der Kontrollgruppe lag bei $9,05 \pm 0,77 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-2}$ und unterschied sich damit nicht von den Leitfähigkeiten der $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ oder $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{NH}_4^+$ -Gruppe ($p = 0,78$). Offenbar ist der Beitrag von Ammonium zur Gesamtleitfähigkeit als eher gering einzuschätzen. Diese Vermutung wird durch die klassische Beziehung, wonach eine Änderung des I_{sc} um $1 \mu\text{Eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ zu einer Änderung der Leitfähigkeit von $1 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-2}$ führt bestätigt (zur Herleitung siehe: (Stumpff 2011)). Demnach entspricht die durch NH_4^+ hervorgerufene Leitfähigkeit nur ca. $\frac{1}{10}$ der Gesamtleitfähigkeit.

Tabelle 2: Tabellarische Zusammenfassung der Gewebeleitfähigkeit G_t bei einer 2,5-stündigen Inkubation mit mukosaler $0,10$ oder $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung

Nr.	Gruppe	$G_t (\text{mS}\cdot\text{cm}^{-2})$				p vs 1
		n	MW	Median	SEM	
1	Kontrolle (0 mM NH_4^+)	41	9,05	8,23	0,77	0,78
2	10 mM NH_4^+	40	11,52	8,5	1,46	
3	40 mM NH_4^+	43	10,68	8,05	1,49	

4.1.2 Der Einfluss von mukosalem Ammoniak auf den serosalen pH-Wert

Der serosale Puffer wurde ohne den Zusatz von Hepes hergestellt und daher nur geringfügig durch das darin enthaltene Na-Glukonat gepuffert. Der pH-Wert wurde vor Versuchsbeginn auf 7,4 eingestellt. Nach Ablauf der Versuchsdauer von 150 Minuten ist der serosale pH-Wert erneut gemessen worden. Die Kontrollgruppe erreichte einen serosalen pH-Wert in Höhe von $7,30 \pm 0,04$ ($N = 8$; $n = 41$). Bei der $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{NH}_4^+$ -Gruppe konnte ein pH-Wert von $7,37 \pm$

0,04 gemessen werden (N = 8; n = 40). Beide unterschieden sich nicht signifikant von dem bei der 40 mmol·l⁻¹ NH₄⁺-Gruppe bestimmten pH-Wert von 7,39 ± 0,04 (N = 8; n = 43; p = 0,18). Sämtliche Gruppen unterschieden sich ebenso wenig signifikant von dem vor Beginn der Messung eingestellten pH-Wert 7,4 (p > 0,05).

Tabelle 3: Tabellarische Darstellung der serosalen pH-Werte nach 2,5 Stunden Inkubation mit mukosaler 0, 10 oder 40 mmol·l⁻¹ NH₄Cl-Lösung

Nr.	Gruppe	serosaler pH				p vs 2	p vs 3
		n	MW	Median	SEM		
1	Kontrolle (0 mM NH ₄ ⁺)	41	7,30	7,32	0,04	n. s.	
2	10 mM NH ₄ ⁺	40	7,37	7,39	0,04		
3	40 mM NH ₄ ⁺	43	7,39	7,39	0,04		

4.1.3 Ammoniak-Flux über das Panseneithel des Rindes

Abschließend wurde der gesamte Ammoniakgehalt des serosalen Puffers bestimmt und daraus die Netto-Fluxe von protonierter und nicht-protonierter Form ermittelt.

Tabelle 4: Tabellarische Zusammenfassung der Flux-Messungen in der Ussing-Kammer

Gruppe	NH ₃ Flux (μmol·cm ⁻² ·h ⁻¹)			NH ₄ ⁺ Flux (μmol·cm ⁻² ·h ⁻¹)		
	MW	Median	SEM	MW	Median	SEM
Kontrolle (0 mM NH ₄ ⁺)	0,02	0,01	0,003	1,71	1,35	0,223
10 mM NH ₄ ⁺	0,08	0,07	0,007	5,87	6,42	0,362
40 mM NH ₄ ⁺	0,28	0,21	0,038	18,18	16,70	1,585
Gruppe	NH ₃ Flux (mmol·l ⁻¹)			NH ₄ ⁺ Flux (mmol·l ⁻¹)		
	MW	Median	SEM	MW	Median	SEM
Kontrolle (0 mM NH ₄ ⁺)	0,01	0,01	0,001	0,76	0,59	0,080
10 mM NH ₄ ⁺	0,04	0,04	0,004	3,08	3,25	0,170
40 mM NH ₄ ⁺	0,13	0,09	0,016	8,72	7,72	0,655

Insgesamt kam es zu einem von der mukosalen Konzentration abhängigen Ammonium-Flux, wobei die serosale Konzentration nach 2,5 Stunden auf 3,1 ± 0,1 mmol·l⁻¹ (10 mM NH₄⁺) bzw. 8,7 ± 0,2 mmol·l⁻¹ (40 mM NH₄⁺) anstieg.

Bei unseren Messungen wurde anders als in Voruntersuchungen der pH-Wert der serosalen, nur schwach gepufferten Lösung verfolgt. Dadurch bestand die Möglichkeit, das exakte Mengenverhältnis des serosal erscheinenden NH_3 und NH_4^+ zu bestimmen.

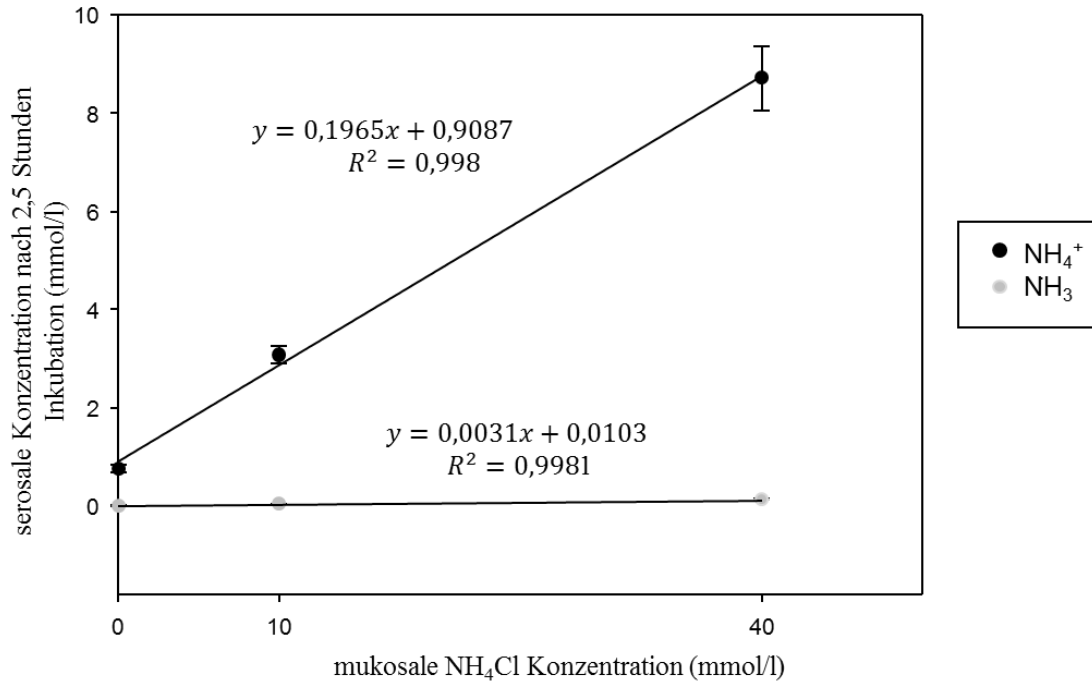


Abbildung 12: Darstellung der Ammoniak- und Ammonium-Fluxe nach 2,5 Stunden Inkubation in Abhängigkeit der mukosal vorgelegten NH_4Cl -Konzentration

Wie aus Abbildung 12 ersichtlich ist, fand während der 2,5-stündigen Inkubation eine Resorption von $0,19 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NH}_4^+$ (bzw. $79 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1} \text{ NH}_4^+$) und $0,003 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NH}_3$ (bzw. $1,2 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1} \text{ NH}_3$) pro mukosal vorgelegtem NH_4Cl ($\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) statt.

Zur Untersuchung des Effektes von NH_3 auf den pH-Wert der serosalen Pufferlösung wurden Titrationsversuche durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde Pufferlösung, die in der Zusammensetzung der serosal in den Ussing-Kammer-Versuchen eingesetzten Lösung entsprach, mit 1 molarer NH_3 -Lösung titriert und der pH-Wert aufgezeichnet.

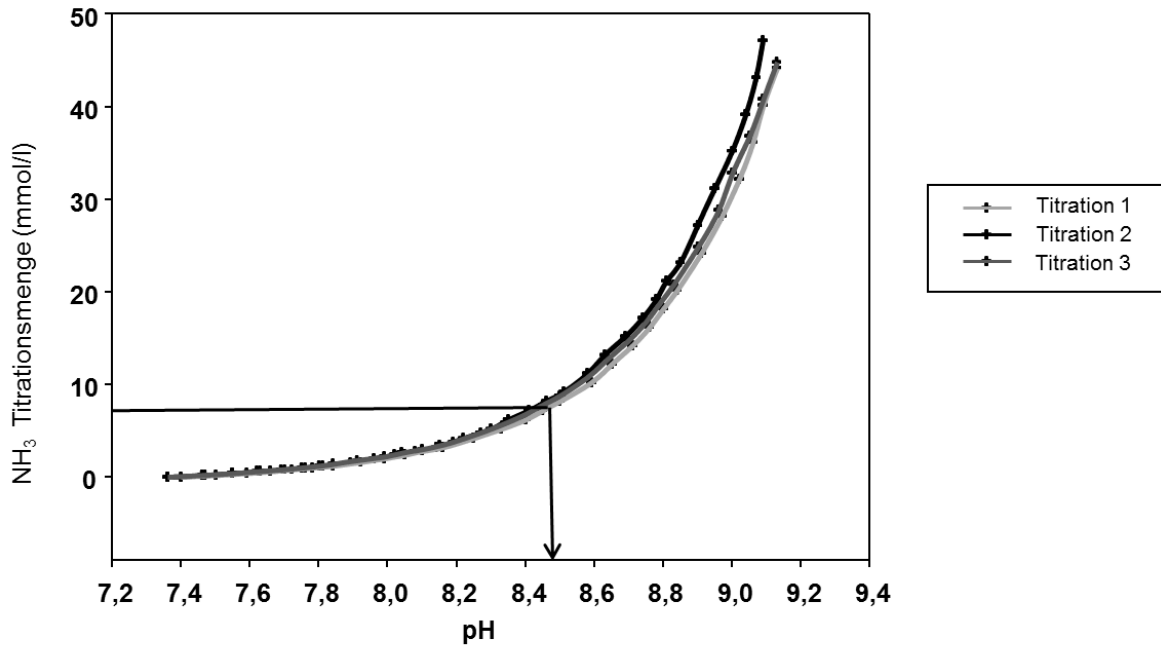


Abbildung 13: Zusammenfassung der Titrationsversuche mit serosalem Puffer

Im Rahmen der Titrationsversuche führte die Zugabe von $8 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NH_3 zu einer pH-Wertveränderung um $>1,0$ ($n = 3$). Diese Ergebnisse sprechen recht deutlich gegen eine primäre Resorption in der Form von NH_3 , denn dann hätte eine deutliche Alkalinisierung der serosalen Lösung beobachtet werden müssen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei allen Gruppen nettomäßig der Transport ganz überwiegend ($> 98\%$) in der Form von NH_4^+ erfolgte. Es kann bei diesen Messungen jedoch nicht zwischen einem primär transzellulären und primär parazellulären Efflux unterschieden werden. Auffällig ist, dass in der Kontrollgruppe, bei der eine NH_4^+ -freie mukosale Lösung verwendet wurde, ein geringes Auftreten von NH_3 und NH_4^+ in der serosalen Lösung nachgewiesen wurde (siehe Diskussion). Zur Klärung der Frage, ob der Efflux von NH_4^+ rein parazellulär erfolgt oder ein transzellulärer Transport des geladenen Ammoniums möglich ist, wurden Versuche mit Patch-Clamp und Mikroelektrode durchgeführt.

4.2 Ergebnisse der Patch-Clamp-Messungen

Frühere Studien am Schafpansen haben gezeigt, dass dieser nicht-selektive Kationenkanäle exprimiert, die durch divalente Kationen modulierbar sind (Leonhard-Marek 2002; Leonhard-Marek et al., 2005; Brinkmann 2007). Ziel der hier beschriebenen Patch-Experimente war es,

zu untersuchen, ob isolierte Pansenzellen des Rindes ähnliche Kanäle exprimieren und ob diese auch NH_4^+ leiten. Angesichts des Umstandes, dass in den zu untersuchenden Zellen zumeist eine ganze Reihe von verschiedenen Kanälen vorhanden sind, müssen die Versuchsbedingungen so angepasst werden, dass es möglich ist, gesuchte Leitfähigkeiten von anderen zu differenzieren. Diese Möglichkeit besteht einerseits durch die Wahl der verwendeten Lösungen, andererseits durch die Variation der elektrischen Triebkraft.

4.2.1 Identifizierung der Membranströme unter Standardbedingungen

Zur Charakterisierung der Ionenströme über die Membran der Pansenepithelzellen wurden in zwei verschiedenen Versuchsreihen die Zellen mit Pipettenlösungen gefüllt, deren Hauptbestandteil Na-Glukonat oder K-Glukonat war. Für die Stimulation der Kationenleitfähigkeit wurde bei beiden Versuchsreihen eine Ca^{2+} -freie Pipettenlösung verwendet (Leonhard-Marek et al., 2005; Brinkmann 2007). Als Perfusionsbadlösung für die extrazelluläre Seite kam zunächst eine Ca^{2+} - und Mg^{2+} -haltige NaCl-Lösung zum Einsatz. Die exakte Zusammensetzung aller Lösungen sowie eine tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse ist im Anhang zu dieser Dissertation nachlesbar.

4.2.2 Messungen mit einer Na-Glukonat Pipettenlösung

4.2.2.1 Messungen unter Standardbedingungen und der Einfluss von extrazellulärem Natrium und Chlorid

In der ersten Versuchsreihe wurden Zellen des Rinderpansens mit Na-Glukonatlösung gefüllt und mit einer NaCl-Lösung umspült. Dabei war die Zusammensetzung der Lösungen so konzipiert, dass gleiche Konzentrationen von Na^+ , K^+ und Mg^{2+} innen wie auch außen vorhanden waren. Auf diesem Weg konnten diese Ionen nicht zu einem von Null verschiedenen Umkehrpotential beitragen. Unter diesen Standardbedingungen konnte bei einem Pipettenpotential von +100 mV ein Auswärtsstrom von $7,74 \pm 3,52$ pA/pF gemessen werden ($n = 8$), entsprechend einem Efflux von Kationen oder aber einem Influx von Anionen. Bei einem Potential von -120 mV konnte ein Einwärtsstrom in Höhe von $-2,81 \pm 0,91$ pA/pF gemessen werden, entsprechend einem Influx von Kationen, da der Efflux des

großen Anions Glukonat als gering einzuschätzen sein dürfte (siehe Abbildungen 14-16). Das Umkehrpotential lag bei $-24,28 \pm 5,99$ mV.

4.2.2.2 Ersatz von NaCl durch NMDG-Glukonat

Im Zuge der Substitution des in der Perfusionslösung enthaltenen NaCl's durch NMDG-Glukonat wurden zwei kleine Ionen, die gut durch Ionenkanäle geleitet werden, durch zwei nicht oder nur sehr gering permeierende Ionen ersetzt. Im Experiment war eine deutliche Abnahme des Stroms bei +100 mV von $7,74 \pm 3,52$ pA/pF auf $3,12 \pm 0,74$ pA/pF ($n = 8$; $p = 0,008$) festzustellen.

Aufgrund des Wechsels zur NMDG-Glukonatlösung sank der Einwärtsstrom bei -120 mV signifikant von $-2,81 \pm 0,91$ pA/pF auf $-1,85 \pm 0,74$ pA/pF ($n = 8$; $p = 0,008$). Als Ursache dürfte der Ersatz von Na^+ durch das impermeable NMDG^+ -Ion angeführt werden. Die Umkehrpotentiale der Zellen änderten sich durch den Wechsel zur NMDG-Glukonatlösung nicht signifikant, was dem parallel verringerten Influx von Kationen und Anionen entspricht (siehe Abbildungen 14-16).

4.2.2.3 Leitfähigkeit für Ammonium

In früheren Patch-Clamp-Messungen konnte gezeigt werden, dass es durch die extrazelluläre Zugabe von NH_4Cl zu einer Beeinflussung des Auswärts- und Einwärtsstroms sowie des Umkehrpotentials kam (Abdoun et al., 2005). Jedoch wurden die Zellen in diesen Messungen mit K-Glukonatlösung gefüllt und die extrazelluläre Lösung enthielt Chlorid. Um einen eventuellen Einfluss von extrazellulärem Chlorid auszuschließen, wurde anstelle von NH_4Cl in dieser Versuchsreihe NH_4 -Glukonat gewählt. Damit befand sich intrazellulär und extrazellulär als Anion überwiegend Glukonat, das aufgrund seiner Größe wenig permeabel ist. Nach dem Wechsel von NMDG-Glukonat zu einer $137 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NH_4 -Glukonatlösung zeigte sich ein Anstieg des Auswärtsstroms von $3,12 \pm 0,74$ pA/pF auf $7,49 \pm 2,14$ pA/pF ($n = 8$, $p = 0,055$) (siehe Abbildungen 14-16).

Der gemessene Einwärtsstrom stieg signifikant von $-1,85 \pm 0,74$ pA/pF auf $-4,17 \pm 1,08$ pA/pF ($n = 8$; $p = 0,008$) (siehe Abbildungen 13-15). Einhergehend damit kam es zu einer

hochsignifikanten Depolarisation des Umkehrpotentials von $-23,35 \pm 12,13$ mV in NMDG-Glukonatlösung auf $+22,75 \pm 4,97$ mV bei $137 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NH_4 -Glukonatlösung ($n = 8$; $p = 0,001$).

4.2.2.4 Der extrazelluläre Einfluss divalenter Kationen (Mg^{2+} und Ca^{2+}) auf die Leitfähigkeit von NH_4^+

Zur Untersuchung des Einflusses extrazellulärer divalenter Kationen (Mg^{2+} und Ca^{2+}) wurde eine $137 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NH_4 -Glukonat-Perfusionslösung ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gewählt, die mit $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA als Komplexbildner versehen wurde. Durch den Entzug der divalenten Kationen auf der extrazellulären Seite kam es zu keiner signifikanten Zunahme des Auswärtsstroms. Der Einwärtsstrom bei -120 mV zeigte dagegen eine signifikante Zunahme von $-4,17 \pm 1,08$ pA/pF auf $-31,69 \pm 8,0$ pA/pF ($n = 8$; $p = 0,008$) (siehe Abbildungen 14-16).

Das Umkehrpotential verändert sich infolge des Entzugs der divalenten Kationen Mg^{2+} und Ca^{2+} in der Perfusionslösung nicht signifikant. Dieses Ergebnis überrascht zunächst intuitiv, folgt aber letztlich doch logisch aus den durch die Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung beschriebenen Begebenheiten (siehe Diskussion Kap. 5.2.2.5).

4.2.2.5 Washout

Für die Beurteilung der Reversibilität der beobachteten Änderungen wurde in einem weiteren Schritt extrazellulär zurück auf eine Ca^{2+} - und Mg^{2+} -haltige $137 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NH_4 -Glukonatlösung gewechselt. Der Auswärtsstrom blieb abermals unverändert ($7,68 \pm 2,1$ pA/pF). Der Einwärtsstrom sank signifikant von $-31,69 \pm 8,0$ pA/pF zurück auf einen Wert in Höhe von $-4,62 \pm 1,54$ pA/pF ($n = 8$; $p = 0,008$). Einwärts- und Auswärtsstrom unterschieden sich somit nicht signifikant von den unter identischen Bedingungen vor Entzug der divalenten Kationen gemessenen Ströme (siehe Abbildungen 14-16).

In einem weiteren Schritt wurden die $137 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NH_4^+ wieder durch eine äquimolare Menge an NMDG⁺ ersetzt. Der Auswärtsstrom zeigte eine Veränderung von $7,68 \pm 2,1$ pA/pF auf $3,90 \pm 1,38$ pA/pF ($p = 0,039$). Der Einwärtsstrom sank auf $-2,91 \pm 1,77$ pA/pF ($p = 0,016$), entsprechend einem verringerten Einstrom von NH_4^+ (siehe Abbildungen 14-16).

Der Wechsel zu den zu Beginn der Messungen verwendeten Standardbedingungen mit Cl^- als primärem Anion (NaCl-Perfusionslösung) führte bei einem Pipettenpotential von 100 mV zu einer Zunahme des Stroms auf $10,41 \pm 7,14$ pA/pF ($p = 0,078$). Entsprechend dem Influx von Na^+ kam es ebenfalls zu einer signifikanten Zunahme des Einwärtsstroms bei -120 mV auf $-6,45 \pm 4,75$ pA/pF ($p = 0,016$) (siehe Abbildungen 14-16). Das Umkehrpotential lag bei $-0,49 \pm 4,5$ (n = 8; $p = 0,001$). Eine tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse befindet sich im Anhang (siehe Tabellen 26-28).

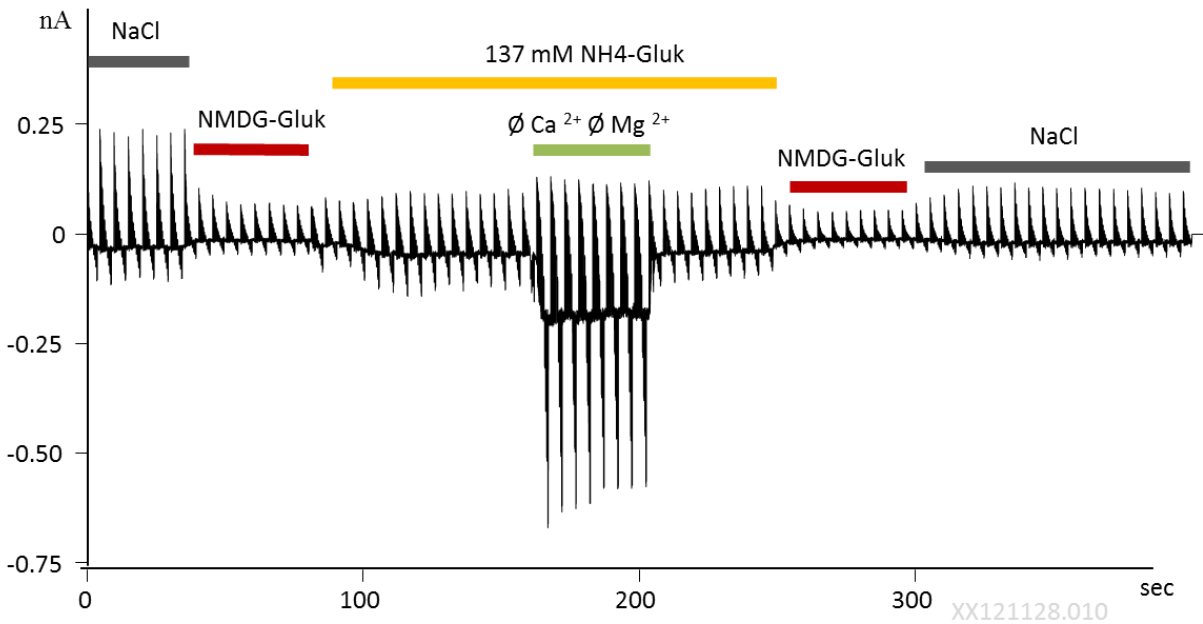


Abbildung 14: Darstellung einer Ganzzelleableitung einer mit Ca^{2+} -freien Na-Glukonat gefüllten Zelle. Im Verlauf der Messung wurde zunächst extrazelluläres NaCl durch NMDG-Glukonat ersetzt, was zu einem Absinken des Einstroms von Natrium und Chlorid führte. Der Wechsel zu einer NH_4 -Glukonatlösung führte dagegen zu einer Steigerung des Einwärts- und Auswärtsstroms, die durch den Entzug von extrazellulärem Ca^{2+} und Mg^{2+} ein weiteres Mal gesteigert werden konnte. Der washout zeigt die Reversibilität dieser Effekte.

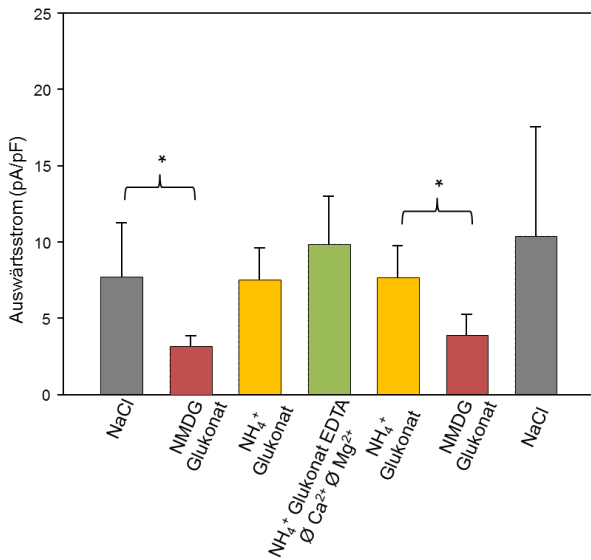
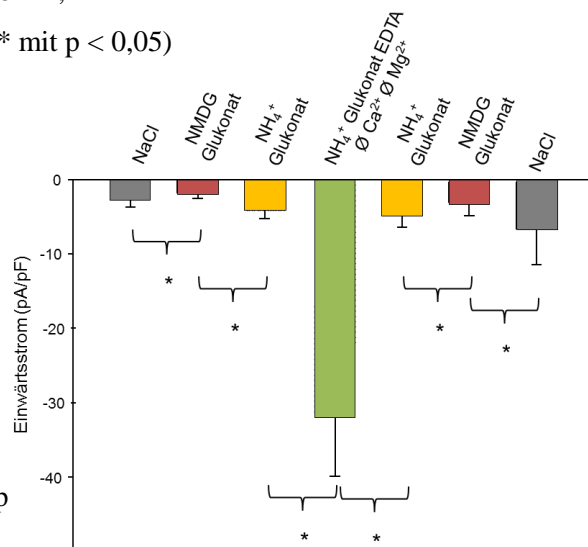


Abbildung 16: Zusammenfassende Darstellung der Einwärtsströme in pA/pF der mit Na-Glukonat gefüllten Zellen ($n = 8$; Mittelwert und SEM; * mit $p < 0,05$)

Abbildung 15: Zusammenfassende Darstellung der Auswärtsströme in pA/pF der mit Na-Glukonat gefüllten Zellen ($n = 8$; Mittelwert und SEM; * mit $p < 0,05$)



4.2.3 Messungen mit einer K-Glukonat-Pipettenlösung

In einer weiteren Versuchsreihe wurde das in der Pipettenlösung vorhandene Na-Glukonat durch K-Glukonat ersetzt. Diese Konstellation entspricht zwar mehr den physiologischen Begebenheiten, jedoch sind die Ergebnisse aufgrund des Beitrages von drei wichtigen Ionen zum Gesamtstrom schwerer zu interpretieren. Die Pipettenlösung war zur Stimulation der Kationenleitfähigkeit ebenfalls Ca^{2+} -frei. Alle extrazellulären Lösungen entsprachen ferner jenen, die schon zuvor zum Einsatz gekommen waren.

4.2.3.1 Messungen unter Standardbedingungen und der Einfluss von extrazellulärem Na^+ und Cl^-

Unter Standardbedingungen (innen: K-Glukonat, außen: NaCl) lag der bei einem Potential von 100 mV gemessene Auswärtsstrom bei $19,16 \pm 12,21$ pA/pF ($n = 7$). Der Einwärtsstrom, ermittelt bei einem Potential von -120 mV, lag bei $-19,50 \pm 14,67$ pA/pF. Das Umkehrpotential der Zellen befand sich bei $-18,59 \pm 4,79$ mV (siehe Abbildungen 17-19).

4.2.3.2 Ersatz von NaCl durch NMDG-Glukonat

Der Wechsel von extrazellulärer NaCl-Lösung auf eine NMDG-Glukonatlösung führte zu keiner signifikanten Veränderung des Auswärtsstroms ($p = 0,219$), was vermutlich dem starken Beitrag von K^+ zum Gesamtstrom bei +100mV zuzurechnen ist. Der bei einem Potential von -120 mV gemessene Einwärtsstrom reduzierte sich hingegen auf einen Wert von $-15,82 \pm 12,36$ pA/pF ($p = 0,031$) (siehe Abbildungen 17-19). Das Umkehrpotential veränderte sich infolge des Ersatzes von NaCl durch NMDG-Glukonat signifikant auf $-40,39 \pm 6,28$ mV ($n = 7$; $p = 0,004$).

4.2.3.3 Leitfähigkeit von Ammonium

Analog zu den Experimenten mit Na-Glukonat in der Pipettenlösung wurde nun das in der extrazellulären Lösung enthaltene NMDG⁺ durch eine äquimolare Menge NH_4^+ ersetzt. Dieser

Lösungswechsel führte zu einer signifikanten Steigerung des Auswärtsstroms von $16,61 \pm 10,15$ pA/pF auf $39,13 \pm 18,54$ pA/pF ($n = 7$; $p = 0,016$) (siehe Abbildungen 17-19).

Durch einen gesteigerten Influx von NH_4^+ kam es ebenfalls zu einer signifikanten Zunahme des Einwärtsstroms von $-15,82 \pm 12,36$ pA/pF auf $-34,30 \pm 21,93$ pA/pF ($n = 7$; $p = 0,016$). Das Umkehrpotential der Zellen verschob sich dabei signifikant von $-40,39 \pm 6,28$ mV auf $4,21 \pm 2,21$ mV ($n = 7$; $p < 0,001$) (siehe Abbildungen 17-19).

4.2.3.4 Der extrazelluläre Einfluss divalenter Kationen (Mg^{2+} und Ca^{2+}) auf die Leitfähigkeit von NH_4^+

Wie zuvor wurde anschließend eine Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freie $137 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NH_4 -Glukonat appliziert. Durch den Entzug von Ca^{2+} und Mg^{2+} kam es zu keiner signifikanten Änderung des Auswärtsstroms ($p = 0,813$). Bei einem Potential von -120 mV war hingegen eine signifikante Zunahme des Einwärtsstroms von $-34,30 \pm 21,94$ pA/pF auf $-91,18 \pm 22,14$ pA/pF zu beobachten ($n = 7$; $p = 0,016$). Durch den Entzug von Ca^{2+} und Mg^{2+} in der extrazellulären Badlösung kam es in diesem Fall zu einer Depolarisation der Zellmembran (siehe Abbildungen 16-18). Das Umkehrpotential stieg von $4,21 \pm 2,38$ mV auf $13,01 \pm 1,12$ mV an ($n = 7$; $p = 0,021$). Auch dieses Ergebnis folgt aus der Goldman-Hodgkin-Katz Theorie (siehe Diskussion Kap. 5.2.2.5).

4.2.3.5 Washout

Um herauszufinden, ob es sich bei den gezeigten Ergebnissen um reversible Effekte handelt, wurden die Zellen im Anschluss wieder mit einer Ca^{2+} - und Mg^{2+} -haltigen NH_4 -Glukonatlösung umspült. Durch diesen Wechsel kam es zu keiner signifikanten Veränderung des Auswärtsstroms ($p = 0,938$). Der Einwärtsstrom sank hingegen signifikant von $-91,18 \pm 22,14$ pA/pF auf $-41,09 \pm 25,54$ pA/pF ($n = 7$; $p = 0,016$). Es bestand kein signifikanter Unterschied zu den Werten vor dem Entzug von Ca^{2+} und Mg^{2+} ($p = 1,0$). Das Umkehrpotential der Zellen sank durch die Rückführung in die Ca^{2+} und Mg^{2+} -haltige NH_4 -Glukonatlösung signifikant auf $7,40 \pm 1,86$ mV ($n = 7$; $p = 0,04$) (siehe Abbildungen 17-19). Auch in diesem Fall bestand ein signifikanter Unterschied der Umkehrpotentiale zu Beginn und zum Ende der Messung ($n = 7$, $p = 0,009$).

Wurden die Zellen nun nicht mehr mit einer NH_4 -Glukonatlösung, sondern wieder mit einer NMDG-Glukonatlösung umspült, kam es zu einer signifikanten Reduktion des auswärtsgerichteten Stroms auf $24,30 \pm 13,33$ pA/pF ($n = 7$; $p = 0,016$). Der Einwärtsstrom ging ebenfalls signifikant auf $-23,67 \pm 15,4$ pA/pF zurück ($n = 7$; $p = 0,016$). Das Umkehrpotential der Zellen sank derweil auf $-18,48 \pm 3,75$ mV, was signifikant über dem Wert zu Beginn der Messung in gleicher Lösung ist ($n = 7$; $p = 0,012$).

Die Rückführung zu den Standardbedingungen (NaCl) führte zu einer signifikanten Steigerung des Auswärtsstroms von $24,30 \pm 13,33$ pA/pF auf $35,77 \pm 19,79$ pA/pF ($n = 7$; $p = 0,016$). Auch der Einwärtsstrom stieg signifikant an und erreichte $-36,02 \pm 23,47$ pA/pF ($n = 7$; $p = 0,006$) (siehe Abbildungen 16-18). Damit lag der Auswärtsstrom signifikant höher als zu Versuchsbeginn ($p = 0,031$). Das Umkehrpotential blieb hingegen mit $-14,41 \pm 3,24$ mV auf dem im NMDG-Glukonat und zu Versuchsbeginn im NaCl beobachteten Niveau ($n = 7$; $p = 0,3$). Eine tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse befindet sich im Anhang (siehe Tabellen 26-28).

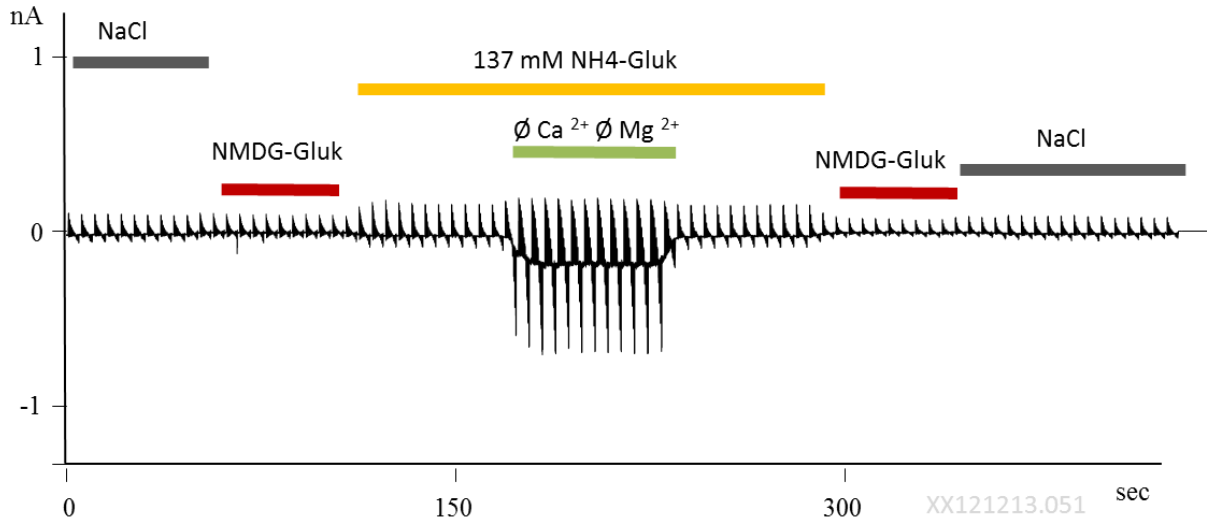


Abbildung 17: Darstellung einer Ganzzellableitung einer mit K-Glukonat gefüllten Zelle. Im Verlauf der Messung wurde zunächst extrazelluläres NaCl durch NMDG-Glukonat ersetzt, was zur Abnahme des ein- und auswärtsgerichteten Stroms führte. Der Wechsel zu einer NH₄-Glukonatlösung führte dagegen zu einer Steigerung des Einwärts- und Auswärtsstroms, die durch den Entzug von Ca²⁺ und Mg²⁺ nochmals gesteigert werden konnte. Der washout zeigt die Reversibilität dieser Effekte.

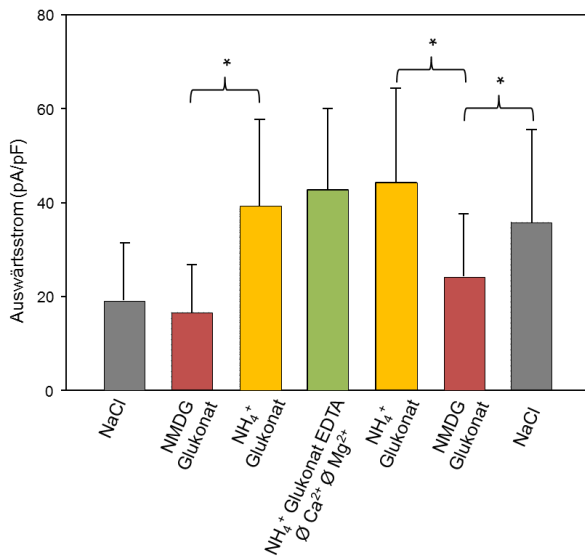
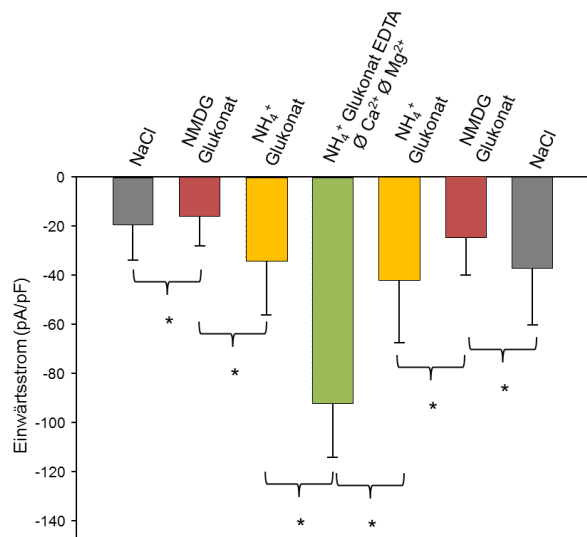


Abbildung 19: Zusammenfassende Darstellung der Einwärtsströme in pA/pF der mit K-Glukonat gefüllten Zellen (n = 7; Mittelwert und SEM; * mit p < 0,05)

Abbildung 18: Zusammenfassende Darstellung der Auswärtsströme in pA/pF der mit K-Glukonat gefüllten Zellen (n = 7; Mittelwert und SEM; * mit p < 0,05)



4.2.4 Vergleichende Betrachtung der Messungen mit Na-Glukonat und K-Glukonat

Bei der Betrachtung der beiden Messreihen mit jeweils identischen extrazellulären Lösungen, aber unterschiedlichen Pipettenlösungen tauchte die Frage auf, ob die Art der vorwiegend in der intrazellulären Lösung vorkommenden Kationen eine Auswirkung auf die Leitfähigkeit von NH_4^+ habe. Dieser Frage wird im Folgenden nachgegangen.

4.2.4.1 Leitfähigkeit für NH_4^+

Die während einer Exposition der Zellen in einer $137 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NH_4 -Glukonatlösung gemessenen Ströme hingen von der Pipettenlösung ab. Insbesondere der auswärtsgerichtete Strom der mit K-Glukonat gefüllten Zellen ($n = 7$) war signifikant höher als die Ströme der mit Na-Glukonat gefüllten Zellen ($n = 8$) („Einwärtsstrom (-120 mV)“: $p = 0,04$; „Auswärtsstrom (+100 mV)“: $p = 0,004$).

Die Umkehrpotentiale in $137 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NH_4 -Glukonatlösung waren bei mit K-Glukonat gefüllten Zellen signifikant kleiner als es bei den Zellen der Fall war, die mit Na-Glukonat gefüllt worden waren ($p = 0,007$).

Betrachtet man die durch die Zugabe von NH_4^+ induzierte Veränderung des Umkehrpotentials (ΔV), so besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Zellgruppen ($p = 0,90$).

4.2.4.2 Der Einfluss von Ca^{2+} und Mg^{2+} auf die Leitfähigkeit für NH_4^+

In einer Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freien NH_4 -Glukonatlösung waren die Ströme der mit K-Glukonat gefüllten Zellen analog zu den oben vorgestellten Befunden ebenso signifikant größer als die der mit Na-Glukonat gefüllten Zellen ($p = 0,014$). Die Umkehrpotentiale der mit K-Glukonat gefüllten Zellen waren signifikant kleiner als die der Na-Glukonat-Gruppe ($p < 0,001$). Die durch den Entzug der divalenten Kationen induzierte leichte Veränderung der Umkehrpotentiale (ΔV) der beiden Zellgruppen unterscheiden sich hingegen nicht signifikant voneinander ($p = 0,135$). Eine zusammenfassende tabellarische Darstellung der Patch-Ergebnisse befindet sich im Anhang (siehe Tabellen 26-28).

4.3 Mikroelektrodenenergebnisse

4.3.1 Elektrophysiologische Messungen mit „double-barreled“ Mikroelektroden

In Versuchen am Pansenepithel von Schafen konnte durch Messungen in der Ussing-Kammer gezeigt werden, dass neben NH_3 auch NH_4^+ über die Pansenwand absorbiert wird (Bödeker und Kemkowski 1996; Abdoun et al., 2005). Dabei kommt es bei einem pH-Wert von 6,4 zu einer Stimulation der Natriumresorption durch den Na^+/H^+ -Austauscher, vermutlich ausgelöst durch eine Ansäuerung der Zellen durch die Aufnahme der protonierten Form (NH_4^+) (Abdoun et al., 2005).

In einer ersten Untersuchungsreihe wurde diese Arbeitshypothese durch direkte Messungen des intrazellulären pH-Werts mittels ionenselektiver Mikroelektroden überprüft. Messungen wurden am Pansenepithel sowohl des Schafes als auch des Rindes durchgeführt. Auf der Grundlage der Kombination von Ussing-Kammer- und „double-barreled“ Mikroelektroden-technik besteht die Möglichkeit, zusätzlich zur transepithelialen Potentialdifferenz (PD_t) die apikale Potentialdifferenz (PD_a) zu bestimmen. Durch ein H^+ -selektives Ionophor, das sich in einer Kapillare der Mikroelektrode befand, konnte zusätzlich der intrazelluläre pH-Wert (pH_i) gemessen werden.

Zu Beginn einer jeden Messung wurde das in die Ussing-Kammer eingespannte Pansenepithel sowohl auf mukosaler wie auch serosaler Seite mit dem Standardpuffer (NaCl) pH 7,4 perfundiert. Damit war kein chemischer oder elektrischer Gradient vorhanden. Jedem Epithel wurde ausreichend Zeit (> 10 Minuten) zur Äquilibration gegeben. Im Verlauf der gesamten Messung wurde das Epithel auf der serosalen Seite mit dem Standardpuffer perfundiert, lediglich der mukosale Puffer wurde jeweils nach ca. 15 Minuten gewechselt. Als Messpunkt wurde jeweils die 10. Minute nach dem Lösungswechsel herangezogen. Die Messungen fanden unter den in Kap. 3.5.2 beschriebenen „open-circuit“ Bedingungen statt.

4.3.2 Messungen am Pansenepithel des Schafes

4.3.2.1 Der Einfluss von Ammoniak in Abhängigkeit vom mukosalen pH-Wert auf PD_t , PD_a und pH_i am Pansenepithel von Schafen

Aus früheren Studien ist bereits bekannt, dass das Pansenepithel durch die Applikation von NH_4^+ depolarisiert wird (Bödeker und Kemkowski 1996; Abdoun et al., 2005). Diese Beobachtung weist auf einen elektrogenen Transport von NH_4^+ über das Pansenepithel hin. Dank des Einsatzes ionenselektiver Mikroelektroden konnte im Rahmen einer kürzlich an unserem Institut durchgeführten Studie, bei der eine $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NH_4^+ -Lösung (pH 6,4) eingesetzt wurde, parallel zur Depolarisation des transepithelialen Potentials eine Depolarisation des apikalen Potentials (PD_a) beobachtet werden, das von $-17 \pm 3 \text{ mV}$ auf $-9,4 \pm 1 \text{ mV}$ anstieg ($N/n = 3/5$, $p < 0,05$), und dies bei gleichzeitiger signifikanter Ansäuerung des pH_i von $6,44 \pm 0,13$ auf $6,19 \pm 0,09$ ($N/n = 3/5$, $p < 0,05$) (Lu et al., 2014). Auch bei einem pH Wert von 7,4 kam es durch Exposition mit Ammonium zu einer signifikanten Veränderung des PD_t und PD_a ; die Effekte auf den pH_i blieben allerdings unterhalb des Signifikanzniveaus (Lu et al., 2014). Die Auswirkungen auf das apikale Potential nach Zugabe von $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NH_4^+ waren signifikant größer als jene auf das transepitheliale Potential.

Zu klären blieb im Rahmen der vorliegenden Dissertation, inwieweit auch geringere Konzentrationen von NH_4^+ eine Wirkung auf PD_t , PD_a und pH_i haben könnten. Zunächst wurde die verwendete Konzentration an NH_4^+ auf $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ reduziert. Durch den Wechsel auf eine $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NH_4^+ -Lösung (pH 6,4) kam es ebenfalls numerisch zu einer Depolarisation des transepithelialen (ΔPD_t $0,53 \pm 0,31 \text{ mV}$) und apikalen Potentials (ΔPD_a $1,24 \pm 0,03 \text{ mV}$) sowie zu einer Ansäuerung des Zytosols (ΔpH_i $0,10 \pm 0,06$) ($N/n = 3/3$), jedoch erreichten diese Änderungen keine signifikanten Ausmaße. Eine weitere Reduktion der NH_4^+ -Konzentration auf $<5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ führte zu keinen mittels Mikroelektrode messbaren Veränderungen (Lu et al., 2014).

4.3.2.2 Der Effekt von $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Verapamil auf den I_{sc} unter mukosaler $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NH_4^+ -Lösung am Pansen des Schafes

Verapamil wurde klinisch jahrzehntelang als Calciumantagonist eingesetzt. Mittlerweile ist bekannt, dass Verapamil auch eine Wirkung auf eine Reihe anderer Kationenkanäle hat. An vier ovinen Pansenepithelien wurde vor diesem Hintergrund die Wirkung von Verapamil auf den durch NH_4^+ induzierten Kurzschlussstrom untersucht.

Nach Zugabe von $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Verapamil zu einer $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ -haltigen NH_4^+ -Pufferlösung kam es zu einer signifikanten Abnahme des Kurzschlussstroms von $42,91 \pm 5,23 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ auf $32,18 \pm 5,02 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($\Delta I_{\text{sc}} -10,73 \pm 0,48 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ (N/n = 2/4; $p < 0,05$). Nach „washout“ erholte sich dieser Strom teilweise um $\Delta I_{\text{sc}} 2,45 \pm 0,69 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$, blieb jedoch signifikant unterhalb des vor der Zugabe des Verapamils gemessenen Kurzschlussstroms (N/n = 2/4; $p < 0,05$) (siehe Abbildung 20).

Bei weiteren Messungen am Pansenepithel von Schafen, bei denen lediglich eine Konzentration von $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Verapamil zugegeben wurde, kam es ebenfalls zu einer deutlichen Abnahme des transepithelialen Stroms, wobei diese mit $p = 0,055$ und N/n = 2/5 gerade oberhalb der Signifikanzgrenze verblieb. Die Abnahme des I_{sc} lag nach Zugabe bei $\Delta I_{\text{sc}} -2,92 \pm 0,94 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$. Der „washout“ führte paradoxerweise zu einer weiteren Abnahme des I_{sc} ($\Delta I_{\text{sc}} -2,79 \pm 1,86 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$) (eine tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse findet sich im Anhang (siehe Tabelle 10).

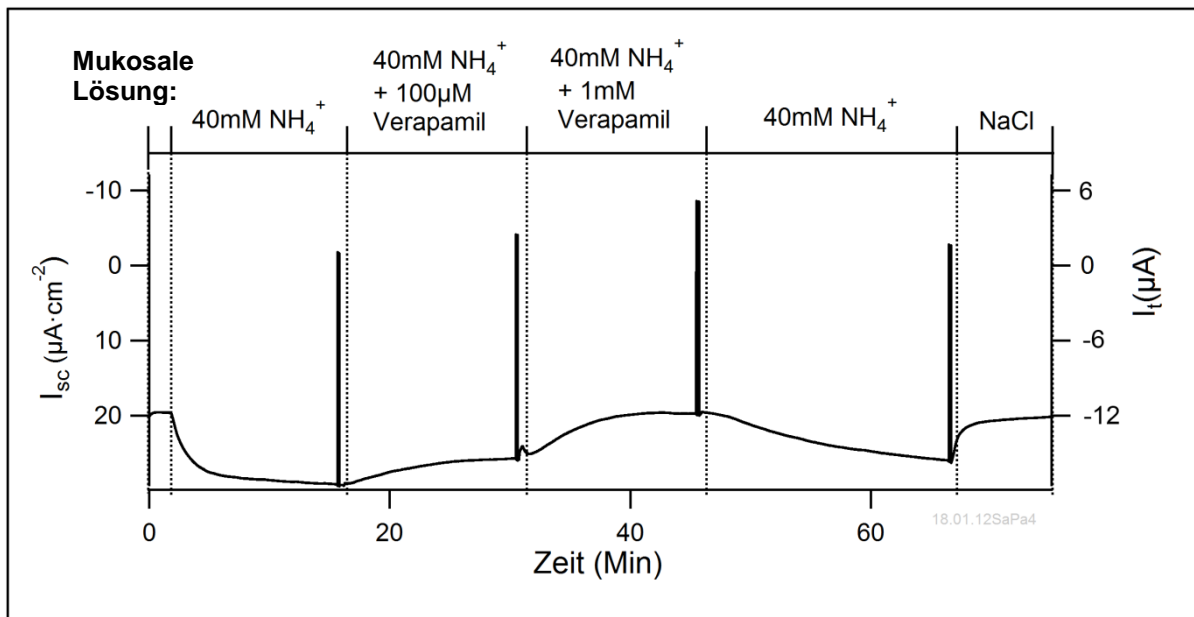


Abbildung 20: Darstellung des I_t und I_{sc} einer Originalmessung. Bei der Messung wurde der Klemmstrom I_t aufgezeichnet und im Rahmen der Auswertung in den I_{sc} umgerechnet (siehe Material und Methoden). Exemplarisch sind in der obigen Abbildung beide Einheiten dargestellt. Im weiteren Verlauf wird ausschließlich der I_{sc} in Betracht genommen. Der Wechsel zu einer $40 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NH}_4^+$ -Lösung führte zur deutlichen Steigerung des I_{sc} . Die Zugabe von $100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Verapamil führte zur deutlich sichtbaren Abnahme des I_{sc} , die bei einer Konzentration von $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ signifikant wurde. Ebenfalls sichtbar ist die Reversibilität dieses Effektes. Die Zacken vor jedem Lösungswechsel entsprechen der Reaktion des Epithels auf eine zur Messung der Leitfähigkeit durchgeführte Klemmung des Potentials auf $+10 \text{ mV}$ (serosale Lösung: NaCl Standardpuffer pH 7,4, Zusammensetzung siehe Anhang).

4.3.3 Messungen am Pansenepithel des Rindes

4.3.3.1 Der Einfluss von Ammoniak in Abhängigkeit vom mukosalen pH-Wert auf das transepitheliale Potential (PD_t)

Am Pansen des Rindes betrug das transepitheliale Potential unter Standardbedingungen $-0,11 \pm 0,46 \text{ mV}$ ($N/n = 6/12$). Das Absenken des pH-Wertes von 7,4 auf 6,4 führte zu keiner signifikanten Veränderung dieses Potentials (siehe Abbildung 21 und Abbildung 24).

Der mukosale Ersatz von $40 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NMDG}^+$ durch eine äquimolare Menge NH_4^+ (ebenfalls pH 6,4) führte dagegen zu einer signifikanten Depolarisation des transepithelialen Potentials

von $-0,10 \pm 0,42$ mV auf $2,68 \pm 0,74$ mV (ΔPD_t $2,78 \pm 0,37$ mV) (N/n = 6/12; $p < 0,05$). Eine anschließende Erhöhung des mukosalen pH-Wertes auf 7,4 in Anwesenheit von NH_4^+ ($40 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) hatte keine signifikante Auswirkung auf das PD_t (siehe Abbildung 21 und Abbildung 24). Erst ein Wechsel zurück zum ursprünglichen Standardpuffer (NH_4^+ -frei; pH 7,4) führte zu einem signifikanten Abfall der PD_t von $2,42 \pm 0,52$ mV auf $0,32 \pm 0,47$ mV (ΔPD_t $-2,1 \pm 0,16$ mV) (N/n = 6/12; $p < 0,05$).

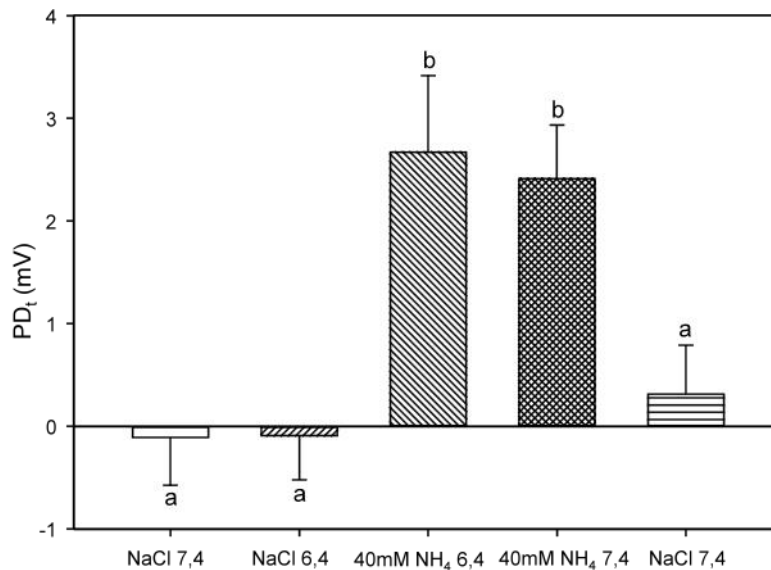


Abbildung 21: PD_t 10 Minuten nach Lösungswechsel (MW \pm SEM; a, b mit $p < 0,05$, N/n = 6/12)

4.3.3.2 Der Einfluss von Ammoniak auf die apikale Potentialdifferenz (PDA)

Wurde das Epithel beidseitig mit dem identischen Standardpuffer (pH 7,4) perfundiert, so lag zwischen der mukosalen Perfusionslösung und dem Intrazellularraum der Zelle eine Potentialdifferenz von $-13,92 \pm 2,10$ mV vor (siehe Abbildung 22 und Abbildung 24); das Innere der Zelle ist demzufolge im Verhältnis zur mukosalen Badlösung deutlich negativ geladen. Die Absenkung des mukosalen pH-Wertes der Standardpufferlösung von 7,4 auf 6,4 führte zu keiner signifikanten Veränderung der apikalen Potentialdifferenz.

Wie schon in den Versuchen zuvor, wurden anschließend wieder 40 mmol l^{-1} NMDG⁺ des Standardpuffers durch 40 mmol l^{-1} NH_4^+ ersetzt. Der pH-Wert wurde dabei auf 6,4 eingestellt. Dieser Lösungswechsel führte zu einer signifikanten Depolarisation der apikalen Potentialdifferenz von $-14,1 \pm 1,37$ mV auf $-11,97 \pm 1,34$ mV (ΔPD_a $2,45 \pm 0,64$ mV) (N/n = 6/12; $p < 0,05$) (siehe Abbildung 22 und Abbildung 24). Nach der Anhebung des mukosalen

pH-Wertes dieser 40 mmol l⁻¹ NH₄⁺-Lösung auf pH 7,4 wurde eine PD_a in Höhe von $-12,91 \pm 1,44$ mV gemessen. Dieser Wert ist um ΔPD_a $-1,25 \pm 0,43$ niedriger als der bei pH 6,4 gemessene ($p < 0,05$).

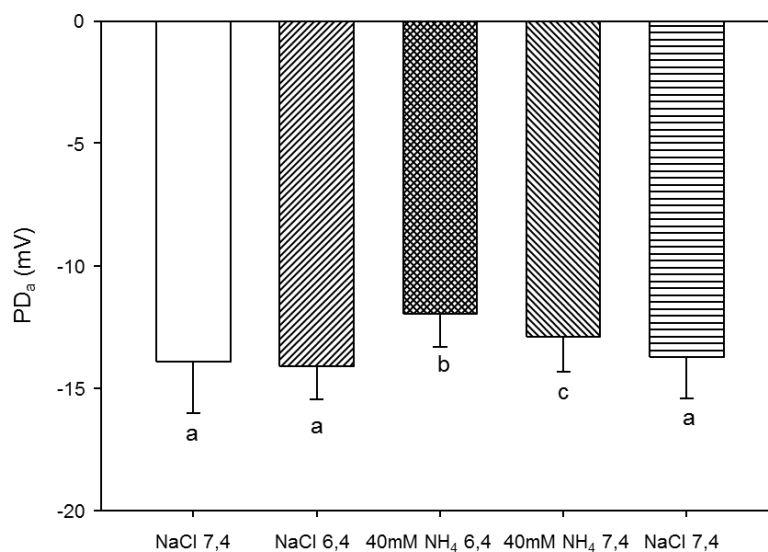


Abbildung 22: PD_a 10 Minuten nach Lösungswechsel (MW ± SEM; a, b, c mit $p < 0,05$, N/n = 6/12)

Der anschließend vollzogene Wechsel zurück zu den Standardbedingungen (beidseitig Standardpuffer pH 7,4) führte zu einer signifikanten Abnahme der PD_a auf $-13,74 \pm 1,67$ mV (N/n = 6/12; $p < 0,05$). Zwischen den zu Beginn und zum Ende der Messung unter Standardbedingungen gemessenen Werten der PD_a existierte kein signifikanter Unterschied; dies spricht für die Stabilität der Punktionen (siehe Abbildung 22 und Abbildung 24).

4.3.3.3 Der Einfluss von Ammoniak auf den intrazellulären pH-Wert

Unter Standardbedingungen (mukosal und serosal Standardpuffer mit pH 7,4) lag der pH_i bei $6,80 \pm 0,05$. Nach mukosaler Ansäuerung auf einen pH-Wert von 6,4 kam es zu einer signifikanten Ansäuerung des Intrazellulärraums auf $6,53 \pm 0,07$ ($p < 0,05$) (siehe Abbildung 23 und Abbildung 24). Dieser Abfall des pH_i von (ΔpH_i $-0,26 \pm 0,07$) könnte durch einen vermehrten Einstrom von H⁺-Ionen durch den nicht-selektiven Kationenkanal bedingt worden sein.

Wurden nun 40 mmol l⁻¹ NMDG⁺ durch eine äquimolare Menge NH₄⁺ ersetzt (pH 6,4), kam es zu einer signifikanten Veränderung des pH_i von $6,53 \pm 0,07$ auf $6,4 \pm 0,06$ (N/n = 6/12; $p <$

0,05; $\Delta\text{pH}_i -0,13 \pm 0,02$). Als nachfolgend der pH-Wert der $40 \text{ mmol l}^{-1} \text{ NH}_4^+$ -Lösung auf 7,4 angehoben wurde, kam es zu einer Alkalinisierung des pH_i von $6,4 \pm 0,06$ auf $6,63 \pm 0,05$ ($N/n = 6/12$; $p < 0,05$; $\Delta\text{pH}_i 0,23 \pm 0,07$). Nach Rückkehr zu den ursprünglichen Standardbedingungen stieg der pH_i von $6,63 \pm 0,05$ auf $6,81 \pm 0,07$ an ($N/n = 6/12$; $p < 0,05$; $\Delta\text{pH}_i 0,18 \pm 0,05$) (siehe Abbildung 23 und Abbildung 24). Die zu Beginn und zum Ende der Messung unter Standardbedingungen gemessenen Werte des pH_i unterschieden sich nicht ($p > 0,05$).

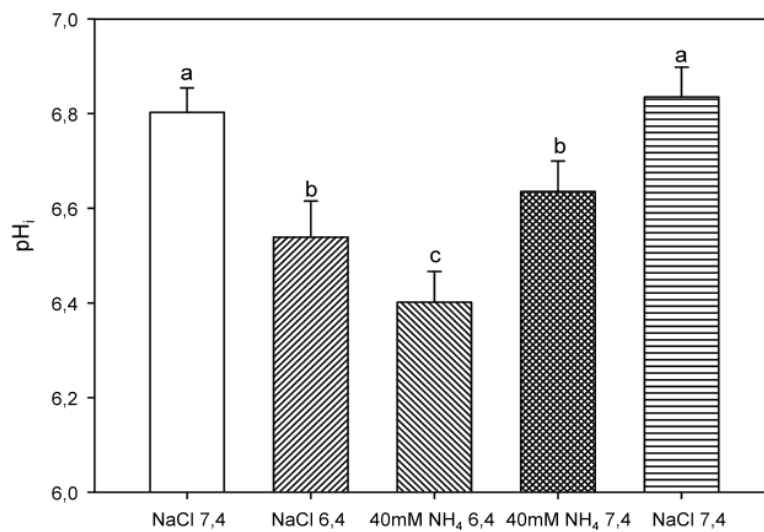


Abbildung 23: pH_i 10 Minuten nach Lösungswechsel (MW \pm SEM; a, b, c mit $p < 0,05$, $N/n = 6/12$)

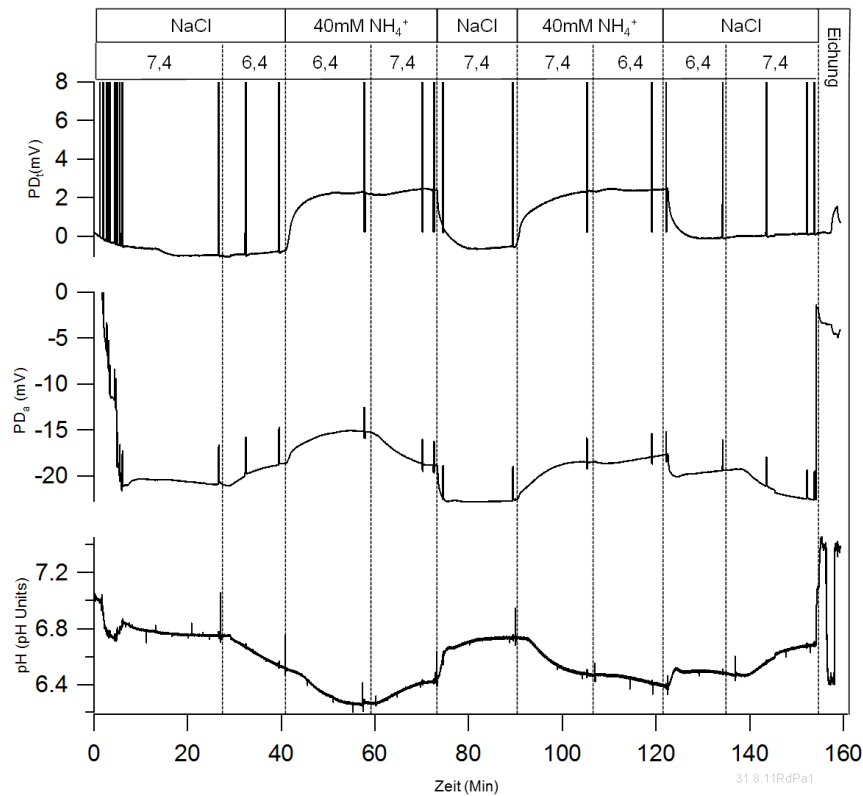


Abbildung 24: Darstellung einer Originalmessung. Abgebildet sind die transepitheliale und die apikale Potentialdifferenz sowie der intrazelluläre pH-Wert. Nach der Zugabe von $40 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NH}_4^+$ kommt es zu einer Depolarisation sowohl des apikalen als auch transepithelialen Potentials, außerdem zu einer Ansäuerung des Zytosols (serosale Lösung: NaCl Standardpuffer pH 7,4).

Bei der vergleichenden Betrachtung unserer Messdaten für 5 Minuten und 10 Minuten nach dem Lösungswechsel fällt auf, dass nach 5 Minuten die Depolarisation des apikalen Potentials (ΔPD_a) höher ausfällt als die Depolarisation des gesamten Epithels (ΔPD_t). Nach 10 Minuten war hingegen ΔPD_a deutlich kleiner als ΔPD_t . Der Grad der Ansäuerung nahm leicht ab (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Vergleichende Darstellung von ΔPD_t , ΔPD_a , ΔpH_i 5 und 10 Minuten nach Lösungswechsel

pH	5 Min. nach Lösungswechsel		10 Min. nach Lösungswechsel	
	pH 7,4	pH 6,4	pH 7,4	pH 6,4
ΔPD_t (mV): NaCl \rightarrow NH_4^+	$2,53 \pm 0,12$	$2,36 \pm 0,26$	$2,53 \pm 0,46$	$2,78 \pm 0,37$
ΔPD_a (mV): NaCl \rightarrow NH_4^+	$3,41 \pm 0,63$	$3,15 \pm 0,36$	$1,0 \pm 1,8$	$2,13 \pm 0,5$
ΔpH_i : NaCl \rightarrow NH_4^+	$-0,21 \pm 0,05$	$-0,18 \pm 0,03$	$-0,16 \pm 0,05$	$-0,13 \pm 0,02$

4.3.3.4 Der Einfluss von $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Ammoniak auf die Leitfähigkeit

Im Rahmen der durchgeführten Messungen wurde des Weiteren die Veränderung der Leitfähigkeit in Abhängigkeit von der mukosalen Pufferlösung analysiert. Durch den Ersatz von $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NMDG durch eine äquimolare Menge NH_4^+ (pH 6,4) kam es wie schon bei den Ussing-Kammer-Messungen zuvor zu keiner signifikanten Veränderung der Leitfähigkeit über das Pansenepithel (Kap.: 4.1.1). Wurde der pH-Wert der NH_4^+ -Lösung hingegen auf pH 7,4 angehoben, folgte daraus eine signifikante Steigerung der Leitfähigkeit von $6,13 \pm 0,81 \text{ mS}$ auf $6,82 \pm 0,7 \text{ mS}$ bzw. von $9,63 \pm 1,27 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$ auf $10,6 \pm 1,16 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$ (N/n = 6/12; $p = 0,019$).

4.3.3.5 Zusammenfassung der „double-barreled“ Mikroelektrodenenergebnisse

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es durch die mukosale Zugabe von $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Ammoniak zu einer signifikanten Depolarisation des transepithelialen wie auch apikalen Membranpotentials kommt. Der mukosale pH-Wert hatte dabei keinen signifikanten Einfluss auf das transepitheliale Potential, was gegen einen nennenswerten parazellulären Leitfähigkeit für Protonen spricht, denn immerhin herrschte unter diesen Versuchsbedingungen ein Protonengradient von $10 : 1$, entsprechend einem Nernstpotential von $-61,5 \text{ mV}$. Demgegenüber lag die apikale Potentialdifferenz bei pH 6,4 signifikant höher als bei pH 7,4. Die beobachtete Ansäuerung des Epithels spricht dafür, dass sowohl bei pH 6,4 als auch bei pH 7,4 der Transport von NH_4^+ gegenüber jenem von NH_3 überwiegt. Bei überwiegendem Influx von NH_3 hätte eine Alkalinisierung beobachtet werden müssen.

4.3.4 Elektrophysiologische Messungen mit konventionellen, einlumigen Mikroelektroden

Die nachfolgenden Untersuchungen wurden mit konventionellen, einlumigen Mikroelektroden durchgeführt. Ziel war es hierbei, Artefakte durch den zweiten Kanal bzw. das darin befindliche Ionophor sicher ausschließen zu können. Die Messungen wurden ebenfalls unter „open-circuit“-Bedingungen durchgeführt.

4.3.4.1 Der Effekt von $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NH}_4^+$ auf die apikale Potentialdifferenz in einer Na^+ -freien Lösung

Die vorangegangenen Messungen belegen die Depolarisation und Ansäuerung der Zellen durch NH_4^+ . Allerdings enthielten die verwendeten Pufferlösungen immer auch große Mengen ($\approx 100\text{mM}$) an Na^+ , weshalb eine Wechselwirkung mit Transportproteinen für dieses Ion nicht verlässlich ausgeschlossen werden konnte. An zwei weiteren Epithelien wurde aus diesem Grund exemplarisch die Wirkung von NH_4^+ auf das apikale Potential in einer Lösung untersucht, in der fast das gesamte Na^+ durch das große und folglich impermeable Kation NMDG^+ substituiert worden war.

Zu Beginn der Messung wurde das Epithel beidseits mit dem Standardpuffer umspült (mukosal pH 6,4; serosal pH 7,4). Im Anschluss an die erfolgreiche Punktion lag die apikale Potentialdifferenz bei $-9,14 \pm 5,6 \text{ mV}$ ($N/n = 1/2$). Mit dem Ersatz des im mukosalen Puffer enthaltenen Na^+ durch eine äquimolare Menge NMDG^+ kam es zu einer deutlichen Hyperpolarisation auf $-12,36 \pm 4,59 \text{ mV}$ (siehe Abbildung 25 und Abbildung 26).

Im nächsten Schritt wurden $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NMDG}^+$ durch eine äquimolare Menge NH_4^+ ersetzt. Dieser mukosale Lösungswechsel führte wie in Na^+ -haltigen Lösungen zur Depolarisation der apikalen Zellmembran auf $-7,64 \pm 4,45 \text{ mV}$. Beide Effekte waren durch die Rückkehr zur ursprünglichen Lösung reversibel (siehe Abbildung 25 und Abbildung 26).

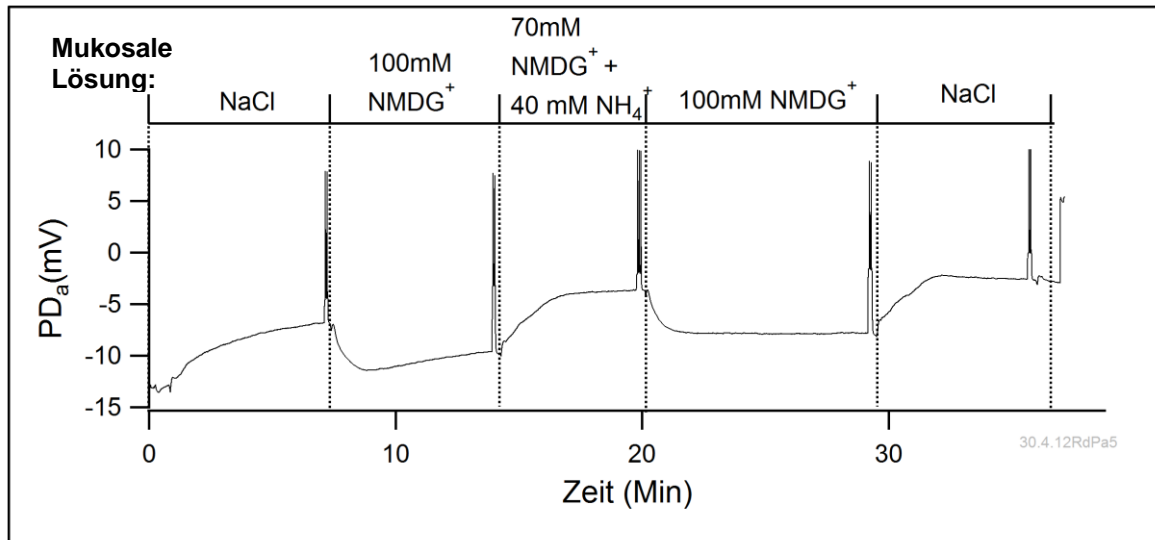


Abbildung 25: Die Originalmessung zeigt den Einfluss von NH_4^+ auf die apikale Potentialdifferenz (PD_a) in einer Na^+ -freien Lösung. Deutlich sichtbar kommt es durch den Entzug von Na^+ zu einer Hyperpolarisation der PD_a . Werden $40 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NMDG^+ durch eine äquimolare Menge NH_4^+ (70mM NMDG^+ 40 mM NH_4^+) ersetzt, folgt darauf eine Depolarisation der Zellen. Klar erkennbar ist auch die Reversibilität der Effekte nach dem washout (serosale Lösung: NaCl Standardpuffer pH 7,4, Zusammensetzung siehe Anhang).

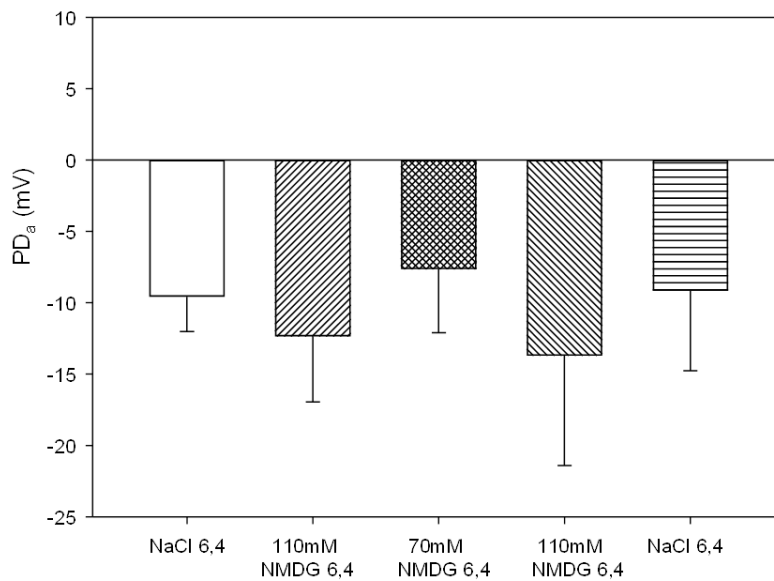


Abbildung 26: Vergleichende Darstellung der apikalen Potentialdifferenzen (Mittelwert und SEM, $N/n = 1/2$)

4.3.4.2 Der Ersatz von mukosalem Chlorid durch Glukonat und die Auswirkungen auf die PD_a

In den zuvor beschriebenen Patch-Clamp-Messungen fanden sich, in Analogie zu Beobachtungen am Pansenzellen des Schafes (Stumpff et al., 2009a), ebenso beim Rind klare Hinweise für die Expression von Anionenkanälen, die mittlerweile in einer parallelen Studie näher charakterisiert werden konnten (Georgi et al., 2013). Im Rahmen dieser Studie über den Ammoniumtransport stellte sich die Frage, auf welcher Seite des nativen Epithels die Kanäle exprimiert werden. Bei mukosaler Expression und entsprechender Interaktion mit Ammoniak wären, zumindest theoretisch, Wirkungen auf PD_t und PD_a ohne Aufnahme des Ammonium-Ions denkbar. In der folgenden Messreihe wurde daher die Lokalisation der Anionenkanäle am intakten Epithel geklärt.

Zu Beginn der Messung wurden beide Seiten des in die Ussing-Kammer gespannten Pansenepithels mit dem Standard-NaCl-Puffer (pH 7,4) umspült. Nach erfolgreicher Punktion konnte eine apikalen Potentialdifferenz von $-22,6 \pm 2,3$ mV gemessen werden (siehe Abbildung 27 und Tabelle 6). Der Wechsel zu einer Cl⁻-armen Glukonatlösung führte zu einer signifikanten Hyperpolarisation der apikalen Zellmembran auf $-33,5 \pm 2,35$ mV (N/n = 4/11; $p < 0,001$; $\Delta PD_a -10,9 \pm 1,07$ mV). Bei apikaler Expression eines Cl⁻-Kanals hätte der Entzug von mukosalem Chlorid entsprechend dem Abfall des Influxes von Cl⁻ zu einer Depolarisation führen müssen.

Nach Rückkehr zur Standard-NaCl-Lösung kam es zur signifikanten Depolarisation auf $-23,41 \pm 2,81$ mV (N/n = 4/11; $p < 0,05$; $\Delta PD_a 11,08 \pm 1,75$ mV). Zwischen dem Anfang und Ende der Messung war hingegen kein signifikanter Unterschied festzustellen ($\Delta PD_a 0,19 \pm 2,50$ mV) (siehe Abbildung 27 und Tabelle 6).

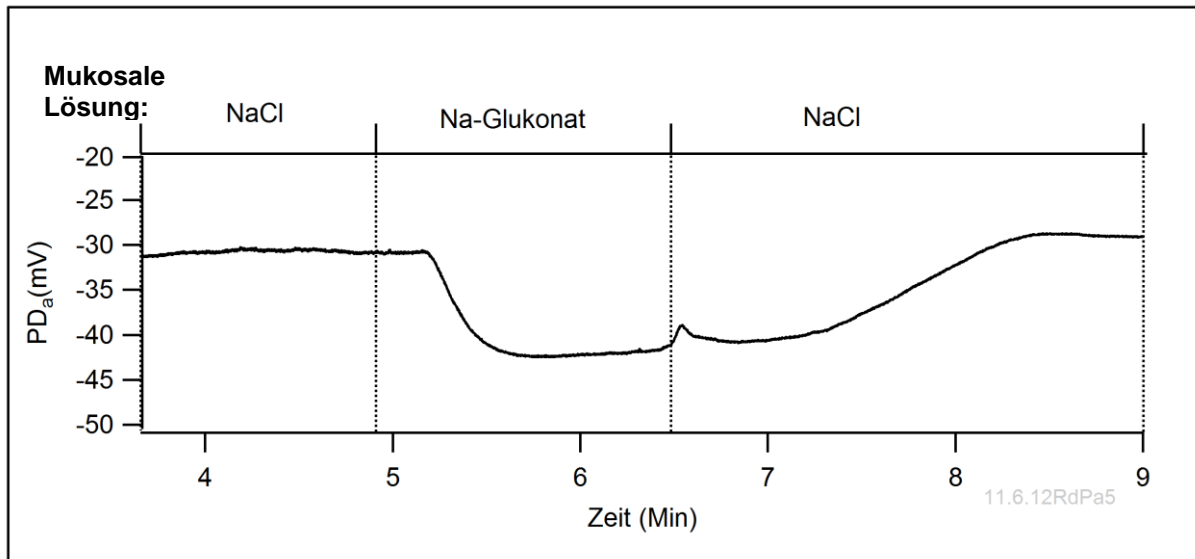


Abbildung 27: Die Originalmessung zeigt die Hyperpolarisation der PD_a nach dem Ersetzen von Cl⁻ durch Glukonat in der mukosalen Perfusionslösung (serosale Lösung: NaCl Standardpuffer pH 7,4).

Tabelle 6: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Messungen mit Na-Glukonat

Nr.	Lösung	PD _a (mV)						normal verteilt	p vs 1	p vs 3
		n	MW	SEM	Median	25 %	75 %			
1	NaCl	11	-22,60	2,30	-23,95	-29,04	-14,63	nein		n. s.
2	Na-Glukonat	11	-33,50	2,35	-32,27	-39,42	-25,76		< 0,05	< 0,05
3	NaCl (w)	11	-22,41	2,81	-24,13	-28,77	-20,12		n. s.	

4.3.5 Elektrophysiologische Messungen ohne den Einsatz von Mikroelektroden

Die Untersuchung von Epithelien mit ionenselektiven Mikroelektroden gestaltet sich als sehr zeitaufwendig und störungsanfällig. Es ist so, dass nicht selten an einem Versuchstag keine einzige erfolgreiche Messung mit stabiler Punktion gelingt. Angesichts des Umstandes, dass die bisherigen Ergebnisse recht eindeutig den transzellulären Transport des Ammonium-Ions belegen und zudem eine Wirkung von Kanalblockern oder Modulatoren auf den parazellulären Weg als unwahrscheinlich erscheint, wurde bei der weiteren Charakterisierung der Leitfähigkeit auf eine Punktion verzichtet. Es wurde lediglich der Strom über das gesamte Epithel als Messgröße herangezogen.

Analog zum bereits beschriebenen Vorgehen wurde dem Epithel zuvor eine Äquilibrierungszeit unter „open-circuit“-Bedingungen eingeräumt. Anschließend wurde

jedoch in Analogie zu konventionellen Ussing-Kammer-Messungen das Epithel auf 0 mV geklemmt (voltage clamp); als Messgröße wurde der zugehörige Klemmstrom beobachtet, der bei der Auswertung der Daten in den I_{sc} umgerechnet wurde (siehe Kap. 3.5.2). Als Datenpunkte wurden gewählt: Jeweils der letzte Minutenwert vor Lösungswechsel bzw. Zugabe einer Substanz als Ausgangswert und jeweils der Wert 10 Minuten nach Lösungswechsel bzw. Applikation der Testsubstanz und 10 Minuten nach Beginn des washout. Stets befand sich der Standardpuffer (pH 7.4) auf der serosalen Seite.

4.3.5.1 Der Einfluss von $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NH}_4^+$ auf den Kurzschlussstrom

Zu Beginn befand sich in diesem Versuchsansatz auf der mukosalen Seite der NaCl-Standardpuffer bei pH 6,4. Wurde auf der mukosalen Epithelseite nun $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NMDG}^+$ durch eine äquimolare Menge NH_4^+ ersetzt, führte dies zu einer signifikanten Zunahme des Klemmstroms von $2,43 \pm 2,28 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ auf $25,73 \pm 2,14 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($N/n = 15/37$; $p < 0,05$) (siehe Tabelle 7 und Abbildung 28). Diese Steigerung von ΔI_{sc} $23,30 \pm 1,63 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ entspricht in etwa den entsprechenden Beobachtungen beim Schafpanen (Bödeker und Kemkowski 1996; Abdoun et al., 2005).

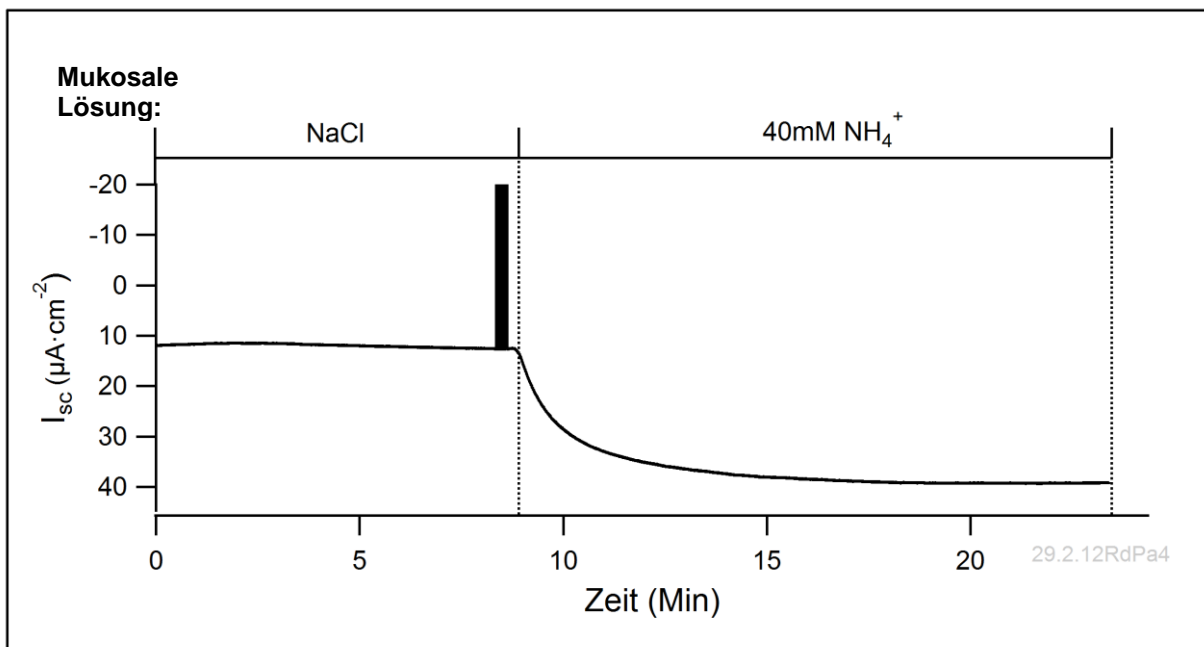


Abbildung 28: Die Originalmessung zeigt die signifikante Steigerung des transepithelialen Stroms durch den Ersatz von $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NMDG}^+$ durch eine äquimolare Menge NH_4^+ (serosale Lösung: NaCl Standardpuffer pH 7,4).

Tabelle 7: Vergleichende tabellarische Darstellung des I_{sc}

Nr.	Lösung	I_{sc} ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$)						normal verteilt	p vs 1	p vs 3
		n	MW	SEM	Median	25 %	75 %			
1	NaCl	37	2,43	2,28	3,60	-2,40	11,48	nein		n. s.
2	40mM NH_4^+	37	25,73	2,14	22,32	16,76	34,23		< 0,05	< 0,05
3	NaCl (w)	35	2,68	1,95	5,19	-2,27	9,03		n. s.	

4.3.5.2 Der Einfluss von NH_4^+ auf den Kurzschlussstrom bei einer Na^+ -freien Lösung

In weiteren Versuchen kam ein Na^+ -freier Puffer zum Einsatz, wobei die im mukosalen Standardpuffer enthaltenen $70 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ Na}^+$ durch eine äquimolare Menge an NMDG^+ ersetzt wurden. Als Messpunkte wurden erneut der letzte Minutenwert vor dem Lösungswechsel, 10 Minuten nach dem Lösungswechsel sowie 10 Minuten nach Beginn des washout gewählt.

Zu Beginn der Versuche befand sich auf der mukosalen Epithelseite der Na^+ -freie und NH_4^+ -freie Puffer (pH 6,4), sowie auf der serosalen Seite der Standardpuffer (pH 7,4). Der dabei gemessene transepitheliale Strom lag bei $-20,84 \pm 7,42 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ ($N/n = 4/12$) (siehe Abbildung 29 und Tabelle 8).

Der Ersatz von $40 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NMDG}^+$ durch eine äquimolare Menge NH_4^+ im mukosalen Puffer führte entsprechend einer vermehrten Resorption von Kationen zu einem signifikanten Anstieg des Kurzschlussstroms auf $7,51 \pm 6,64 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ ($N/n = 4/11$; $p < 0,001$; $\Delta I_{sc} 29,37 \pm 2,93 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$). Nach Rückkehr zur Na^+ -freien wie auch NH_4^+ -freien Lösung stellte sich eine signifikante Abnahme des I_{sc} von $7,58 \pm 6,63 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ auf $-15,49 \pm 7,52 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ ($n = 4/10$; $p < 0,001$) ein. Dieser Wert entspricht dem Wert zu Beginn der Messung ($p = 0,14$) (siehe Abbildung 29 und Tabelle 8).

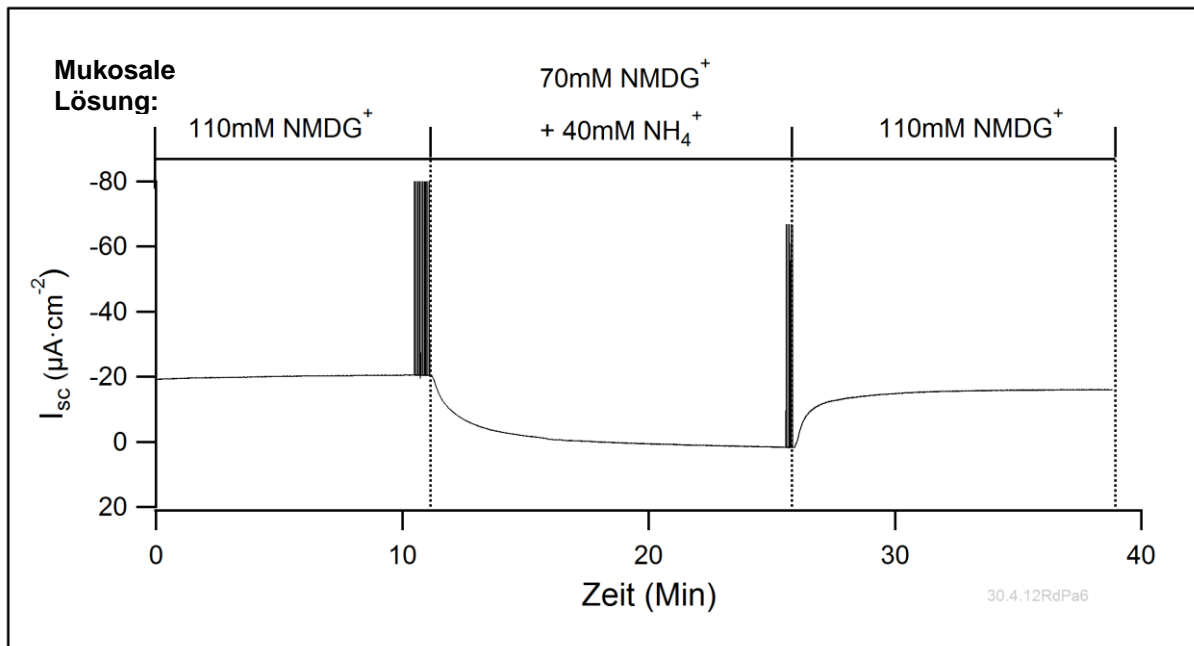


Abbildung 29: Die Originalmessung zeigt die signifikante Steigerung des transepithelialen Stroms nach Ersatz von $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NMDG⁺ durch eine äquimolare Menge NH₄⁺ (serosale Lösung: NaCl Standardpuffer pH 7,4).

Tabelle 8: Tabellarische Zusammenfassung der Kurzschlussströme über das Pansenepithel

Nr.	Lösung	I _{sc} (µA · cm ⁻²)						normal verteilt	p vs 1	p vs 3
		n	MW	SEM	Median	25 %	75 %			
1	110mM NMDG	12	-20,84	7,42	-23,10	-35,77	-9,45	ja		0,137
2	70mM NMDG 40mM NH ₄ ⁺	11	7,51	6,64	2,70	-6,44	14,17		< 0,001	< 0,001
3	110mM NMDG (w)	10	-15,49	7,53	-16,90	-32,38	-8,38		0,137	

4.3.5.3 Der Entzug von Mg²⁺ und Ca²⁺ (Einsatz von Na⁺-freier, 40 mmol·l⁻¹ NH₄⁺-Lösung)

Durch frühere Experimente konnte gezeigt werden, dass divalente Kationen wie Ca²⁺ und Mg²⁺ einen Einfluss auf die Leitfähigkeit von Kationen wie z. B. Na⁺ über das Pansen- und Pansenepithel des Schafes haben (Schultheiss und Martens 1999; Leonhard-Marek et al., 2005). Nachdem in dieser Arbeit eine Steigerung der Ammoniumleitfähigkeit durch den Entzug von divalenten Kationen über die Membran isolierter Pansenepithelzellen des Rindes

festgestellt werden konnte (Kap. 4.2), sollte im Weiteren nun untersucht werden, ob sich ähnliche Effekte auch am intakten Epithel nachweisen lassen.

Der mukosale Entzug von Ca^{2+} und Mg^{2+} aus einer Na^+ -freien $40 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NH}_4^+$ -Lösung führte zu einem signifikanten Anstieg des I_{sc} von $16,18 \pm 13,34 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ auf $26,35 \pm 15,28 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ ($\Delta I_{\text{sc}} 6,0 \pm 1,7 \mu\text{A}$ (N/n = 3/4-5; $p = 0,005$). Der gezeigte Effekt war reversibel. Der I_{sc} lag 10 Minuten nach Beginn des washout bei $19,36 \pm 12,29 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ (siehe Abbildung 30 und Tabelle 9). Somit lag kein signifikanter Unterschied zu dem zu Beginn der Messung bestimmten Kurzschlussstrom bei gleichen Lösungen vor.

Tabelle 9: Tabellarische Zusammenfassung der Kurzschlussströme über das Pansenepithel

Nr.	Lösung	$I_{\text{sc}} (\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2})$						normal verteilt	p vs 1	p vs 3
		n	MW	SEM	Median	25 %	75 %			
1	70mM NMDG 40mM NH_4^+	5	16,18	13,35	12,97	-1,26	27,30	ja		0,108
2	70mM NMDG 40mM NH_4^+ EDTA	4	26,35	15,28	17,10	7,92	44,77		0,005	0,016
3	70mM NMDG 40mM NH_4^+ (w)	5	19,36	12,30	14,45	3,69	28,08		0,108	

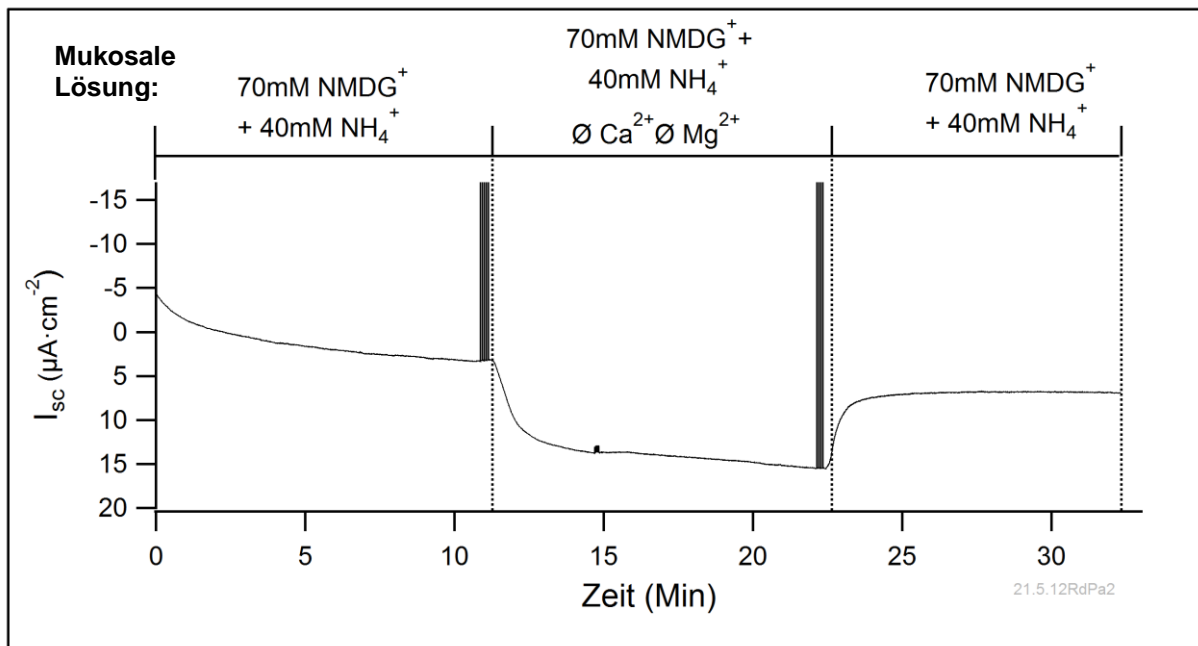


Abbildung 30: Die Originalmessung zeigt die signifikante Steigerung des transepithelialen Stroms nach dem Entzug der divalenten Kationen (serosale Lösung: NaCl Standardpuffer pH 7,4).

4.3.5.4 Der Effekt von Gadolinium (Gd^{3+}) und Lanthan (La^{3+}) auf den Kurzschlussstrom unter mukosaler $40 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NH}_4^+$ -Lösung

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der NH_4^+ -induzierte Kurzschlussstrom durch die zweiwertigen Ionen Ca^{2+} und Mg^{2+} beeinflusst wird, sollte folgend der Einfluss von dreiwertigen Kationen Gadolinium (Gd^{3+}) und Lanthan (La^{3+}) auf den Kurzschlussstrom untersucht werden.

Die mukosale Zugabe von $2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Gadolinium oder $2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Lanthan resultierte in einer transienten, aber sehr schnellen und deutlichen Hemmung des transepithelialen Stroms (siehe Abbildung 31 und Abbildung 32). Vor dem Hintergrund, dass es beim Einsatz der Substanzen zu einer Geruchsbelästigung kam und mögliche gesundheitliche Schäden nicht gänzlich ausgeschlossen werden konnten, wurden lediglich exemplarische Messungen durchgeführt. Dargestellt sind in den Abbildungen 31 und 32 zwei Originalmessungen, die den deutlichen Effekt auf den NH_4^+ induzierten I_{sc} belegen. Von besonderem Interesse ist die transiente Wirkung der Blocker auf den Strom, die für eine aktive Regulation des Epithels spricht.

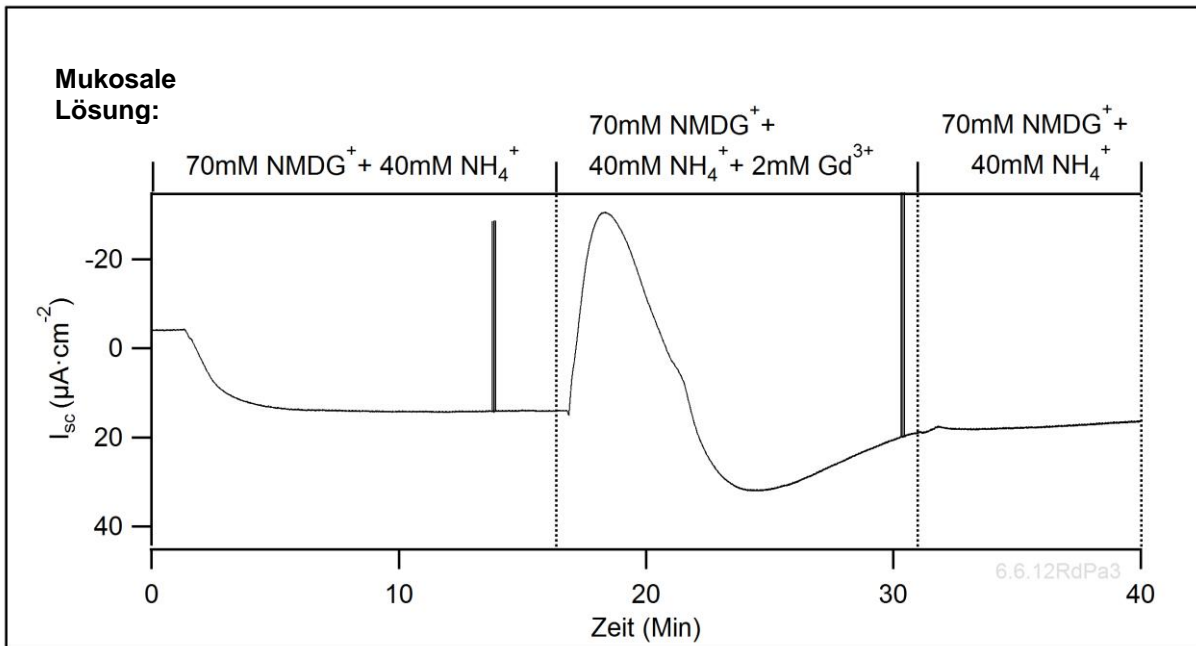


Abbildung 31: Originalmessung mit dem hemmenden Effekt von Gadolinium auf den NH₄⁺-induzierten Kurzschlussstrom (serosale Lösung: NaCl Standardpuffer pH 7,4).

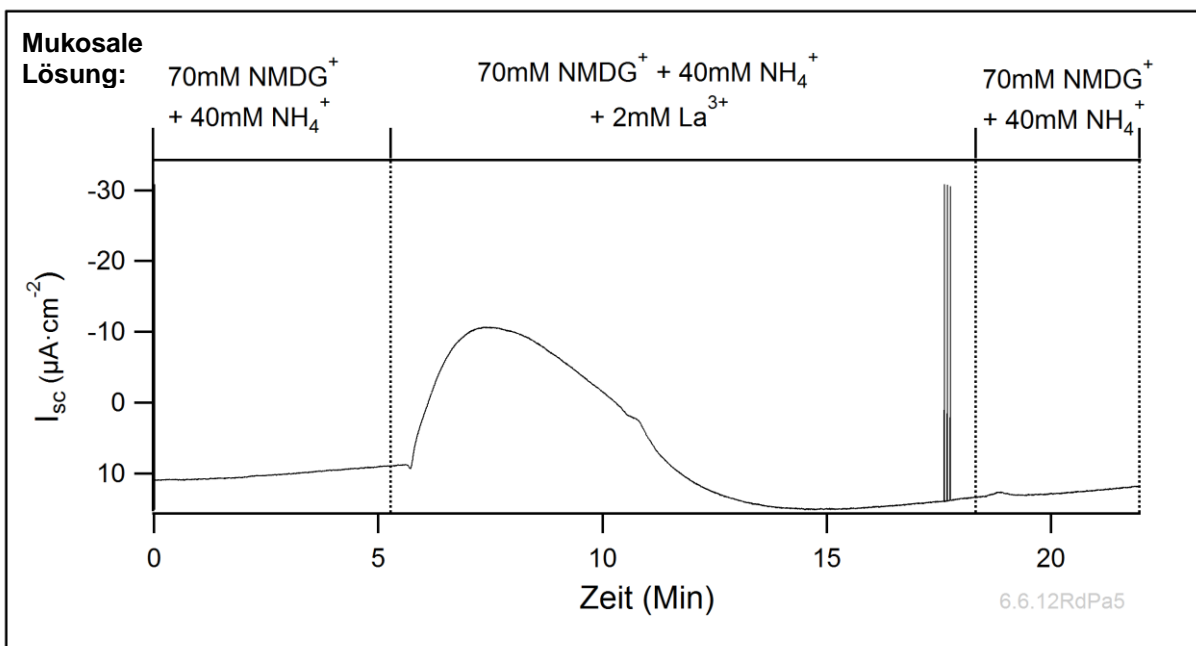


Abbildung 32: Originalmessung mit dem hemmenden Effekt von Lanthan auf den NH₄⁺-induzierten Kurzschlussstrom (serosale Lösung: NaCl Standardpuffer pH 7,4).

4.3.5.5 Der Effekt von $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Verapamil auf den Kurzschlussstrom unter mukosaler $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NH}_4^+$ -Lösung

Im Vorangegangenen wurde bereits dargelegt, dass Verapamil eine blockierende Wirkung auf diverse Kationenkanäle besitzt. Ferner wurde am Pansenepithel des Schafs im Rahmen der vorliegenden Dissertation eine Wirkung auf den durch NH_4^+ induzierten Strom beobachtet.

Auch am Pansenepithel des Rindes konnte nach Zugabe von $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Verapamil eine signifikante Veränderung des NH_4^+ -induzierten Kurzschlussstromes beobachtet werden, der sich innerhalb von 10 Minuten nach Applikation von Verapamil von $21,22 \pm 1,68 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ auf $16,73 \pm 1,53 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ veränderte ($N/n = 3/7$; $p = 0,007$; $\Delta I_{\text{sc}} -4,49 \pm 0,93 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$) – im Sinne eines Blocks von NH_4^+ -leitenden Kationenkanälen. Dieses Ergebnis spricht erneut gegen eine ausschließlich parazelluläre Leitfähigkeit.

10 Minuten nach dem Beginn des washout hatte sich der Kurzschlussstrom in etwa auf den ursprünglichen Wert zum Zeitpunkt vor der Applikation von Verapamil eingestellt ($20,51 \pm 1,83 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($N/n = 3/7$; $p = 0,008$; $\Delta I_{\text{sc}} 3,78 \pm 1,51 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$) (siehe Abbildung 33 und Tabelle 10).

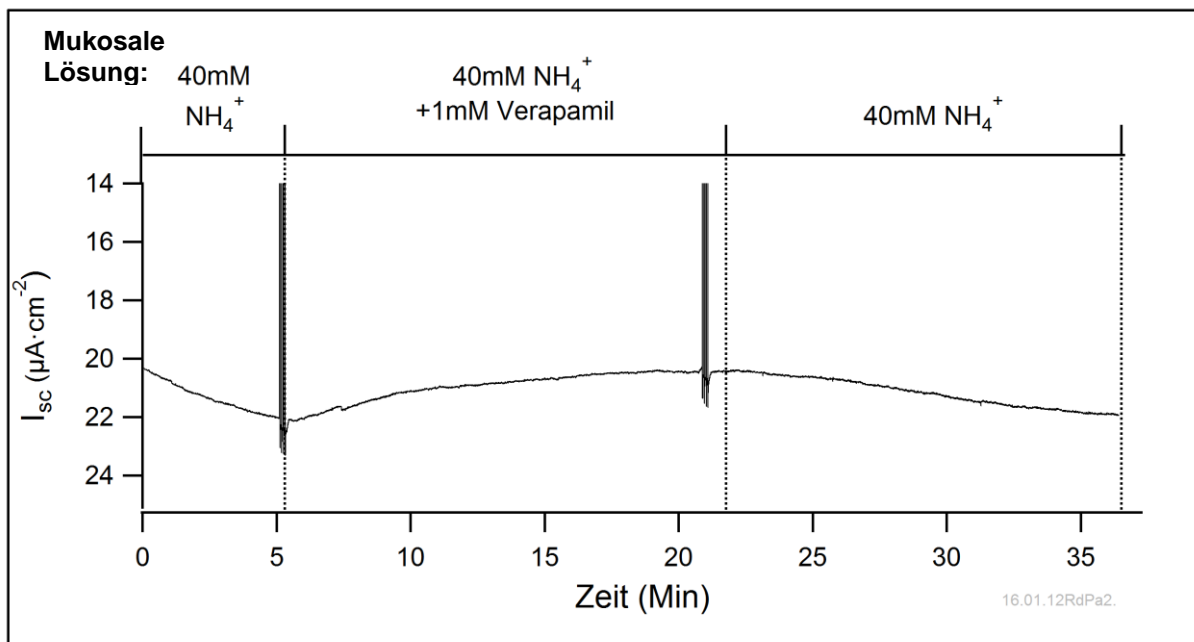


Abbildung 33: Originalmessung, bei der zu einer mukosalen $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NH}_4^+$ -Lösung $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Verapamil zugegeben wurde. Deutlich erkennbar ist der hemmende Effekt von Verapamil auf den NH_4^+ -induzierten Strom. Die Rückführung zu Verapamil-freier Lösung führte zu einer erneuten Zunahme des I_{sc} (serosale Lösung: NaCl Standardpuffer pH 7,4).

Tabelle 10: Tabellarische Darstellung der Messungen mit Verapamil

Nr.	Lösung	I_{sc} ($\mu A \cdot cm^{-2}$)						normal verteilt	p vs 1	p vs 3
		n	MW	SEM	Median	25 %	75 %			
1	40mM NH_4^+	7	21,22	1,68	21,24	17,25	24,09	ja		0,557
2	40mM NH_4^+ + 1mM Verapamil	7	16,73	1,53	16,03	13,13	20,35		0,007	0,008
3	40mM NH_4^+ (w)	7	20,51	1,83	21,49	16,25	23,24		0,557	

4.3.5.6 Der Effekt von Rutheniumrot auf den Kurzschlussstrom

Drei Epithelien wurden auf eine mögliche Wirkung von Rutheniumrot hin untersucht. Es zeigte sich eine sehr deutliche irreversible Rotfärbung der Hornschicht. Eine Wirkung auf den transepithelialen Strom konnte nicht beobachtet werden. Unklar blieb, ob eine Permeation bis zu den transportierenden Zellen des *Stratum granulosum* stattgefunden hatte.

Zusammenfassung:

Mit Hilfe der durchgeführten elektrophysiologischen Messungen konnte gezeigt werden, dass NH_4^+ auf elektrogenem Weg über das Epithel transportiert wird. Die schon für Na^+ am Vormagensystem des Schafs dargelegte Beeinflussung durch divalente Kationen (Ca^{2+} und Mg^{2+}) konnte ebenso am Pansen des Rindes in Bezug auf den Transport von NH_4^+ beobachtet werden. Infolge des Entzugs von Ca^{2+} und Mg^{2+} kam es zu einer signifikanten Steigerung sowohl der NH_4^+ -induzierten Ströme über die Zellmembran isolierter Zellen des Pansenepithels als auch des NH_4^+ -induzierten Kurzschlussstroms über das intakte Epithel.

Bei Messungen, bei denen der Effekt von Verapamil auf den NH_4^+ -induzierten Kurzschlussstrom untersucht wurde, konnte gleichermaßen ein hemmender Effekt auf den I_{sc} nachgewiesen werden. Auf der Basis von diesen Ergebnissen lässt sich die Hypothese aufstellen, dass NH_4^+ über die gleichen nicht-selektiven Kationenkanäle transportiert wird, die auch für die elektrogene Aufnahme von Na^+ aus den Vormägen verantwortlich gemacht werden (Schultheiß 1995; Schultheiss und Martens 1999; Leonhard-Marek 2002; Brinkmann 2007).

4.3.6 Untersuchung der Auswirkungen von verschiedenen Substanzen auf die Leitfähigkeit von Kationen über das Pansenepithel des Rindes

Typisch für einige Vertreter der TRP-Kanalfamilie ist eine Sensitivität gegenüber bestimmten geschmacks- und geruchsintensiven Substanzen wie z.B. Capsaicin, Menthol oder Senföl. In einer weiteren Versuchsreihe wurden aus diesem Grund verschiedene solcher TRP-Modulatoren eingesetzt.

Als serosaler Puffer wurde über die gesamte Messdauer hinweg der Standardpuffer (pH 7,4) eingesetzt. Die Messungen wurden wie schon bei den vorherigen mit einer Äquilibrationszeit unter Standardbedingungen begonnen. Anschließend wurde mukosal der pH auf 6,4 abgesenkt und auf einen $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NH}_4^+$ -Puffer (pH 6,4) gewechselt. Die Testsubstanz wurde nach ca. 10 Minuten in den Vorratsbehälter pipettiert, wobei die während der Messung kontinuierlich ablaufende Perfusion nicht unterbrochen wurde. Ein Umschalten auf einen anderen Lösungskanal entfiel und ein Lösungswechselartefakt aufgrund von Druckschwankung kann mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Nach einer Zeit von ca. 10 Minuten wurde auf den ursprünglichen Puffer (ohne Substanz) zurückgewechselt, um die Möglichkeit eines washout zu überprüfen. Als Messparameter wurde jeweils die maximale Auslenkung des I_{sc} nach Gabe der Testsubstanz erfasst.

4.3.6.1 Der Effekt von Menthol auf den NH_4^+ -induzierten Strom

Menthol ist ein natürlicher Bestandteil der Pfefferminzpflanze, kann aber ebenso synthetisch hergestellt werden. Es ist für einen kühlenden Effekt bei Berührung oder Inhalation bekannt und gilt als Modulator der Kanäle TRPA1, TRPM8 wie auch TRPV3 (Macpherson et al., 2006; Vriens et al., 2008).

Die Zugabe von $200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Menthol führte zu einer transienten, signifikanten Zunahme des I_{sc} in $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NH}_4^+$ -Puffer von $30,99 \pm 3,70 \text{ }\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ auf einen Spitzenwert in Höhe von $36,34 \pm 3,66 \text{ }\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($N/n = 4/11$; $p = 0,006$). Die Zugabe von $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ bewirkte eine Zunahme von $24,20 \pm 4,51 \text{ }\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ auf maximal $28,73 \pm 4,83 \text{ }\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($N/n = 3/12$; $p = 0,002$). Dies entsprach einem Anstieg von ΔI_{sc} $5,35 \pm 0,97 \text{ }\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) bzw. ΔI_{sc} $4,53 \pm 0,94 \text{ }\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Wie in der unten dargestellten Originalmessung deutlich sichtbar wird, trat ein transienter Effekt auf. Auf die zunächst stattfindende Steigerung des

transepithelialen Stroms folgte eine Abnahme auf das Ausgangsniveau oder sogar auf einen Wert darunter (siehe Abbildung 33 und Abbildung 34). Dabei wurde 10 Minuten nach Beginn des washout ein Kurzschlussstrom von $26,41 \pm 2,71 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ gemessen ($200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Menthol). Die Differenz gegenüber dem Messwert vor Zugabe von Menthol betrug $\Delta I_{\text{sc}} -9,92 \pm 2,25 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($N/n = 4/11$; $p = 0,016$). Nach der Zugabe von $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Menthol wurde 10 Minuten im Anschluss an den Beginn des washout mit $20,88 \pm 3,68 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ein um $\Delta I_{\text{sc}} -7,84 \pm 2,42 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($n = 3/12$; $p = 0,085$) geringerer I_{sc} als zum Zeitpunkt vor der Zugabe gemessen (siehe Abbildung 34 und Abbildung 35 und Tabelle 11).

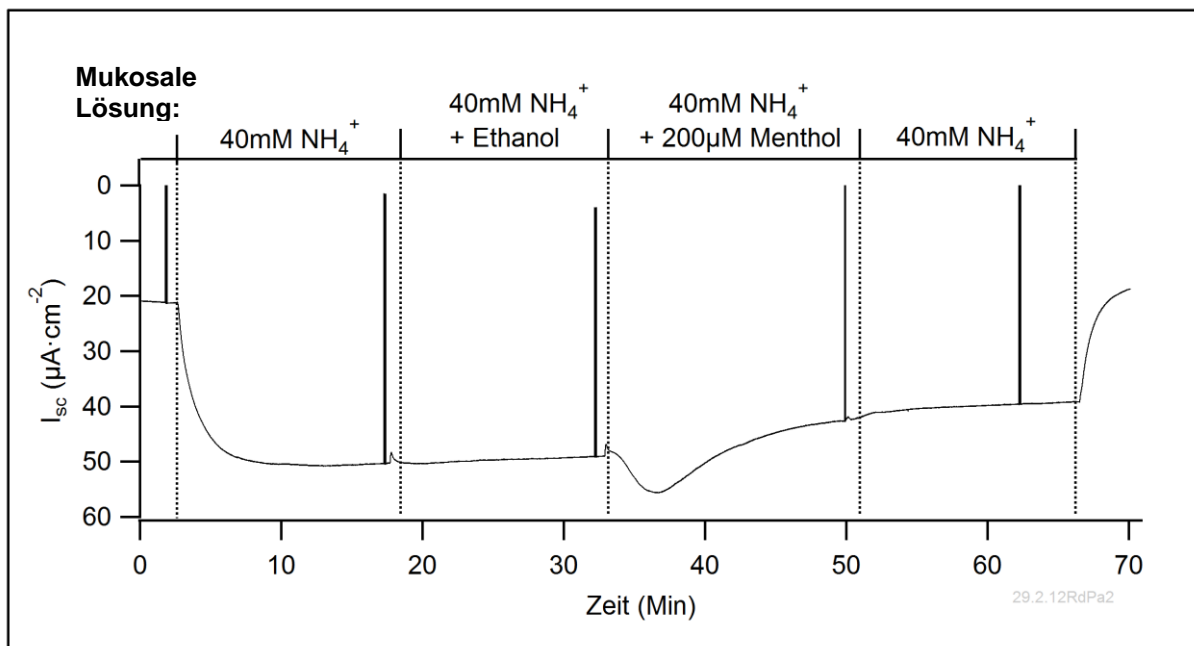


Abbildung 34: Originalmessung, bei der die Zugabe von $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Menthol zu einer transienten Steigerung des transepithelialen Stroms führte. Die ausschließliche Zugabe des Lösungsmittels (Ethanol) hatte hingegen keinen Effekt ($N/n = 3/6$) (serosale Lösung: NaCl Standardpuffer pH 7,4).

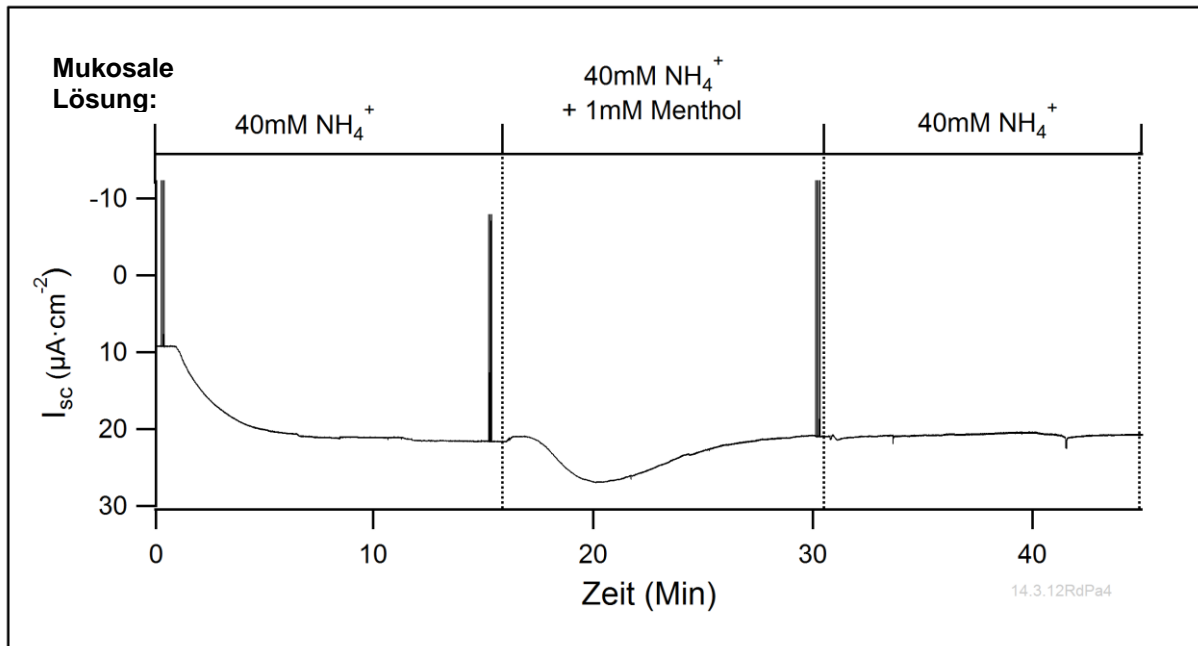


Abbildung 35: Originalmessungen, bei der die transiente Steigerung des transepithelialen Stroms nach der Zugabe von $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Menthol. deutlich sichtbar wird (serosale Lösung: NaCl Standardpuffer pH 7,4).

Tabelle 11: Vergleichende Darstellung des I_{sc}

Nr.	Lösung	I_{sc} ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$)						normal verteilt	p vs 1	p vs 3
		n	MW	SEM	Median	25 %	75 %			
1	40mM NH ₄ ⁺	11	30,99	3,70	30,65	22,40	39,00	ja		0,016
2	40mM NH ₄ ⁺ + 200µM Menthol	11	36,34	3,66	34,21	25,74	46,11		0,006	< 0,001
3	40mM NH ₄ ⁺ (w)	11	26,42	2,71	25,70	19,19	35,09		0,016	
1	40mM NH ₄ ⁺	12	24,20	4,51	22,76	14,71	26,99	ja		0,085
2	40mM NH ₄ ⁺ + 1mM Menthol	12	28,73	4,83	26,90	18,14	34,76		0,022	0,001
3	40mM NH ₄ ⁺ (w)	12	20,88	3,68	19,61	16,96	27,00		0,085	

4.3.6.2 Der Effekt von $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Menthol auf den Kurzschlussstrom in NH₄⁺-freier Na⁺-Lösung

Angesichts des Umstandes, dass die Kanäle der TRP-Familie als nicht-selektive Kationenkanäle charakterisiert werden, sollte diese Versuchsserie zeigen, ob es durch die Zugabe von Menthol auch zu einer Änderung der Na⁺-Leitfähigkeit kommt. Das Epithel wurde zunächst mukosal mit dem Standardpuffer (pH 6,4) und serosal mit dem

Standardpuffer (pH 7,4) perfundiert. Durch die Zugabe von Menthol ($1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) kam es zu einer signifikanten Zunahme des Kurzschlussstroms von $0,91 \pm 2,31 \text{ }\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ auf $7,86 \pm 4,05 \text{ }\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$, was einem Anstieg um $\Delta I_{\text{sc}} 6,95 \pm 2,44 \text{ }\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ entspricht ($N/n = 3/12$; $p < 0,05$). Erneut fiel in diesem Zusammenhang der transiente Verlauf der I_{sc} -Zunahme auf. Nach dem Erreichen des Spitzenwertes von $7,86 \pm 4,05 \text{ }\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ fiel der I_{sc} wieder und lag 10 Minuten nach dem Auswaschen mit $-6,05 \pm 1,98 \text{ }\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($N/n = 3/12$; $p < 0,05$) auf einen Wert, der um $\Delta I_{\text{sc}} -13,91 \pm 3,0 \text{ }\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ unterhalb des zu Beginn gemessenen Werts angesiedelt war und entsprechend dem Vorzeichen einer Sekretion von Kationen von serosal nach mukosal entsprach. Damit offenbarte sich ein signifikanter Unterschied zu dem vor Zugabe unter NaCl-Bedingungen festgestellten Stromwert (siehe Abbildung 36 und Tabelle 12).

Es erscheint als wahrscheinlich, dass der apikale Kationenkanal zunächst für Natrium permeabel wird; basolateral erfolgt der aktive Transportschritt mittels Na^+/K^+ -ATPase. Mit zunehmender Depolarisation des Epithels durch den Influx von Natrium wird der Efflux von Kalium aus dem gleichen Kanal begünstigt und bewirkt schließlich die Umkehr der Richtung des I_{sc} . Da bei diesem Versuch mukosal und serosal Standardpuffer mit identischer ionaler Zusammensetzung zum Einsatz kamen, scheidet ein passiver parazellulärer Efflux aus. Es muss sich demnach um eine durch transzelluläre Transportwege energetisierte Reaktion handeln.

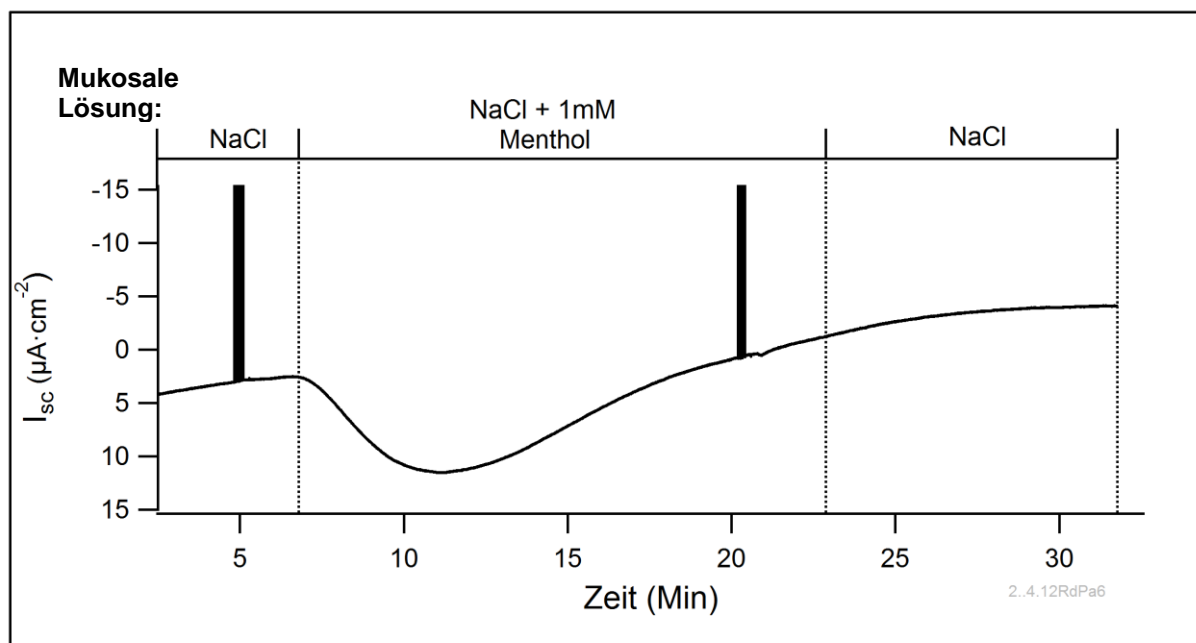


Abbildung 36: Darstellung einer Originalmessung. Die Zugabe von $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Menthol zu einer NaCl-Lösung führt zu einer transienten und signifikanten Zunahme des I_{sc} (serosale Lösung: NaCl Standardpuffer pH 7,4).

Tabelle 12: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse der Messungen mit NaCl und 1 mmol·l⁻¹ Menthol

Nr.	Lösung	I _{sc} (μA · cm ⁻²)						normal verteilt	p vs 1	p vs 3
		n	MW	SEM	Median	25 %	75 %			
1	NaCl	9	0,90	2,32	2,75	-6,31	5,38	nein		< 0,05
2	NaCl + 1mM Menthol	9	7,86	4,05	9,87	-1,97	11,30		< 0,05	< 0,05
3	NaCl (w)	9	-6,05	1,99	-4,58	-11,63	-1,39		< 0,05	

4.3.6.3 Der Effekt von steigenden Konzentrationen von Menthol auf den I_{sc} bei einer Na⁺-freien 40 mmol·l⁻¹ NH₄⁺-Lösung

In diesem Versuchsansatz wurden hintereinander steigende Konzentrationen von Menthol (2 μmol·l⁻¹, 20 μmol·l⁻¹, 200 μmol·l⁻¹ und 1 mmol·l⁻¹) in eine Na⁺-freie 40 mmol·l⁻¹ NH₄⁺-Pufferlösung gegeben. Die abgebildete Originalmessung (siehe Abbildung 37) belegt die Konzentrationsabhängigkeit des Mentholeffektes.

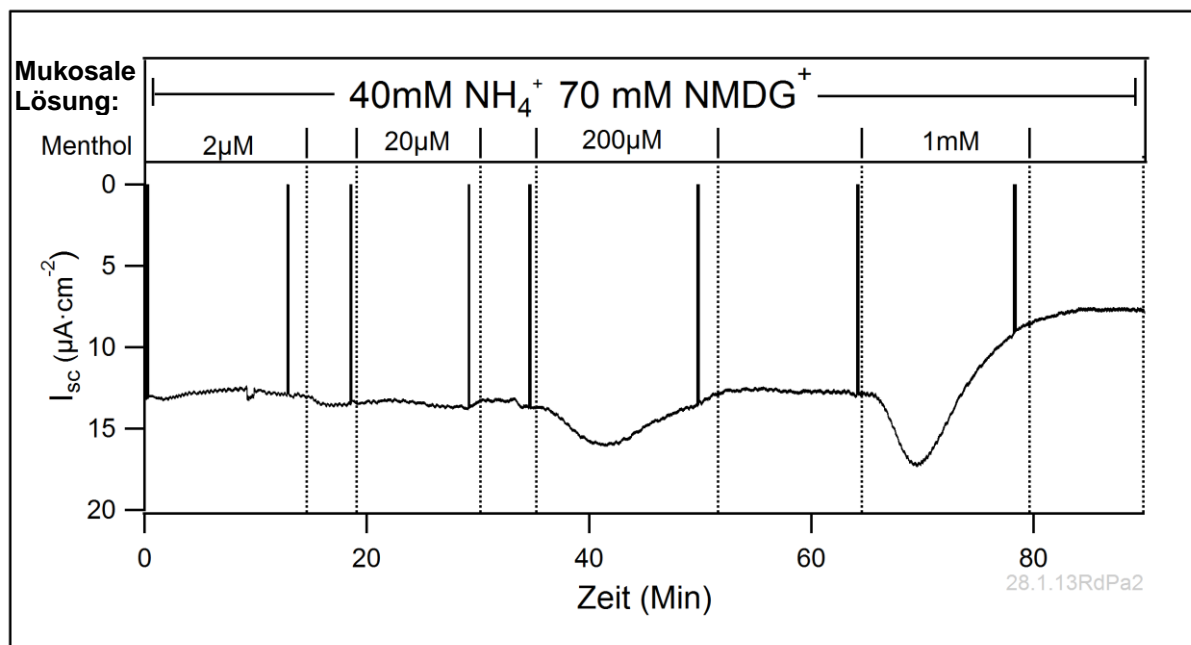


Abbildung 37: Originalmessung mit dem Effekte von steigenden Konzentrationen Menthol auf den transepithelialen Strom (serosale Lösung: NaCl Standardpuffer pH 7,4).

4.3.6.4 Der Effekt von $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Thymol auf den Kurzschlussstrom bei mukosaler $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{NH}_4^+$ -Lösung

Thymol als Wirkstoff aus der Thymianpflanze ist als ein Aktivator des TRPV3-Kanals bekannt (Vogt-Eisele et al., 2007). In einem weiteren Versuchsansatz der vorliegenden Studie wurde deshalb der Effekt von $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Thymol (gelöst in Ethanol) auf den Kurzschlussstrom in mukosalem $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{NH}_4^+$ -Puffer untersucht. Bei den durchgeführten Messungen konnte kein einheitlicher Effekt von Thymol festgestellt werden. In einem Teil der Epithelien zeigte Thymol ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) keinen Effekt auf den Kurzschlussstrom; doch bei einem anderen Teil ließ sich ein hemmender Effekt feststellen. Insgesamt zeigten sich bei der Testung sämtlicher Ergebnisse keine Signifikanzen (siehe Tabelle 13), wobei es bei der Betrachtung der Einzelmessungen schwerfällt, eine Wirkung der Substanz tatsächlich auszuschließen. Als Beispiel für dieses Phänomen folgt unten die Abbildung einer Originalmessung aus der Versuchsreihe (siehe Abbildung 38).

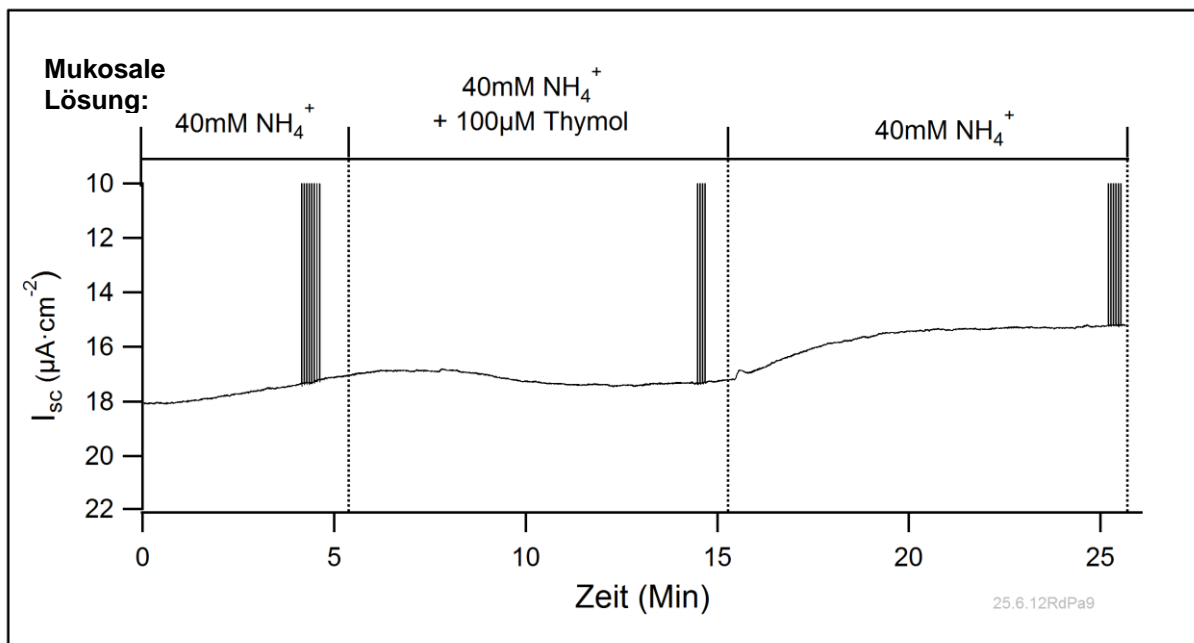


Abbildung 38: Originalmessung mit dem Effekte von $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Thymol auf den transepithelialen Strom (serosale Lösung: NaCl Standardpuffer pH 7,4).

Tabelle 13: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse der Effekte von $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Thymol auf den I_{sc}

Nr.	Lösung	$I_{\text{sc}} (\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2})$						normal verteilt	p vs 1	p vs 3
		n	MW	SEM	Median	25 %	75 %			
1	40mM NH_4^+	4	22,47	3,87	19,30	18,23	26,70	ja	(p = 0,498)	
2	40mM NH_4^+ +100 μM Thymol	4	22,19	4,00	19,35	17,01	27,37			
3	40mM NH_4^+ (w)	4	15,82	9,60	20,91	2,63	29,01			

4.3.6.5 Der Effekt von $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Thymol auf den Kurzschlussstrom bei mukosaler Na^+ -freier $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NH_4^+ Lösung

In der folgenden Versuchsreihe wurde Thymol vor dem Hintergrund der oben dargelegten Daten in höherer Konzentration eingesetzt ($1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Zur Verdeutlichung einer möglichen Wirkung auf den NH_4^+ -induzierten Strom wurde mukosal ein Na^+ -freier Puffer mit $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NH_4^+ verwendet. Das fehlende Na^+ wurde – wie schon zuvor – durch eine äquimolare Menge NMDG^+ ersetzt.

Nach einer Äquilibrationszeit wurde diesem mukosalen Puffer $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Thymol zugegeben. Die Effekte auf den I_{sc} ($N/n = 6/9$) ließen sich praktisch in zwei Gruppen einteilen: Bei $n = 5$ Messungen wirkte Thymol zunächst aktivierend auf den transepithelialen Kurzschlussstrom, wobei der I_{sc} von $11,42 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2} \pm 2,42 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ auf $17,11 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2} \pm 3,22 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ anstieg. Im Anschluss an diese Steigerung des I_{sc} fiel der Strom über das Epithel aber deutlich ab. 10 Minuten nach Zugabe des Thymols war eine Abnahme auf $7,51 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2} \pm 1,59 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ zu beobachten. 10 Minuten nach Beginn des washout erreichte der transepitheliale Strom einen Wert in Höhe von $0,97 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2} \pm 1,51 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$.

Demgegenüber offenbarten $n = 4$ Messungen keine vorübergehende Zunahme des I_{sc} nach der Zugabe von $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Thymol, sondern eine direkte Abnahme des Stroms über das Epithel von $4,62 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2} \pm 15,66 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ auf $-6,60 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2} \pm 14,76 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$. 10 Minuten nach washout lag der I_{sc} bei $-7,02 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2} \pm 12,98 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$.

Bei dem Vergleich des I_{sc} aller durchgeführten Messungen vor der Zugabe und 10 Minuten nach Beginn des washout ließ sich eine signifikante Abnahme von $8,39 \pm 6,62 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ auf -

$2,58 \pm 5,55 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ (N/n = 6/9; $p < 0,05$) feststellen. Ungeachtet der zunächst fehlenden Einheitlichkeit der Reaktion der Epithelien auf die Zugabe führte Thymol im Verlauf der Messungen zur statistisch signifikanten Abnahme des I_{sc} . Sämtliche Messungen sind vergleichend in Abbildung 39 dargestellt.

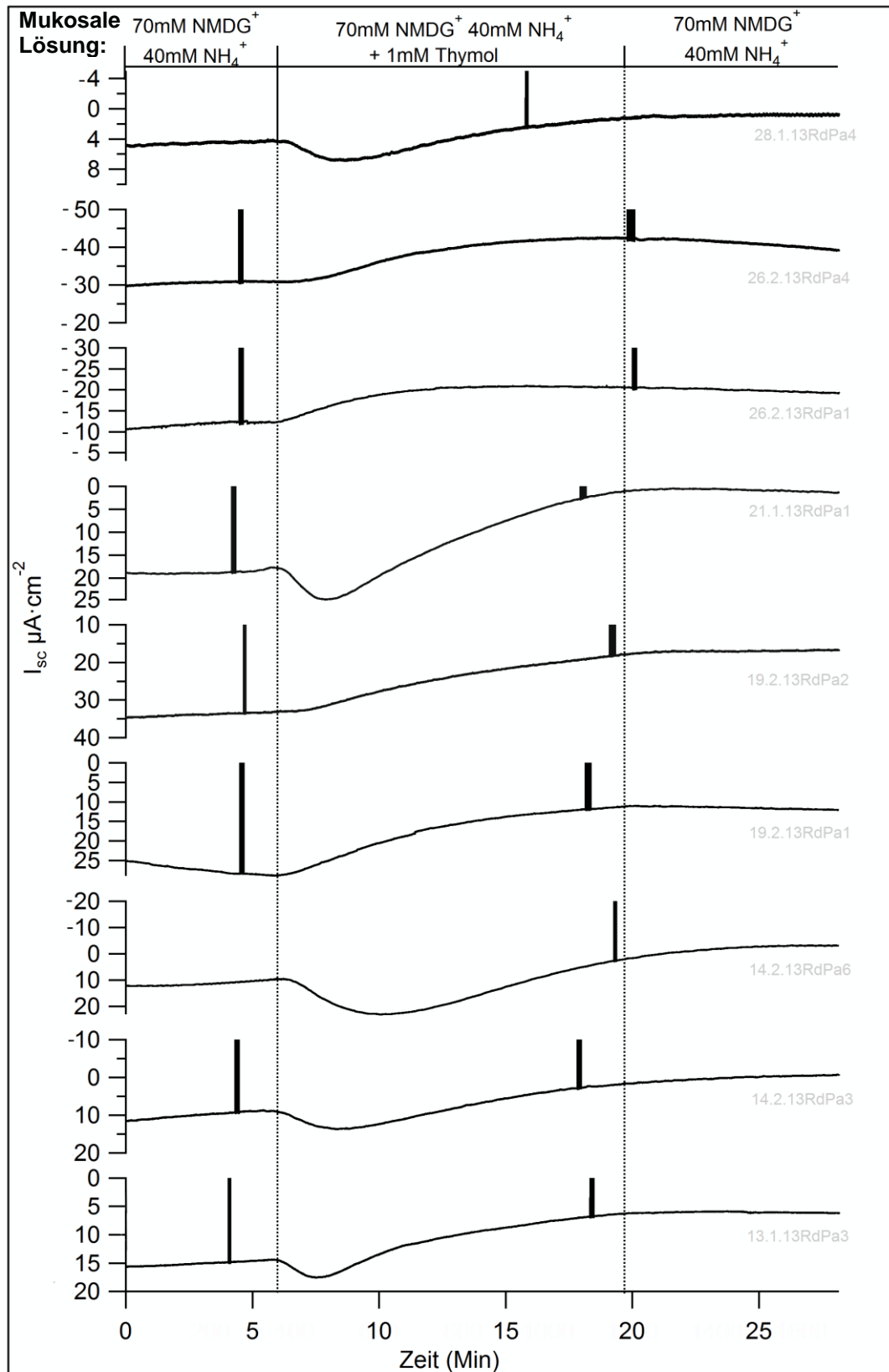


Abbildung 39: Vergleichende Darstellung aller neun Messungen, bei denen 1 mmol·l⁻¹ Thymol in eine NH₄⁺ haltige, Na⁺-freie Perfusionslösung gegeben wurde (serosale Lösung: NaCl Standardpuffer pH 7,4).

4.3.6.6 Der Einfluss von $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Capsaicin auf den Kurzschlussstrom bei einer mukosalen $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{NH}_4^+$ -Lösung

Capsaicin ist in Chilipflanzen enthalten und bewirkt durch Aktivierung von TRPV1-Kanälen stechende oder scharfe, brennende Empfindungen sowohl auf der Zunge als auch an den Schleimhäuten (Caterina et al., 2000; Vriens et al., 2008). In einer weiteren Versuchsreihe wurde zu einer $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{NH}_4^+$ -Lösung $100 \mu\text{M}$ Capsaicin (gelöst in Ethanol) hinzugegeben. Es resultierte eine signifikante Abnahme des Kurzschlussstromes von $23,10 \pm 5,69 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ auf $19,85 \pm 5,34 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($\Delta I_{\text{sc}} -3,25 \pm 1,16 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$; $N/n = 4/6$; $p < 0,05$) (siehe Tabelle 14 und Abbildung 40). Der washout führte zu einer geringen, aber nicht signifikanten Zunahme des Kurzschlussstroms auf $21,54 \pm 5,88 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$. Zwischen dem washout und vor der Zugabe von Capsaicin bestand kein signifikanter Unterschied ($N/n = 4/6$; $p = 0,145$).

Tabelle 14: Tabellarische Zusammenfassung der Wirkung von $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Capsaicin auf den NH_4^+ -induzierten I_{sc}

Nr.	Lösung	$I_{\text{sc}} (\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2})$						normal verteilt	p vs 1	p vs 3
		n	MW	SEM	Median	25 %	75 %			
1	40mM NH_4^+	6	23,10	5,69	21,18	14,74	37,05	ja		0,145
2	40mM NH_4^+ + $100\mu\text{M Capsaicin}$	6	19,85	5,33	20,49	12,29	28,94		0,02	0,115
3	40mM NH_4^+ (w)	6	21,54	5,88	21,12	14,96	32,70		0,145	

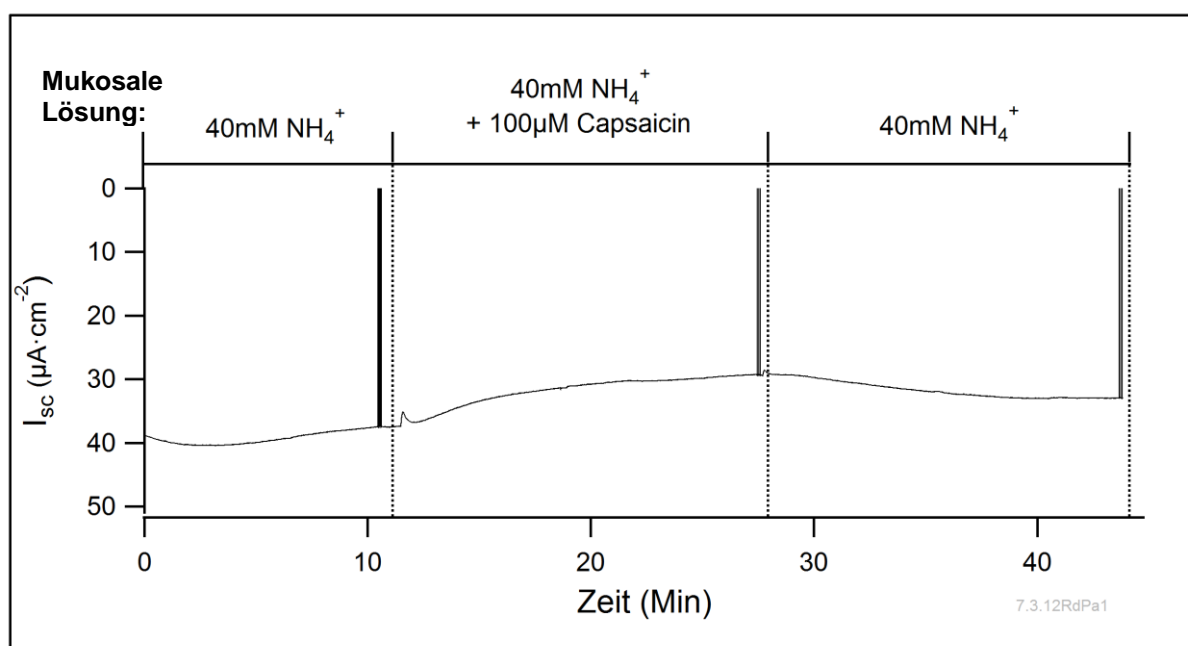


Abbildung 40: Originalmessung zum hemmenden Einfluss von $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Capsaicin auf den transepithelialen Strom (serosale Lösung: NaCl Standardpuffer pH 7,4).

4.3.6.7 Der Effekt von 1 mmol·l⁻¹ Zimtaldehyd auf den Kurzschlussstrom bei einer 40 mmol·l⁻¹ NH₄⁺-Lösung

Zimtaldehyd (Cinnamaldehyd) kommt natürlicherweise in der Rinde des Zimtbaums vor und wird als Modulator von TRPA1 (Bandell et al., 2004) sowie TRPM8 beschrieben (Vriens et al., 2008). Der Ablauf dieser Versuchsreihe gleicht den zuvor beschriebenen. Wie auch bei den Messungen mit Thymol konnte bei der Zugabe von 1 mmol·l⁻¹ Zimtaldehyd kein einheitlicher Effekt beobachtet werden. Zusammengefasst führte die mukosale Zugabe von 1 mmol·l⁻¹ Zimtaldehyd zu einer Abnahme des Kurzschlussstroms von $31,53 \pm 3,15 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ auf $28,39 \pm 3,26 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($\Delta I_{\text{sc}} -3,14 \pm 1,29 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$), was sich aufgrund der nicht reagierenden Epithelien im statistischen Vergleich jedoch nicht als signifikant erwies (N/n = 2/8; p = 0,313). Beim washout war keine Veränderung des Kurzschlussstroms messbar ($\Delta I_{\text{sc}} -0,09 \pm 2,51 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$) (N/n = 2/8; p = 0,313). Insgesamt war die Wirkung von Zimtaldehyd auf den Kurzschlussstrom statistisch nicht signifikant. Exemplarisch für diese Ausführungen sind im Folgenden zwei Originalmessungen dargestellt (siehe Abbildung 41 und Abbildung 42).

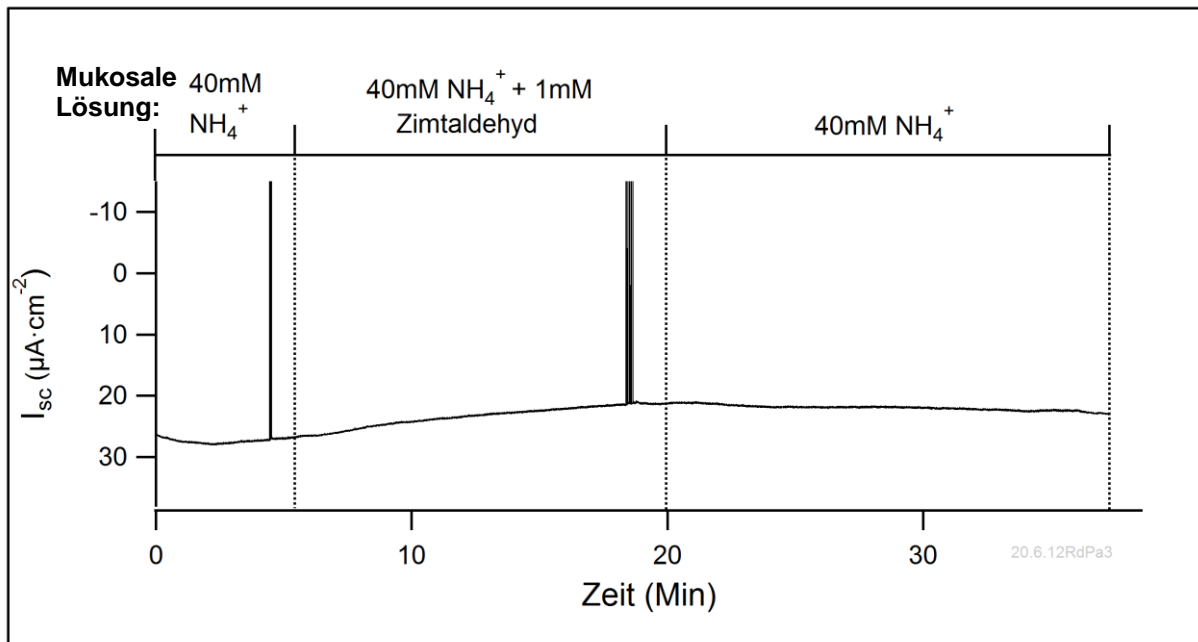
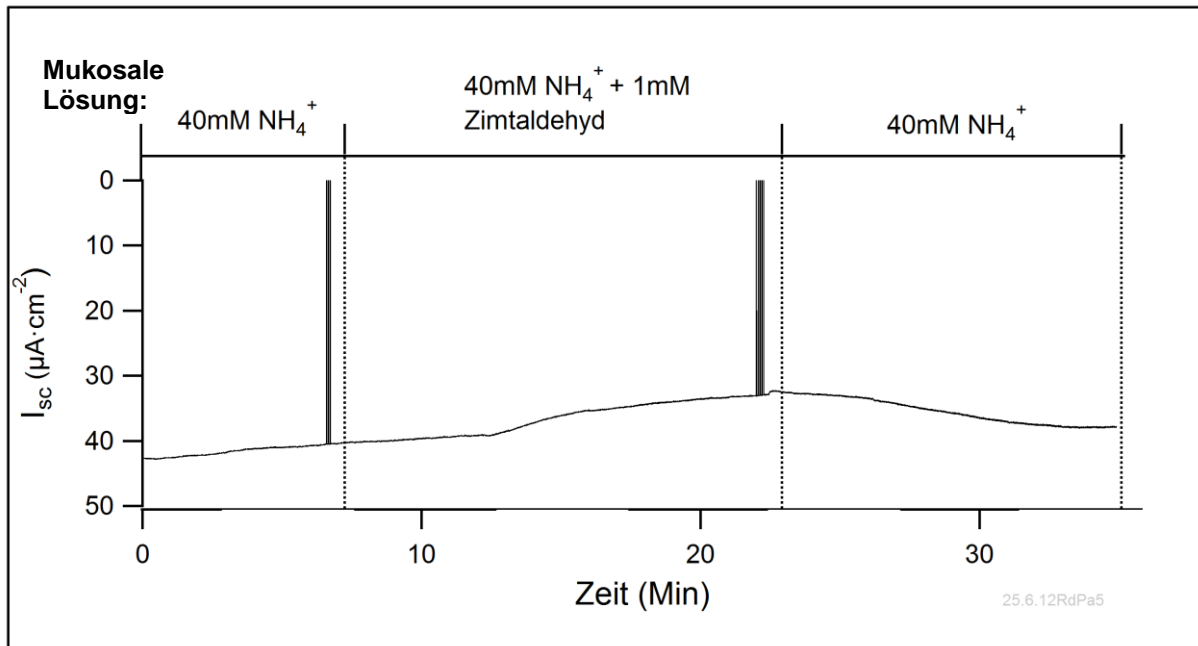


Abbildung 41 und 42: Originalmessungen zum Effekt von $1\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Zimtaldehyd auf den transepithelialen Strom. Die Veränderungen infolge der Zugabe deuten auf eine mögliche Interaktion mit dem Pansenepithel hin (serosale Lösung: NaCl Standardpuffer pH 7,4).

4.3.6.8 Der Effekt von $1\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Methylsalicylat auf den I_{sc} bei einer Na^+ -freien $40\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NH₄⁺-Lösung

Methylsalicylat duftet charakteristisch nach Wintergreen und ist ein Aktivator der TRPA1-Kanäle (Vriens et al., 2008). In einem weiteren Versuchsansatz wurde $1\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$

Methylsalicylat zur mukosalen Na^+ -freien $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NH_4^+ -Lösung gegeben. Aufgrund dieser Zugabe kam es zu einem im Verlauf zwar deutlich sichtbaren, insgesamt aber statistisch nicht signifikanten Absinken des Kurzschlussstroms von $25,44 \pm 1,8 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ auf $21,06 \pm 2,97 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($N/n = 3/4$;) (siehe Abbildung 43 und Tabelle 15). 10 Minuten nach dem Einsetzen des washout lag der gemessene I_{sc} bei einem Wert in Höhe von $21,51 \pm 4,09 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$.

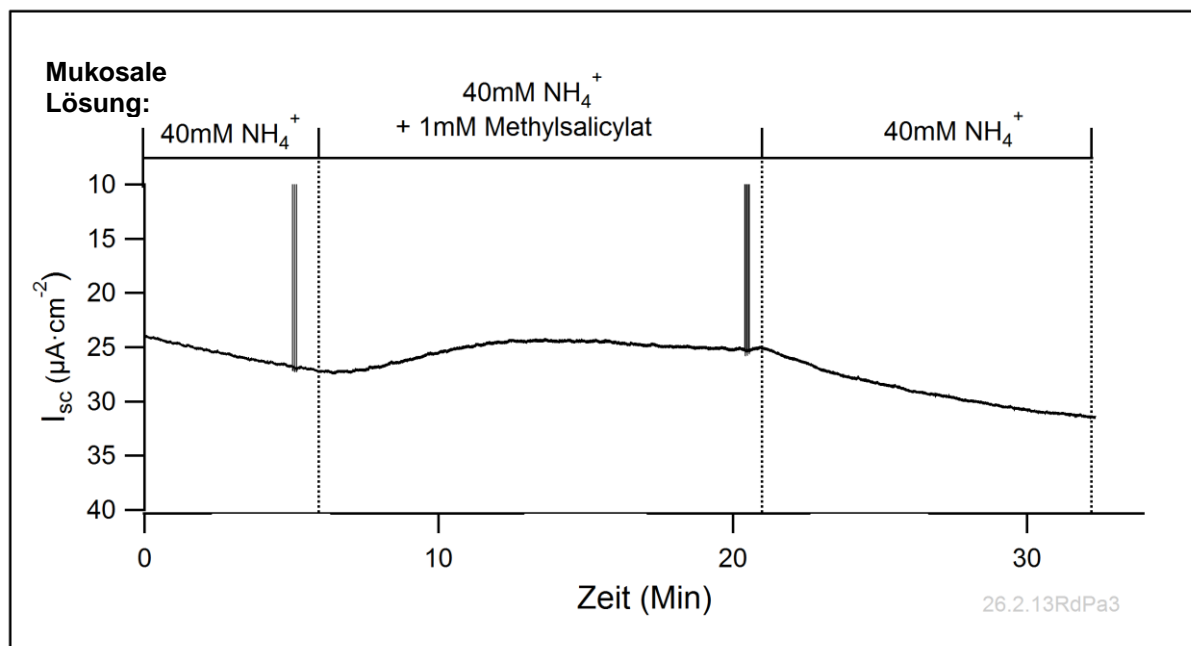


Abbildung 43: Originalmessung zum Effekt von $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Methylsalicylat auf den transepithelialen Strom (serosale Lösung: NaCl Standardpuffer pH 7,4).

Tabelle 15: Tabellarische Zusammenfassung des I_{sc}

Nr.	Lösung	$I_{\text{sc}} (\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2})$						normal verteilt	p vs 1	p vs 3
		n	MW	SEM	Median	25 %	75 %			
1	40mM NH_4^+	4	25,44	1,80	25,95	22,90	27,99	ja	(p = 0,184)	
2	$40\text{mM NH}_4^+ + 1\text{mM Methylsalicylat}$	4	21,06	2,97	20,75	16,11	26,01			
3	$40\text{mM NH}_4^+ (\text{w})$	4	21,51	4,09	20,64	14,72	28,30			

4.3.6.9 Der Effekt von $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Kampher auf den I_{sc} bei einer $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NH_4^+ -haltigen Lösung

Kampher kann natürlicherweise unter anderem aus Rinde und Harz des Kampherbaumes gewonnen werden. Es gilt als ein Modulator von TRPA1-, TRPV1- sowie TRPV3-Kanälen

(Vriens et al., 2008) und ist bereits seit Jahrhunderten als Mittel in der Behandlung von Wunden etabliert.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Kampher in eine $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ -haltige NH_4^+ -Lösung gegeben und der Effekt auf den I_{sc} gemessen. Die verwendeten Epithelien ($N/n = 3/6$) zeigten erneut stark unterschiedliche Effekte auf die Zugabe von Kampher. Aufgrund der großen Variabilität konnten die Veränderungen statistisch nicht erfasst werden. Eine nähere Untersuchung der Wirkung von Kampher auf das Pansenepithel, unter Umständen mit geringerer Konzentration, erscheint für weitere Untersuchungen sinnvoll.

4.3.6.10 Der Effekt von $20 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Capsazepine und $100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Icilin auf den Kurzschlussstrom

Der TRPM8 Kanal gilt als hochsensibel für Menthol und kommt als Kandidat für die Wirkung des Menthols auf das Pansenepithel in Frage. Capsazepine gilt als Blocker von TRPM8 sowie TRPV1 (Cahusac 2009). Die mukosale Zugabe von $20 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Capsazepine führte jedoch zu keiner signifikanten Veränderung des Kurzschlussstromes ($N/n = 2/2$). Der anschließende washout führte ebenso wenig zu einer signifikanten Veränderung. Auch die Zugabe von $100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Icilin, das ebenfalls als hochselektiver Modulator des TRPM8-Kanals gilt, bedingte keine signifikante Veränderung des I_{sc} ($N/n=2/3$). Insgesamt sprechen diese Ergebnisse eher gegen eine Expression des TRPM8 durch das Pansenepithel. Aufgrund des hohen Preises dieser Reagenzien wurden keine weiteren Versuche im Rahmen des vorliegenden Promotionsvorhabens durchgeführt.

4.3.6.11 Der Effekt von $100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Bumetanid auf den transepithelialen Strom

Bumetanid ist ein Schleifendiuretikum und wirkt in der Niere durch die Hemmung des $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ Transporters im aufsteigenden Teil der Henle-Schleife. Am Colon wird der $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ Transporter basolateral exprimiert und ist maßgeblich an der Sekretion von Cl^- über das Epithel beteiligt. Eine weitere Beteiligung an der Wirkung von Thymol auf die Anionensekretion am Colon wird derzeit diskutiert und konnte noch nicht vollständig geklärt werden (Kaji et al., 2011).

Im Rahmen weiterer Messungen sollte daher untersucht werden, ob Bumetanid einen Einfluss auf den transepithelialen Strom über das Pansenepithel des Rindes hat. Zu diesem Zweck wurde analog zum Vorgehen zuvor Pansenepithel waagrecht in eine Ussing-Kammer gespannt und zunächst beidseits mit dem Standardpuffer (mukosal pH 6,4; serosal pH 7,4) umspült. Dabei lag der gemessene I_{sc} bei $4,2 \pm 0,65 \mu A \cdot cm^{-2}$ (siehe Tabelle 16). Die serosale Zugabe von $100 \mu mol \cdot l^{-1}$ Bumetanid führte zu keiner signifikanten Veränderung des I_{sc} ($\Delta I_{sc} - 0,38 \pm 0,85 \mu A \cdot cm^{-2}$; (N/n = 2/4; p = 0,7).

Tabelle 16: Tabellarische Zusammenfassung der Messungen mit Bumetanid

Nr.	Lösung	$I_{sc} (\mu A \cdot cm^{-2})$						normal verteilt	p vs 1	p vs 3
		n	MW	SEM	Median	25 %	75 %			
1	NaCl serosal	4	4,20	0,65	3,70	3,32	5,08	ja	(p = 0,698)	
2	NaCl +100 μ M Bumetanid serosal	4	3,84	1,33	4,05	1,81	5,86			

5 Diskussion

Für den Wiederkäuer stellt die im Pansen stattfindende mikrobielle Umwandlung von mit der Nahrung aufgenommenem Futterprotein in mikrobielles Protein eine zentrale Voraussetzung für die Leistungsfähigkeit dar. Wesentliche Voraussetzungen in diesem Zusammenhang sind neben einer konstanten Temperatur, ein möglichst stabiler intraruminaler pH-Wert wie auch ein konstanter Stickstoffspiegel im Pansen. Als Stickstoffquelle dient in erster Linie Ammoniak, das bei der mikrobiellen Zerlegung des Futterproteins entsteht. Andererseits hat der Wiederkäuer die Möglichkeit, nicht-Protein-Stickstoff (NPN) für die Proteinsynthese zu verwenden. Somit stellt der im Rahmen der Stickstoff-Rezirkulation in den Pansen sezernierte Harnstoff eine wichtige zusätzliche Stickstoffquelle dar (Harmeyer und Martens 1980; Abdoun et al., 2010).

Interessanterweise werden 50 bis 70 % des im Pansen verfügbaren Ammoniaks nicht direkt zur mikrobiellen Proteinsynthese verwendet, sondern über die Pansenwand resorbiert und im Harnstoffzyklus der Leber entgiftet (Pilgrim et al., 1969). Für den Wiederkäuer bedeutet dies eine tägliche Zirkulation von über 20 Mol Stickstoff zwischen dem Gastrointestinaltrakt und der Leber (Delgado-Elorduy et al., 2002a; Delgado-Elorduy et al., 2002b). Dies führt für das Tier wiederum zu einem massiven Energieverlust (4 ATP pro synthetisiertem Harnstoffmolekül) und mit jedem Zyklus gelangen erhebliche Mengen von Harnstoff über die Niere in die Umwelt.

Die Resorption von Ammoniak aus dem Pansen scheint aufgrund der Toxizität des Stoffes eine Schnittstelle zwischen der lebensnotwendigen Entsorgung überschüssiger Mengen und der Sicherung einer ungestörten Fermentation durch die Aufrechterhaltung einer ausreichenden Stickstoff-Konzentration darzustellen. Dabei ist die Resorption von Ammoniak aus dem Pansen in vielen Fütterungsszenarien deutlich höher, als dieses bei alleiniger Betrachtung des intraruminalen Stickstoffbedarfs günstig wäre. Zur Aufrechterhaltung einer ausreichenden intraruminalen Stickstoffkonzentration muss in der Praxis teures Protein zugefüttert werden.

Vermutlich ist dies einer der Gründe dafür, dass über Jahrzehnte hinweg am klassischen Modell einer völlig unreguliert ablaufenden Diffusion in Form des NH_3 ausgegangen wurde

(McDonald 1948) – und zwar trotz der hundertfach höheren intraruminalen Konzentration der protonierten Form (NH_4^+) bei physiologischen pH im Pansen. Aus dem klassischen Resorptionsmodell ließe sich schließen, dass es bei einer Absenkung des intraruminalen pH-Wertes zu einer Abnahme der Ammoniakresorption aus dem Pansen kommen müsste. Zahlreiche Studien belegen allerdings, dass die Resorptionsrate von Ammoniak aus dem Pansen nur teilweise vom Anteil des lipophilen NH_3 abhängt (Gärtner 1963; Gärtner und von Engelhardt 1964). Auch in Fütterungsstudien wurde beobachtet, dass eine Steigerung der Konzentratmenge im Futter mit Ansäuerung des intraruminalen pH-Wertes keinen Einfluss auf die Harnstoffausscheidung hatte und es zu keiner Senkung der $\text{NH}_3\text{-N}$ Emissionen kam (Lascano et al., 2008; Agle et al., 2010; Aguerre et al., 2011).

Es kann heute kaum noch bezweifelt werden, dass das Pansenepithel Transportproteine für die Resorption des geladenen Ammonium-Ions exprimiert. Ussing-Kammer-Versuche belegen eindeutig, dass es nach der Applikation von Ammoniak zu einer Zunahme des Kurzschlussstroms kommt (Gärtner 1963; Gärtner und von Engelhardt 1964; Bödeker und Kemkowski 1996; Abdoun et al., 2005). Auch Patch-Clamp-Messungen an kultivierten Zellen des Pansenepithels (Abdoun et al., 2005) belegen die Expression von Ionenkanälen mit einer Leitfähigkeit für die ionisierte NH_4^+ -Form. Aus physiologischer Sicht könnte die Expression von NH_4^+ -leitenden Kanälen für den Efflux von Protonen mittels der protonierten Form NH_4^+ sorgen und auf diese Weise einen zusätzlichen Mechanismus zur Regulierung des intraruminalen pH-Wertes darstellen. Die energieaufwendige Rezirkulation von Ammoniak zwischen Leber und Verdauungstrakt hätte eine zusätzliche physiologische Funktion und der Grund für die hohen Ammoniumeffluxraten bei Zufütterung von ansäuerndem Konzentrat wäre vor diesem Hintergrund verständlich.

Das Ziel der vorliegenden Dissertation bestand darin, die Mechanismen für den Transport von Ammonium über das Pansenepithel des Rindes genauer zu charakterisieren. Als mögliche Kandidaten kommen sowohl die in der apikalen Membran vorhandenen nicht-selektiven Kationenkanäle als auch basolaterale Kaliumkanäle in Frage; eine genauere Charakterisierung ist längst überfällig.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst Flux-Messungen mittels Ammoniakelektrode in der Ussing-Kammer durchgeführt, um auf diesem Weg zu klären, ob die Diffusion von Ammoniak zu Verschiebungen des serosalen pH-Wertes führt, wie es bei überwiegender

Diffusion als NH_3 zu erwarten wäre. Zur Charakterisierung der Leitfähigkeit für NH_4^+ wurden anschließend Patch-Clamp-Experimente an isolierten Pansenepithelzellen und Punktionen mit „double-barreled“ und konventionellen Mikroelektroden am intakten Epithel durchgeführt.

Zahlreiche Untersuchungen des ovinen Pansens belegen den elektrogenen Efflux von Na^+ durch nicht-selektive Kationenkanäle, deren Permeabilität durch divalente Kationen wie Ca^{2+} und Mg^{2+} hemmbar ist (Schultheiss und Martens 1999; Leonhard-Marek 2002; Leonhard-Marek et al., 2005; Brinkmann 2007). Ob ähnliche Kanäle auch vom bovinen Pansen exprimiert werden und ob diese für NH_4^+ permeabel sind, wurde bisher nicht untersucht. Weiterhin sollte im Rahmen dieser Arbeit durch direkte Messung des intrazellulären pH-Wertes geklärt werden, ob es tatsächlich zu einer Ansäuerung des Epithels durch die Aufnahme von NH_4^+ kommt, wie es von Abdoun (2005) anhand indirekter Effekte postuliert wurde (Abdoun et al., 2005). Schließlich wurde die Interaktion mit TRP-Kanalmodulatoren überprüft, um einen möglichen Anhaltspunkt für die molekularbiologische Zuordnung der für den Efflux von NH_4^+ aus dem Pansen verantwortlichen Proteine zu erhalten.

5.1 Methodenkritik

5.1.1 Herkunft und Gewinnung des Pansenepithels

Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Mikroelektroden-, Patch- und Ussing-Kammer-Messungen wurden an Pansenepithel von Rindern durchgeführt. Die überwiegende Zahl der bisherigen *in vitro* Studien zum Ammoniumtransport wurde am Pansenepithel von Schafen vorgenommen z.B. (McDonald 1948; Hogan 1961; Bödeker et al., 1990; Bödeker und Kemkowski 1996; Abdoun et al., 2005). Eine erste Fragestellung war daher, ob bisherige Erkenntnisse zum Transport von Ammonium über das Pansenepithel von Schafen auch auf Epithelien vom Rind übertragbar sind. In Anbetracht der wesentlich höheren Relevanz des Rindes für die Erzeugung von Nahrungsmitteln erscheint die Klärung dieser Frage von erheblicher Bedeutung.

Ein Erwerb von Rindern für die Materialgewinnung kam mit den uns zur Verfügung stehenden Mitteln nicht in Frage. Durch die Verwendung von Material, das von kommerziell

betrieblenen Schlachthöfen aus der Umgebung stammte, konnte zudem darauf verzichtet werden, eigens für diese Versuche Tiere zu töten. Im Verlauf der Versuche stellte sich jedoch heraus, dass die Verwendung von Schlachthofmaterial mit neuen Herausforderungen verbunden war. Aufgrund des laufenden Schlachtbetriebes stammten die Epithelien von Tieren unterschiedlichster Herkunft, sie waren unterschiedlichsten Alters, wurden unterschiedlich gehalten und gefüttert. Es ist bekannt, dass die Transportraten bzw. Leitfähigkeiten für Ionen stark von der Fütterungsweise abhängen (Gäbel et al., 1991a; Gäbel und Aschenbach 2002; Abdoun et al., 2003; Uppal et al., 2003a; Uppal et al., 2003b). Bei der statistischen Auswertung wurden daher nur gepaarte Daten eines Epithels miteinander verglichen (siehe Kap. 3.5.9). Mit diesem Vorgehen konnte ein Effekt der Fütterung auf unsere Ergebnisse ausgeschlossen werden.

Die Zeit zwischen der Tötung der Tiere und der Entnahme des Gewebes aus dem Pansen erwies sich aufgrund des ungestört weiterlaufenden Schlachtbetriebs als sehr variabel und stellte sich als bedeutend länger (ca. 30 min) heraus als es bei der Tötung eines einzelnen Schafes bei uns im Institut der Fall ist. Zudem erwies sich das „stripping“ des Pansenepithels, bei dem das eigentliche Epithel vom subepithelialen Gewebe getrennt wird, bei Rindern als deutlich schwieriger als bei Schafen. Häufig mussten mehrere Epithelstücke gestrippt werden, bevor es gelang, ein Epithelstück zu gewinnen, bei dem alle Fasern des Untergewebes erfolgreich entfernt werden konnten. Hierzu wurde teilweise große Kraft benötigt, was auf eine weitaus festere Verankerung der Epithelschicht mit den darunterliegenden Schichten hindeutet. Möglich erscheinen auch alte Vernarbungen. Diese Beobachtung deckt sich mit früheren Beobachtungen (H. Martens, persönliche Mitteilung).

Nach der Gewinnung des Epithels wurde es sofort in erwärmten und begasten Transportpuffer gegeben und in diesem unter fortlaufender Begasung ins Labor gebracht. Anfängliche Versuche, das Epithel in eisgekühltem Ringer zu transportieren, scheiterten. Der epitheliale Widerstand war in diesen Fällen stets viel zu gering, um erfolgreiche Messungen durchführen zu können. Auch dieses Phänomen deckt sich mit vorherigen Erfahrungen (H. Martens, J.R. Aschenbach, persönliche Mitteilung). Unter optimalen Bedingungen (rascher Schlachtablauf und gute Verkehrsbedingungen) traf das Epithel ca. 120 Minuten nach der Tötung des Tieres im Institut ein, aber es ergaben sich auch Zeiten bis zu 180 Minuten.

Zum Ende der Messungen für diese Arbeit ließ sich der Kontakt zu einem näher lokalisierten und kleineren Schlachtbetrieb herstellen. So war es möglich, schon Minuten nach der Tötung des Tieres das Pansengewebe zu entnehmen und binnen einer Stunde ins Institut zu überführen. Diese Zeiten liegen aber allesamt erheblich über der für die Gewinnung von Schafpansen an unserem Institut üblichen Zeitdauer von insgesamt ca. 30 Minuten. Trotz des langen Transportes kam es dennoch nur sehr selten zu einem völligen Scheitern des Versuchsvorhabens (an 2 von 45 Messtagen).

Als Ausschlusskriterium für die Brauchbarkeit der Epithelien für unsere Messungen wurde die zu Versuchsbeginn gemessene Leitfähigkeit bestimmt. Gewebe mit einer Leitfähigkeit von über 10 mS wurden als beschädigt bewertet und unmittelbar durch ein neues Gewebstück vom gleichen Tier ersetzt. Bei den Mikroelektrodenversuchen bestätigte sich die bereits am Schafpansen gemachte Beobachtung, dass bei adäquater Begasung sowie regelmäßigem Pufferwechsel sowohl die Leitfähigkeit als auch der Kurzschlussstrom des Epithels über viele Stunden hinweg erstaunlich stabil blieb; nicht selten wurde dabei eine gewisse Steigerung des Kurzschlussstroms festgestellt, die eine Erholung der Gewebsvitalität im Puffer nach dem Entnahmevergange und dem Stripping anzudeuten scheint. Insgesamt entstand der Eindruck, dass sich ein mit zu viel Zug durchgeführtes Stripping problematischer auf die Gewebe auswirkt als der Transport, sofern er in optimal erwärmtem und begastem Puffer erfolgt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Verwendung von Schlachtgewebe auch bei deutlich längerer Transportphase eine funktionierende Alternative zur Tötung von Tieren eigens für Versuchszwecke ist. Sollen Daten zum Rind erhoben werden, stellt die Verwendung von Schlachtgewebe zudem die wohl einzige unter praktischen Gesichtspunkten realisierbare Möglichkeit dar.

5.1.2 Messung des Ammoniak-Fluxes mittels Ammoniakelektrode nach Inkubation in der Ussing-Kammer

Bei Experimenten an Geweben des Gastrointestinaltraktes gilt der Zusatz von Glutamin seit Jahren als ein probates Mittel, um die Gewebevitalität beizubehalten (Yang et al., 2000). Während der Experimente mussten wir allerdings feststellen, dass auch in der Kontrollgruppe, in der sowohl mukosal als auch serosal ein NH_4^+ -freien Puffer verwendet wurde, geringe

Mengen an NH_3 und NH_4^+ mit der Ammoniumelektrode nachzuweisen waren. In den Pufferlösungen enthaltenes L-Glutamin stellte sich nach einer systematischen Suche als ursächlich heraus. Die Literatur bestätigt hierzu, dass sich in Lösung befindliches L-Glutamin nicht stabil ist, sondern in Ammoniak und Glutaminsäure zerfällt (Kusumoto 2001). Sowohl Verschiebungen des pH-Wertes als auch Temperaturverschiebungen sowie die Art der verwendeten Lösung haben einen Einfluss auf den Zerfall von L-Glutamin (Khan und Elia 1991).

Um Auswirkungen auf die Ammoniak-Fluxraten zu minimieren, wurde vor diesem Hintergrund die Ammoniakelektrode bei der Messung der Proben mit der verwendeten Pufferlösung (mit Glutamin, aber ohne Zusatz von NH_4Cl) anstatt mit reinem Wasser geeicht. Die vom Glutamin stammenden Ammoniakmengen wurden somit von allen Werten abgezogen. Es sei hierzu jedoch angemerkt, dass bei zukünftigen Messungen zum Ammoniumtransport Puffer ohne L-Glutamin verwendet werden sollten oder stabilisiertes Glutamin zum Einsatz kommen sollte, wie dieses in Zellkulturmedien Anwendung findet. Auch bei sonstigen Ussing-Kammer-Versuchen sollte der Einsatz von nicht stabilisiertem Glutamin kritisch überdacht werden.

5.1.3 Patch-Clamp-Technik

Verwendete Lösungen

Bei Patch-Clamp-Messungen ist grundsätzlich eine besondere Sorgfalt bei der Wahl der Zusammensetzung der Lösungen wie auch der Herstellung derselben nötig. Unterschiede in der Osmolarität zwischen der mit der Pipette intrazellulär applizierten Lösung und der Badlösung können zur Zellschwellung oder Schrumpfung der Zellen führen. In der Regel kommt es hierdurch zu Veränderungen in der Leitfähigkeit verschiedener Ionenkanäle, so beispielsweise von Chlorid-, Kalium- oder Calciumkanälen (Sarkadi und Parker 1991). Ferner ist ein unter osmotischem Stress stehender Seal sehr instabil. Eine Veränderung des pH-Wertes kann ebenfalls zu einer Veränderung der Leitfähigkeiten führen. Die Osmolaritäten und pH-Werte sämtlicher verwendeten Lösungen wurden daher täglich vor Messbeginn überprüft (siehe Kap. 3.4.4.4).

Weiterhin ist es bei Whole-Cell-Messungen oft nicht einfach, eine Entscheidung darüber zu treffen, ob es zu einer stabilen Verbindung zwischen der Pipette und der Zellmembran gekommen ist. Durch ein Leck im Seal können erhebliche Leitfähigkeiten vorgetäuscht werden. Allerdings sind solche Lecks nicht selektiv für unterschiedliche Ionenspezies. Es wurde folglich darauf geachtet, jeweils zum Beginn und Ende jeder Messung Lösungen einzusetzen, bei denen aufgrund der vorhandenen Ionengradienten ein von Null abweichendes Umkehrpotential zu erwarten war. Ferner wurde die Form der Strom-Spannungs-Kennlinie beobachtet. Messungen mit linearer Kennlinie und einem Umkehrpotential von Null trotz bestehender Ionengradienten wurden als Leckströme interpretiert und von der Auswertung ausgeschlossen.

Whole-Cell-Konfiguration

Ist die Whole-Cell-Konfiguration erreicht, findet ein Austausch zwischen dem Zellinneren und der Pipette innerhalb von Sekunden statt (Pusch und Neher 1988). Abhängig von der Größe der Zelle und der Pipettenöffnung dauerte es bei den hier durchgeführten Versuchen bis zu 5 Minuten, bis stabile Verhältnisse erreicht waren. Hierbei dürften auch die Aktivierung bzw. Inaktivierung von Ionenkanälen eine Rolle gespielt haben. Da das Volumen der Pipette weit über jenem der Zelle liegt, dürfte am Ende dieses Äquilibrationszeitraumes die Zusammensetzung der intrazellulären Lösung dem der eingesetzten Pipettenlösung entsprechen.

Hieraus resultiert ein großer Vorteil der Patch-Clamp-Methode gegenüber der Mikroelektrodenteknik. Durch Befüllen der Zellen mit exakt definierten Lösungen werden sichere Kenntnisse über den Transport von Ionen in die Zelle hinein bzw. aus der Zelle hinaus gewonnen. So können einzelne Ionen (z. B. Kalium und/oder Chlorid) gänzlich aus den Lösungen entfernt oder stark reduziert werden, um ihren Beitrag zu den beobachteten Strömen auszuschließen. Demgegenüber bedeutet dies aber auch, dass sich die intrazelluläre Lösung bei Patch-Clamp-Messungen häufig deutlich von der physiologischen Zusammensetzung des Zytoplasmas unterscheidet. Insbesondere können Substanzen, die für die Funktion der untersuchten Kanäle wichtig sind, ausgewaschen werden (Numberger und Draguhn 1996).

Im Gegensatz zur Mikroelektrodenteknik, bei der die scharfen Elektroden durch das *Stratum corneum* geschoben werden, wodurch Zellen im intakten Epithel untersucht werden können,

müssen die Zellen der transportierenden Epithelschichten vor Patch-Clamp-Messungen aus dem Epithelverband isoliert werden. Es darf davon ausgegangen werden, dass hierdurch die Polarität der Zellen verloren geht. Auch eine etwaige Anpassung der Zellen an vorherige Fütterungsbedingungen dürfte durch die Kultivierung unter Standardbedingungen in Zellkultur verloren gehen. Bei der vorliegenden Fragestellung kann diese Standardisierung jedoch durchaus auch als vorteilhaft betrachtet werden.

5.1.4 Mikroelektrodentchnik

Mit der Mikroelektrodentchnik gelingt es, Zellen im nativen Zellverband zu untersuchen. Dabei dürfte bei ausreichend hochohmigem Pipettenwiderstand das intrazelluläre Milieu nahezu unverändert bleiben, zumal es sich beim Pansenepithel um ein funktionelles Synzytium mit großem, zusammenhängendem zytosolischen Bereich handelt.

Für jede mittels Mikroelektrodenmethode durchgeführte Messung wurde ein neues Epithelstück in die Messkammer eingespannt. Die hohe Divergenz der einzelnen Punktionen dürfte demnach auf die Unterschiedlichkeit der verwendeten Epithelstücke zurückzuführen sein, da sie aus einer große Bandbreite an Tieren von verschiedenen Höfen stammten. Aus diesem Grund wurden alle Daten wie bereits beschrieben nur gepaart miteinander verglichen.

Herstellung der Mikroelektroden

Die Herstellung der „double-barreled“ Mikroelektroden ist komplex und mit einem sehr hohen Zeitaufwand verbunden. Die meisten Probleme entstanden im Zusammenhang mit der Silanisierung des pH-Kanals mit Dichlormethylsilan und der sich daran anschließenden Befüllung mit einem H⁺-selektiven Ionophor. Ziel der Silanisierung ist eine hydrophobe Beschichtung der Kapillare, die eine feste Verbindung zum eingefüllten flüssigen Ionenaustauscher herstellen soll. Kommt es dabei zum Übertritt von Silan in die Referenzkapillare, führt dies bei der späteren Einfüllung der backfill-solution zur Bildung von Luftblasen in der Elektrodenspitze. Die Entfernung dieser Luftblasen war zumeist nicht möglich und machte die Elektrode unbrauchbar.

Ein weiterer Punkt war die Durchgängigkeit der Elektroden. Im Bereich der Elektrodenspitze wurden die beiden Kapillaren mit der Hilfe eines Multipipetten-Ziehers zu einer feinen Spitze verschmolzen. Die gefüllten hochohmigen Mikroelektroden mussten mittels eines Bevellers

auf einen gewünschten Widerstandswert von 50 M Ω geschliffen werden. Dieser Herstellungsschritt stellte sich als sehr kritisch heraus, da der Widerstand nach „dem Schleifen“ oftmals zu gering war und viele Elektroden wiederum unbrauchbar wurden.

Entscheidend für eine gute Abdichtung und Messung eines negativen Membranpotentials ist es, die Spitze der Mikroelektrode möglichst fein auszuziehen. Die von uns hergestellten doppelumigen Mikroelektroden hatten zwar häufig Widerstände von > 40 M Ω ; dennoch dürfte der Durchmesser größer gewesen sein als der von einfachen, einlumigen Mikroelektroden, die in früheren Untersuchungen zur Messung des Membranpotentials an ovinen Epithelien zur Anwendung kamen (Leonhard-Marek und Martens 1996; Lang und Martens 1999; Schultheiss und Martens 1999). Vermutlich ist darin auch der Grund zu sehen, weshalb die von uns gemessenen Potentiale im Mittel unterhalb der bei früheren Punktionen am Pansenepithel des Schafes gemessenen Potentiale lagen. Doch auch eine höhere Expression nicht-selektiver Kationenkanäle mit vermehrtem Influx von Na⁺ bei den von uns genutzten Epithelien bovinen Ursprungs stellen eine Erklärungsmöglichkeit dar.

Kriterien für eine stabile Punktion

Das Zellmodell von Powell (1981) basiert auf der Annahme, dass nur eine einzelne Epithelzellreihe die transportlimitierende Barriere darstellt (Powell 1981). Da eine optische Kontrolle bei der verwendeten Mikroelektrodenmethode nicht möglich ist, konnte nicht exakt bestimmt werden, auf welcher Höhe im Epithel die Punktion lag. Mit Blick auf frühere Untersuchungen kann jedoch davon ausgegangen werden, dass sich das mehrschichtige Pansenepithel elektrophysiologisch wie ein zylindrisches Epithel verhält (Lang 1997; Freyer 2005).

Um eine Punktion als erfolgreich und stabil bezeichnen zu können, mussten nachstehende Kriterien erfüllt sein:

1. Ein abrupter Abfall der PD_a, der über mindestens 30 Sekunden stabil blieb und ein Plateau bildete.
2. Die Änderung des Elektrodenwiderstandes durfte nicht größer als 15 % des Ausgangswertes sein. Der Widerstand sollte mindestens 10 M Ω betragen.
3. Das Eigenpotential der verwendeten Elektroden sollte sich während der Messung nur um maximal 3 mV verändern.

Neben den von ionenselektiven oder konventionellen Mikroelektroden erfassten Parametern wurden stets rein transepitheliale Parameter mittels einer im Prinzip konventionellen, doch horizontal ausgerichteten Mikro-Ussing-Kammer erfasst.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Ammoniak-Fluxe und die Auswirkungen der Resorption von Ammoniak auf den serosalen pH-Wert – Messungen in der Ussing-Kammer

Bödeker und Kemkowski (1996) wie auch Abdoun et al. (2005) haben gezeigt, dass die mukosale Zugabe von Ammoniak einen positiven Kurzschlussstrom über das Pansenepithel von Schafen induziert (Bödeker und Kemkowski 1996; Abdoun et al., 2005). Diese Ergebnisse bestätigten sich in den von uns durchgeführten Experimenten am Pansenepithel von Rindern. Sowohl $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ($N = 8$; $n = 40$) als auch $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ($N = 8$; $n = 43$; $p < 0,001$) Ammoniak (pH 6,4) führten zu einer Depolarisation des Epithels bzw. zu einem höheren Kurzschlussstrom über das Pansenepithel gegenüber der Kontrollgruppe ($0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$; $N = 8$; $n = 41$). Ursächlich für diesen Kurzschlussstrom unter „short-circuit“-Konditionen können eine Resorption von Kationen oder eine Anionensekretion sein. Aufgrund der Wahl der Versuchslösungen kommt praktisch nur eine Resorption von NH_4^+ in Frage. Da zunächst eine Sekretion von Cl^- nicht vollständig ausgeschlossen werden konnte, wurden weitere Versuche durchgeführt (siehe Diskussion Kap. 5.2.3.1).

Um weitere Rückschlüsse auf den Resorptionsmechanismus von Ammoniak über das Epithel ziehen zu können, wurde der serosale und damit der Blutseite entsprechende pH-Wert gemessen. Ausgehend von der klassischen Theorie, dass Ammoniak zu großen Teilen in Form von NH_3 über das Pansenepithel diffundiert, müsste dies aufgrund des basischen Charakters zu einer serosalen Alkalinisierung führen. In unseren Messungen stellte sich allerdings heraus, dass es weder bei einer mukosalen Konzentration von $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ noch bei einer Konzentration von $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NH_4Cl zu einer signifikanten Veränderung des serosalen pH-Wertes gegenüber der Kontrollgruppe kam ($p = 0,18$), obschon serosal in beiden Gruppen eine Gesamtkonzentration von über $3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ bzw. über $8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Ammoniak gemessen wurde. Im Rahmen von Kontrolltitrationsversuchen, bei denen der identische serosale Puffer

zum Einsatz kam (Abbildung 13 in Kap. 4.1.2), zeigte sich, dass eine Zugabe von 3 bzw. 8 mmol·l⁻¹ NH₃ zu einer pH-Wert Veränderung in Höhe von ~0,8 bzw. >1,0 (n = 3) führte. Es hätte demzufolge eine deutliche Verschiebung des serosalen pH-Wertes beobachtet werden müssen. Diese Ergebnisse sprechen recht deutlich gegen eine primäre Resorption in der Form von NH₃.

In früheren *in vitro* Experimenten wurden primär Untersuchungen des Gesamtammoniak-Fluxes über das Pansenepithel in Abhängigkeit von verschiedenen mukosalen pH-Werten untersucht. Schon bei Gärtner (1963) stellte sich dabei heraus, dass das Verhältnis zwischen in Form von NH₃ vorliegendem Ammoniak und über das Pansenepithel von Rindern resorbiertem Ammoniak nicht korreliert, was gegen eine reine Diffusion in Form von NH₃ spricht (Gärtner 1963). Auch Abdoun et al. (2005) stellten indirekt fest, dass bei einem mukosalen pH-Wert von 6,4 ca. 70 % der Gesamtmenge von Ammoniak in Form von NH₄⁺ über das Pansenepithel des Schafes resorbiert wird (Abdoun et al., 2005). Bei unseren Messungen wurde anders als in Voruntersuchungen der pH-Wert der serosalen, nur schwach gepufferten Lösung verfolgt. Dadurch bestand die Möglichkeit, das exakte Mengenverhältnis des serosal erscheinenden NH₃ und NH₄⁺ zu bestimmen.

Die Messergebnisse deuten darauf hin, dass Ammoniak bei einem mukosalen pH-Wert in Höhe von 6,4 zum überwiegenden Teil in Form des ionisierten NH₄⁺ aus dem Rinderpansen resorbiert wird und zumindest in der Nettobilanz zu > 98 % in der Form von NH₄⁺ auf die Blutseite gelangt, wobei der simultan zu beobachtende Kurzschlussstrom für einen elektrogenen Transportprozess spricht.

5.2.2 Identifizierung von Ionenströmen über die Membran von bovinen Pansenepithelzellen in Patch-Clamp-Versuchen

In Ussing-Kammer-Versuchen kann lediglich der Netto-Transport über das gesamte Epithel beurteilt werden. Eine Interaktion mit anderen Ionen wie z. B. K⁺, Na⁺ und Cl⁻ kann dabei nicht ausgeschlossen werden. Insbesondere kann aber nicht oder zumindest nur schwerlich zwischen einem Transport über Ionenkanäle, einem Transport über elektrogene Co-Transportprozesse oder parazellulärem Transport differenziert werden. Zur Klärung dieser Frage wurden in der Folge Patch-Clamp-Experimente an kultivierten isolierten Pansenzellen

von Rindern durchgeführt. Wie schon eingangs erwähnt, lässt sich bei Patch-Clamp-Messungen der elektrochemische Gradient exakt einstellen, wodurch die Triebkräfte für den Efflux von Ionen durch entsprechende Kanäle direkt moduliert werden können. Resultierend aus der fehlenden Sättigung kommt es bei entsprechender Größe der Triebkraft zu Strömen durch die Kanalpore, deren Größe Dimensionen erreicht, die messbar sind. Demgegenüber sind Co- und Antitransporter in den meisten Fällen elektroneutral und selbst im Falle einer Elektrogenität so langsam, dass der Nachweis eines Stroms nicht gelingt.

In den vorliegenden Experimenten wurde die Zusammensetzung der Pipetten- und Badlösungen gezielt so ausgewählt, dass die Konzentrationen von Na^+ , K^+ , und Mg^{2+} im Innen- und Außenraum der Zelle identisch waren. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass jede Abweichung des Umkehrpotentials von Null nicht auf diese drei Kationen zurückführbar wäre. Weiterhin war die Intrazellulärlösung so konzipiert, dass Cl^- weitestgehend durch das große Anion Glukonat ersetzt wurde. Da Pansenepithelzellen nur in sehr eingeschränktem Umfang permeabel für das Glukonat Ion sind, darf ferner davon ausgegangen werden, dass ein Strom bei negativem Pipettenpotential auf den Influx von Kationen aus dem Bad in die Zelle zurückzuführen sein dürfte – und nicht oder nur zu einem sehr geringen Anteil auf den Efflux von Glukonat aus der Zelle heraus (Georgi et al., 2013). Durch Variation der extrazellulären Badlösung und Beobachtung des Stroms bei negativem Potential kann also auf die Leitfähigkeit der Zelle für diverse Kationen geschlossen werden.

Eine Voraussetzung für die Verwertbarkeit von Patch-Clamp-Messungen ist es, zunächst einmal sicherzustellen, dass ein echter Seal zwischen der Pipette und der Zellmembran hergestellt wurde. Auch nach Verlegung der Pipettenöffnung durch kleine Luftblasen oder sonstige Partikel kann ein Widerstand im Gigaohm-Bereich auftreten und einen Seal vortäuschen. Bei den daraufhin gemessenen Strömen handelt es sich aber um Leckströme, deren Strom-Spannungs-Kennlinie linear ist und durch den Nullpunkt läuft. Demgegenüber kann man von einem intakten Seal ausgehen, wenn die Strom-Spannungs-Kennlinie eine Krümmung aufweist und das Umkehrpotential als Schnittpunkt mit der Potentialachse eindeutig von Null abweicht. Aus diesem Grund wurde zu Beginn der Versuche stets ein Chloridgradient angelegt mit $[\text{Cl}]_o > [\text{Cl}]_i$. Da Pansenepithelzellen einen Anionenkanal exprimieren, wird ein negatives Umkehrpotential erwartet (Stumpff et al., 2009a; Georgi et al., 2013). In den weiteren Versuchsschritten wurde jedoch Chlorid auch extrazellulär durch

Glukonat substituiert, um eine gezielte Untersuchung der Kationenleitfähigkeit zu ermöglichen.

5.2.2.1 Chloridleitfähigkeit

Der Versuch, einen Seal zu erzeugen, erfolgte aus den oben genannten Gründen stets unter Standardbedingungen in NaCl-haltiger Perfusionsbadlösung. Im Erfolgsfall zeigte sich bei den mit Na⁺-Glukonat gefüllten Pansenepithelzellen ein negatives Umkehrpotential (-24,28 mV, n = 8), das aufgrund der Zusammensetzung der Versuchslösungen allein durch einen Einstrom von Chlorid erklärbar ist (Abdoun et al., 2005; Stumpff et al., 2009b; Georgi et al., 2013). Bei früheren Messungen, bei denen Ca²⁺-haltige Pipettenlösungen eingesetzt wurden, wurden deutlich niedrigere Umkehrpotentiale von ungefähr ca. -30 mV gemessen (Brinkmann 2007; Georgi et al., 2013). Diese niedrigeren Umkehrpotentiale bestätigen die Hemmung der Kationenleitfähigkeit durch intrazelluläre divalente Kationen (Leonhard-Marek et al., 2005). Bei den in dieser Arbeit verwendeten Ca²⁺-freien Pipettenlösungen trug Na⁺ offenbar stärker zur Gesamtleitfähigkeit und damit zum Umkehrpotential bei. Bei mit K⁺-Glukonat gefüllten Zellen konnte ebenfalls ein negatives Umkehrpotential festgestellt werden (-18,59 mV, n = 7), zu welchem aber ebenso der Kaliumgradient einen Beitrag geleistet haben dürfte.

Nach der Etablierung der Whole-Cell-Konfiguration in NaCl-Lösung erfolgte unmittelbar der Wechsel auf eine NMDG-Glukonatlösung als Ausgangslösung zur Messung der Ammoniumleitfähigkeit. In dieser Lösung waren alle Anionen (im wesentlichen Glukonat (~130 mmol/l)) auf beiden Seiten der Membran gleichmäßig verteilt. Ein Beitrag von Anionen zum Umkehrpotential kann demzufolge ausgeschlossen werden. Bei den mit Na⁺-Glukonat gefüllten Pansenepithelzellen blieb das Umkehrpotential nach dem Wechsel auf die NMDG-Glukonatlösung negativ und ohne signifikante Abweichung (p = 0,902) vom in der NaCl-Lösung ermittelten Wert. Für dieses negative Potential dürfte ein Efflux von Na⁺ aus der Zelle in die Badlösung verantwortlich sein. Bemerkenswert ist in diesem Kontext der Umstand, dass in Zellen des Pansenepithels vom Rind unter den gewählten Bedingungen der Efflux von Natrium in etwa dem Influx von Chlorid zu entsprechen scheint, wozu der geringe Ca²⁺-Gehalt der Pipettenlösung beigetragen haben dürfte (vgl. Leonhard-Marek et al., 2005; Brinkmann 2007).

Bei den mit K^+ -Glukonat gefüllten versetzten Zellen wurde beim Wechsel von NaCl zu NMDG-Glukonatlösung eine signifikante Hyperpolarisation (auf $-40,39$ mV; $n = 7$; $p = 0,004$) beobachtet. Verantwortlich für dieses signifikant niedrigere Potential dürfte eine im Vergleich zu Cl^- , NMDG⁺ oder Na^+ höhere Permeabilität der Zellen für K^+ sein. An Pansenepithelzellen des Schafes war die Permeabilität für K^+ ebenfalls deutlich höher ausgeprägt als es für Na^+ der Fall war (Leonhard-Marek et al., 2005).

5.2.2.2 Ammoniumleitfähigkeit

Beim Ersatz der extrazellulären NMDG-Glukonatlösung durch eine 137 mmol·l⁻¹-haltige NH_4^+ -Glukonatlösung kam es bei mit Na-Glukonat gefüllten Zellen zu einem signifikanten Anstieg des Einwärtsstroms bei negativem Pipettenpotential ($p = 0,008$). Gleichzeitig kam es zu einer deutlichen Depolarisation des Umkehrpotentials auf $22,75 \pm 4,97$ mV ($p = 0,001$). Bei den vorhandenen Gradienten können diese Beobachtungen ausschließlich auf einem Influx von NH_4^+ beruhen. Auch bei mit K-Glukonat gefüllten Zellen wurde eine signifikante Zunahme des Einwärtsstroms beobachtet ($p = 0,016$). Allerdings kam es hier im Vergleich zu den mit Na-Glukonat gefüllten Zellen zu einer deutlich geringeren Depolarisation ($4,21 \pm 2,38$ mV) entsprechend dem bei dieser Konfiguration zu erwartenden Efflux von K^+ .

Interessanterweise kam es bei beiden Versuchsreihen durch den Wechsel zur NH_4^+ -haltigen Perfusionsbadlösung gleichzeitig zu einem Anstieg des Auswärtsstroms, der im Fall der mit K^+ -Glukonat gefüllten Zellen auch signifikant ausfiel³ ($n = 7$; $p = 0,016$). Insgesamt ähneln diese Befunde den an Pansenepithelzellen von Schafen gemachten Beobachtungen (Abdoun et

³ Erklärbar ist dies möglicherweise durch die Annahme schwellungsaktivierter Kanäle. Im klassischen Modell erfolgt die Diffusion von NH_3 in die Zelle zunächst getrieben vom Konzentrationsgradienten. Intrazellulär bindet NH_3 dann Protonen und wird zu NH_4^+ , das aufgrund des negativen Haltepotentials von -40 mV nur schwer aus der Zelle austreten kann. Erwartet wird eine Schwellung der Zellen, wenn keine weiteren Effluxmechanismen für NH_4^+ vorhanden sind. Ausgehend von einem Haltepotential von -40 mV wäre nach Nernst erst ab einer intrazellulären Konzentration über 612 mmol·l⁻¹ mit einem erneuten Austritt aus der Zelle zu rechnen. Zu bedenken ist bei diesen Überlegungen allerdings, dass eine Zellschwellung durch die offene Verbindung zur Patch-Pipette verhindert oder erschwert wird. Erwogen werden sollte daher auch eine weitere Möglichkeit. Das Zytosol der Zelle wird aufgrund des NH_3 -Einstroms alkalisch (Müller et al., 2000) mit möglicher Aktivierung einer Kationenleitfähigkeit mit nachfolgender Erhöhung des Auswärtsstroms bei $+100$ mV. Ferner ist es denkbar, dass es durch den vermehrten Einstrom von Kationen (NH_4^+) zur intrazellulären Belegung von Bindungsstellen für Ca^{2+} kommt. Der im Vergleich zu Ca^{2+} geringe Durchmesser des NH_4^+ -Ions und die nur einfache positive Ladung dürften die Durchlässigkeit der Pore für Kationen (Na^+ , K^+) erhöhen.

al., 2005). Hier kam es beim Wechsel zu einer 130 mmol·l⁻¹-haltigen NH₄Cl-Perfusionsbadlösung ebenso zu einer Zunahme des Einwärtsstroms bei signifikanter Depolarisation des Umkehrpotentials. Entsprechend dem Beitrag von Chlorid blieb das Potential bei diesen Versuchen mit -6 ± 4 mV jedoch im negativen Bereich (Abdoun et al., 2005).

5.2.2.3 Modellvorstellung

Sowohl der Kurzschlussstrom in der Ussing-Kammer als auch der Anstieg des Einwärtsstroms in den Patch-Clamp-Experimenten deuten auf einen elektrogenen Transport von NH₄⁺ über das Pansenepithel hin. Das einfachste Transportmodell, welches diesen Zusammenhang erklärt, ist eines, bei dem der apikale wie auch der basolaterale Transport über einen Ionenkanal erfolgt. Auf Basis der vorhandenen Fachliteratur kommen die folgenden zwei Kanalgruppen in Frage:

1. Ein Transport von NH₄⁺ über Kaliumkanäle (Leonhard-Marek und Martens 1996; Abdoun et al., 2005)
2. Ein Transport von NH₄⁺ über nicht-selektive Kationenkanäle (Lang und Martens 1999; Schultheiss und Martens 1999; Leonhard-Marek 2002; Leonhard-Marek et al., 2005)

Kaliumkanäle sind hochselektiv und die Porenregion ist so konfiguriert, dass Na⁺ und Ca²⁺ nur in Spuren passieren können. Jedoch existieren zahlreiche Hinweise, dass das Ammonium-Ion aufgrund seiner dem Kalium ähnelnden äußeren Elektronenhülle auch die Pore von Kaliumkanälen passieren kann (Mudry et al., 2006). Umgekehrt haben nicht-selektive Kationenkanäle eine wenig selektive Leitfähigkeit für verschiedenste monovalente und divalente Kationen (Van Driessche et al., 1988; Schultheiss und Martens 1999; Leonhard-Marek 2002; Brinkmann 2007). Eine Permeabilität für NH₄⁺-Ionen ist von daher als sehr wahrscheinlich anzusehen.

Sowohl am intakten Vormagenepithel als auch an isolierten Pansenepithelzellen von Schafen wurde schon mehrfach gezeigt, dass divalente Kationen eine hemmende Wirkung auf die Leitfähigkeit für verschiedene monovalente Kationen aufweisen (Lang und Martens 1999; Schultheiss und Martens 1999; Leonhard-Marek 2002; Brinkmann 2007). Allerdings

existieren bisher keinerlei Daten für das physiologisch wichtige Kation NH_4^+ . Am intakten Epithel in der Ussing-Kammer kann nur schwer geklärt werden, ob der Transport parazellulär zwischen den Zellen oder transzellulär durch entsprechende Kationenkanäle erfolgt. Es wurde folglich zunächst mittels Patch-Clamp-Messungen an isolierten Pansenepithelzellen untersucht, ob die Leitfähigkeit der Zellmembran für NH_4^+ eine Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Sensitivität besitzt.

5.2.2.4 Divalente Kationen-Sensitivität der Ammoniakleitfähigkeit

Der Entzug der divalenten Kationen Ca^{2+} und Mg^{2+} in der extrazellulären $137 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ -haltigen NH_4^+ -Perfusionsbadlösung führte sowohl bei den mit Na^+ -Glukonat als auch bei den mit K^+ -Glukonat gefüllten Pansenzellen zu einer signifikanten Zunahme des Einwärtsstroms ($p = 0,008$ bzw. $p = 0,016$) was einem vermehrten Einstrom von NH_4^+ durch einen durch divalente Kationen hemmbaren Kanal entspricht.

Der Entzug der divalenten Kationen hatte dagegen keinen signifikanten Einfluss auf den bei $+100 \text{ mV}$ gemessenen Auswärtsstrom ($p = 0,11$ bzw. $p = 0,81$). Dies ist nicht verwunderlich, da es bei einem Potential von $+100 \text{ mV}$ zu einer Abstoßung von Kationen kommt; eine Interaktion von divalenten Kationen mit den Kanälen wird somit eher unwahrscheinlich. Gleichartige Effekte zeigten sich bereits bei Untersuchungen der K^+ - und Na^+ -Leitfähigkeit von ovinen Pansenepithelzellen (Leonhard-Marek et al., 2005).

Während bei mit K^+ -Glukonat gefüllten Zellen eine deutliche Depolarisation zu erkennen war ($p = 0,021$), konnte bei den mit Na^+ -Glukonat gefüllten Zellen keine signifikante ($p = 0,89$) Veränderung des Umkehrpotentials festgestellt werden. Diese Beobachtung und die Befunde aus den vorangegangenen Abschnitten sind gut mit dem klassischen Goldman-Hodgkin-Katz-Modell zu erklären (siehe Kap. 5.2.2.5). Diesem klassischen Modell zufolge wird das Umkehrpotential der Zellen einerseits durch die Ionenkonzentration und andererseits durch die Leitfähigkeit der Membran für die verschiedenen Ionen bestimmt. Im vorliegenden Fall kommt es zu keiner Veränderung der Ionenkonzentrationen, sondern lediglich zu einer Veränderung der Leitfähigkeit über die Membran.

5.2.2.5 Die Auswirkung verschiedener Lösungen auf das Umkehrpotential

Das Umkehrpotential der Zellen wird durch die Ionenkonzentration [Ion] und die Leitfähigkeit (Permeabilität, P) der Membran für die verschiedenen Ionen bestimmt. Die gemessenen Umkehrpotentiale in Abhängigkeit von den verwendeten Lösungen lassen sich mit einem einfachen Modell erklären. Dabei wird von drei verschiedenen Kanaltypen ausgegangen:

1. Ein Anionenkanal mit $p_{Cl} > p_{Glukonat}$ (Stumpff et al., 2009a; Georgi et al., 2013), dessen Permeabilität mit „ P_{Cl} “ bezeichnet wird.
2. Ein im Wesentlichen für Kalium permeabler Kanal, der keine (oder nur geringe) Interaktionen mit den divalenten Kationen Ca^{2+} und Mg^{2+} aufweist (P_K).
3. Ein durch divalente Kationen modulierbarer, nicht-selektiver Kationenkanal mit einer Leitfähigkeit für Na^+ , K^+ und NH_4^+ . Dabei ist die Leitfähigkeit des Kanals für diese drei Kationen unterschiedlich, wird aber in gleicher Weise durch Blocker bzw. divalente Kationen moduliert. Die Leitfähigkeit dieses NSCC für Natrium wird mit „ P_{Kat, Na^+} “ bezeichnet, jene für NH_4^+ hingegen mit „ P_{Kat, NH_4^+} “ und die für K^+ mit „ P_{Kat, K^+} “.

Wichtig in diesem Zusammenhang ist, dass intrazellulär (also in der Pipettenlösung) kein NH_4^+ enthalten ist, so dass ein entsprechender Term im Nenner entfällt. Sieht man nun von den Beiträgen der nur in geringen Konzentrationen vorhandenen Kationen Ca^{2+} und Mg^{2+} sowie vom Beitrag des nur wenig permeablen Anions Glukonat in der Pipettenlösung ab, lautet die Goldman Hodgkin-Katz Gleichung wie folgt:

$$E_{Rev} \approx \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \frac{P_{Kat, Na^+} [Na^+]_a + P_{Kat, K^+} [K^+]_a + P_{Kat, NH_4^+} [NH_4^+]_a + P_{K^+} [K^+]_a + P_{Cl^-} [Cl^-]_i}{P_{Kat, Na^+} [Na^+]_i + P_{Kat, K^+} [K^+]_i + P_{K^+} [K^+]_i + P_{Cl^-} [Cl^-]_a} \quad (1)$$

Aufgrund des hohen Glukonatanteils in der Pipettenlösung ist die intrazelluläre Chloridkonzentration $[Cl^-]_i$ gering und wird daher vernachlässigt. Näherungsweise ergibt sich daraus:

$$E_{Rev} \approx \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \frac{P_{Kat, Na^+} [Na^+]_a + P_{Kat, K^+} [K^+]_a + P_{Kat, NH_4^+} [NH_4^+]_a + P_{K^+} [K^+]_a}{P_{Kat, Na^+} [Na^+]_i + P_{Kat, K^+} [K^+]_i + P_{K^+} [K^+]_i + P_{Cl^-} [Cl^-]_a} \quad (2)$$

Allgemein wird in NaCl-haltiger Badlösung ohne NH_4^+ daraus:

$$E_{Rev} \approx \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \frac{P_{Kat,Na^+} [Na^+]_a + P_{Kat,K^+} [K^+]_a + P_{K^+} [K^+]_a}{P_{Kat,Na^+} [Na^+]_i + P_{Kat,K^+} [K^+]_i + P_{K^+} [K^+]_i + P_{Cl^-} [Cl^-]_a} \quad (3)$$

Zunächst werden die Zellen, die mit **Na⁺-Glukonatlösung** gefüllt sind, betrachtet. Im Gegensatz zur intrazellulären Natriumkonzentration $[\text{Na}^+]_i$ (138 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) ist die Konzentration von Kalium $[\text{K}^+]_i$ (5 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) in den Zellen sehr gering, weshalb der Term $k \cdot P_{Kat,K^+} [\text{K}^+]_i + P_{K^+} [\text{K}^+]_i$ vernachlässigbar ist.

In NaCl-haltiger Lösung ergibt sich daher:

$$E_{Rev} \approx \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \frac{P_{Kat,Na^+} [Na^+]_a + P_{Kat,K^+} [K^+]_a + P_{K^+} [K^+]_a}{P_{Kat,Na^+} [Na^+]_i + P_{Cl^-} [Cl^-]_a} \quad (4)$$

Aufgrund der hohen Leitfähigkeit der Pansenzellen für Chlorid via Anionenkanal (Stumpff et al., 2009b; Georgi et al., 2013) kommt es zu einem negativen Umkehrpotential (hier: -24 mV).

Bei einem Wechsel zu einer NMDG-Glukonatlösung reduziert sich nun die extrazelluläre Chloridkonzentration $[\text{Cl}^-]_a$ von 140 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ auf 10 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ und kann daher ebenfalls vernachlässigt werden. Daraus ergibt sich:

$$E_{Rev} \approx \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \frac{P_{Kat,Na^+} [Na^+]_a + P_{Kat,K^+} [K^+]_a + P_{K^+} [K^+]_a}{P_{Kat,Na^+} [Na^+]_i} \quad (5)$$

Da die extrazelluläre Konzentration von Kalium (5 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) und Natrium (1 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) klein gegenüber dem in der Pipette enthaltenen 137 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Na^+ sind, wird der Zähler klein gegenüber dem Nenner. Das Umkehrpotential bleibt damit negativ. Grund dafür ist die Zunahme des Natriumausstroms, da $[\text{Na}^+]_i > [\text{Na}^+]_a$.

Bei Zugabe von NH_4 -Glukonat in die extrazelluläre Lösung und unter Berücksichtigung der Tatsache, dass nun $[\text{K}^+]_a$ und $[\text{Na}^+]_a$ sehr gering im Gegensatz zu den enthaltenen 137 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NH_4^+ sind, reduziert sich die Näherung auf:

$$E_{Rev} \approx \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \frac{P_{Kat,NH_4^+} [\text{NH}_4^+]_a}{P_{Kat,Na^+} [\text{Na}^+]_i} \quad (6)$$

In den Patch-Clamp-Messungen kam es durch den Wechsel zu einer NH_4 -Glukonatlösung zu einer signifikanten Depolarisation des Umkehrpotentials. Es lässt sich folgern, dass $P_{Kat, \text{NH}_4^+} > P_{Kat, \text{Na}^+}$ ist. Der Einstrom von NH_4^+ überwiegt gegenüber dem aufgrund des Natriumgradienten vorhandenen Ausstroms von Natrium.

In unserem Modell bewirken die Kationen Ca^{2+} und Mg^{2+} beim Zusammentreffen mit einem NSCC dessen Blockade. Nicht blockierte Kanäle bleiben in gleicher Weise für sämtliche Kationen durchlässig. Damit steigt die Permeabilität der Membran bei Entfernung dieser divalenten Kationen für alle monovalenten Kationen um den gleichen Faktor „k“ an:

$$E_{Rev} \approx \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \frac{k \cdot P_{Kat, \text{NH}_4^+} [\text{NH}_4^+]_a}{k \cdot P_{Kat, \text{Na}^+} [\text{Na}^+]_i} \quad (7)$$

In diesem Fall kann der Faktor „k“ nun aus der Gleichung gekürzt werden und hat demzufolge **keinen Einfluss auf das Umkehrpotential**. Auch bei der Wirkung anderer Blocker bzw. Aktivatoren ist keine Wirkung auf das Potential zu erwarten. Voraussetzung dafür ist jedoch, dass der Beitrag anderer, nicht beeinflusster Leitfähigkeiten zum Umkehrpotential gering ist.

Betrachtet man nun die mit **K^+ -Glukonatlösung** gefüllten Zellen, offenbart sich hingegen eine ganz andere Situation. Ausgehend von einer extrazellulären NaCl -Lösung kann nun der Beitrag des intrazellulären Natriums $[\text{Na}^+]_i$ vernachlässigt werden, nicht jedoch der des in der Pipettenlösung enthaltenen Kaliums $[\text{K}^+]_i$. Es ergibt sich die Näherung:

$$E_{Rev} \approx \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \frac{P_{Kat, \text{Na}^+} [\text{Na}^+]_a + P_{Kat, \text{K}^+} [\text{K}^+]_a + P_{\text{K}^+} [\text{K}^+]_a}{P_{Kat, \text{K}^+} [\text{K}^+]_i + P_{\text{K}^+} [\text{K}^+]_i + P_{\text{Cl}^-} [\text{Cl}^-]_a} \quad (8)$$

In diesem Fall strömt Chlorid ein und Kalium aus. Es ergibt sich daraus wieder ein negatives Umkehrpotential, welches bei unseren Messungen bei -18 mV lag.

Unter extrazellulärer NMDG-Glukonatlösung sinkt nun die Chloridkonzentration außerhalb der Zelle wiederum auf $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ und ist daher sehr klein gegenüber $[\text{K}^+]_i$ ($124 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$).

$$E_{Rev} \approx \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \frac{P_{Kat, \text{Na}^+} [\text{Na}^+]_a + P_{Kat, \text{K}^+} [\text{K}^+]_a + P_{\text{K}^+} [\text{K}^+]_a}{P_{Kat, \text{K}^+} [\text{K}^+]_i + P_{\text{K}^+} [\text{K}^+]_i} \quad (9)$$

Da die Permeabilität für Kalium größer als die für Natrium ist $P_{K^+} > P_{Kat,Na^+}$ (Abdoun et al., 2005; Leonhard-Marek et al., 2005) ist das Umkehrpotential niedriger (-40 mV statt -24 mV) als bei den mit Na-Glukonat gefüllten Zellen (5).

Bei dem Wechsel zu einer NH_4 -Glukonatlösung liegen $[K^+]_a$ und $[Na^+]_a$ wieder nur in sehr geringer Konzentration im Vergleich zu den $137 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} NH_4^+$ in der Badlösung vor. Es lässt sich folgende Näherung aufstellen:

$$E_{Rev} \approx \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \frac{P_{Kat,NH_4^+} [NH_4^+]_a}{P_{Kat,K^+} [K^+]_i + P_{K^+} [K^+]_i} \quad (10)$$

Unter diesen Bedingungen kommt es zu einem Einstrom von NH_4^+ welcher zur signifikanten Depolarisation führt. Aufgrund des im Vergleich zum Natrium (6) stärkeren Ausstroms von Kalium aus der Zelle heraus ist dieser Wert wieder kleiner als in (6) (4 mV statt 22 mV).

Wird durch den Entzug von Ca^{2+} und Mg^{2+} die Anzahl der offenen, nicht-selektiven Kationenkanäle um den Faktor „k“ erhöht, wird der Zähler um den gesamten Faktor „k“ vervielfacht, wohingegen der Nenner nicht im gleichen Maße ansteigt.

$$E_{Rev} \approx \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \frac{k \cdot P_{Kat,NH_4^+} [NH_4^+]_a}{k \cdot P_{Kat,K^+} [K^+]_i + P_{K^+} [K^+]_i} \quad (11)$$

Anders als in (7), in der der Faktor gekürzt werden kann und ein Entzug der divalenten Kationen somit keinen Einfluss auf das Umkehrpotential hat, kann nun der Faktor nicht einfach gekürzt werden. Der Beitrag der reinen Kaliumleitfähigkeit zum Umkehrpotential sinkt, der Zähler wird im Gegensatz zum Nenner größer und es kommt zur beobachteten **Depolarisation des Umkehrpotentials** (hier 13 mV):

$$E_{Rev} \approx \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \frac{P_{Kat,NH_4^+} [NH_4^+]_a}{P_{Kat,K^+} [K^+]_i + \frac{P_{K^+}}{k} [K^+]_i} \quad (12)$$

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unsere Patch-Clamp-Ergebnisse also auf eine Ca^{2+} - und Mg^{2+} -sensitive Leitfähigkeit für Ammonium am Pansenepithel des Rindes hindeuten.

Eine solche Leitfähigkeit für Ammonium konnte bereits an Froschhauptepithel sowie am Blasenepithel von Kröten nachgewiesen werden (Van Driessche und Zeiske 1985; Van Driessche et al., 1987).

Die Interaktion der nicht-selektiven Kationenkanäle mit Ca^{2+} und Mg^{2+} kann gut durch das Modell eines „open-pore“ Blocks beschrieben werden. Dies bedeutet, dass sich die Leitfähigkeit für alle Ionen in gleicher Weise ändert und es nicht zu einer Verschiebung der relativen Permeabilität für unterschiedliche Kationen durch nicht-selektive Kationenkanäle kommt.

5.2.3 Der Einfluss des mukosalen pH-Wertes auf die Ammoniakresorption und die Auswirkung auf den pH_i - Messungen mittels Mikroelektrodenteknik

Patch-Experimente ermöglichen zwar die Aufzeichnung kleinster Ionenströme, lassen aber keine Aussage über die Lage der Kanäle zu, da es sich um isolierte Zellen und kein polares Gewebe handelt. Im Folgenden wurden daher Messungen an intakten Geweben durchgeführt. Dabei wurde mittels einer Kombination von Ussing-Kammer- und Mikroelektrodenteknik der Einfluss von verschiedenen mukosalen pH-Werten auf die apikale und transepitheliale Potentialdifferenz über das Pansenepithel von Rindern und die Auswirkung auf den intrazellulären pH-Wert von Pansenepithelzellen untersucht.

Abdoun et al. (2005) konnten zeigen, dass der mukosale pH-Wert einer NH_4Cl -haltigen Pufferlösung einen Einfluss auf den Natriumflux über das Pansenepithel von Schafen hat (Abdoun et al., 2005). Die Autoren schlossen daraus, dass es bei einem pH-Wert von 6,4 durch den vermehrten Influx von Ammoniak in Form von NH_4^+ über die apikale Membran zu einer intrazellulären Ansäuerung mit verstärkter Aktivierung des Na^+/H^+ -Austauschers kommt. Bei einem pH-Wert in Höhe von 7,4 war die Hemmung des elektroneutralen Na^+ -Transports mittels Na^+/H^+ -Austauscher festzustellen (Abdoun et al., 2005). Die Autoren folgerten hieraus, dass am Pansenepithel des Schafes unter diesen Versuchsbedingungen der Influx des lipophilen NH_3 überwog.

Unsere Messungen am Pansenepithel von Rindern zeigten, dass der mukosale Ersatz von $40 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NMDG}^+$ durch eine äquimolare Menge NH_4^+ bei einem mukosalen pH-Wert von 6,4 zu einer signifikanten Depolarisation des transepithelialen (ΔPD_i ; $2,78 \pm 0,37 \text{ mV}$; $p <$

0,05) und des apikalen (ΔPD_a : $2,13 \pm 0,5$ mV; $p > 0,05$) Potentials führte. Darüber hinaus kam es zu einem signifikanten Abfall des intrazellulären pH-Wertes (ΔpH_i : $-0,13 \pm 0,02$; $p < 0,05$). Auch unter mukosal Na^+ -freien Bedingungen konnte eine Depolarisation sowohl des apikalen als auch transepithelialen Potentials durch Applikation von NH_4^+ beobachtet werden.

Diese Ergebnisse entsprechen im Wesentlichen der Hypothese von Abdoun (2005), nach der es im Anschluss an die Exposition mit NH_4Cl zum Einstrom von NH_4^+ in die Epithelzellen mit anschließender Ansäuerung kommt (Abdoun et al., 2005). Allerdings spricht die Depolarisation des transepithelialen Potentials auch nach Ersatz von Na^+ eindeutig gegen einen ausschließlichen Efflux in der Form von NH_3 und für den elektrogenen Transport von NH_4^+ auch über die basolaterale Membran. Es muss jedoch davon ausgegangen werden, dass ein gewisser Teil des in die Zelle hineingeströmten NH_4^+ die Zelle als NH_3 verlässt. Die im Zytosol verbleibenden Protonen führen dann zur Ansäuerung und Aktivierung des elektroneutralen Na^+ -Transportes. Dabei gilt es immer wieder zu bedenken, dass $1 \mu mol \cdot l^{-1}$ Protonen ausreichen, um den pH-Wert einer neutralen, ungepufferten Lösung auf pH 6 anzusäuern.

Unterschiede zu Abdoun (2005) zeigten sich dagegen bei einem mukosalen pH in Höhe von 7,4. Die in unseren Messungen bei diesem pH-Wert beobachtete signifikante Depolarisation des transepithelialen (ΔPD_t : $2,53 \pm 0,46$ mV; $p > 0,05$) und des apikalen (ΔPD_a : $1,01 \pm 1,8$ mV; $p > 0,05$) Potentials sprechen gegen eine überwiegende Diffusion von NH_3 . Insbesondere die dabei von uns gemessene signifikante intrazelluläre Ansäuerung (ΔpH_i : $-0,16 \pm 0,05$; $p < 0,05$) spricht dafür, dass beim Rind auch bei einem mukosalen pH von 7,4 der Efflux aus dem Pansen überwiegend in Form von NH_4^+ erfolgt.

Am Pansenepithel von Schafen, die mit Heu gefüttert wurden, konnte hingegen nur bei einem pH-Wert von 6,4 eine signifikante Absenkung des pH_i gezeigt werden ($n = 5$; $p < 0,05$); bei pH 7,4 kam es zu keiner Ansäuerung des Zytosols ($n = 5$; $p > 0,05$) (Lu et al., 2014). Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz ergibt sich aus der Betrachtung der unterschiedlichen Spezies (Schaf bzw. Rind), oder aber durch Berücksichtigung der unterschiedlichen Fütterung (Heu bzw. Konzentrat). Abdoun et al. (2003) zeigten so in ihrer *in vitro* Studie, dass der Effekt von Ammoniak auf den Na^+ -Transport am Pansenepithel von Schafen stark fütterungsabhängig ist (Abdoun et al., 2003). In dieser Studie, die ausschließlich

bei einem mukosalen pH von 7,4 durchgeführt wurde, kam es allein bei Epithelien von mit Heu gefütterten Schafen durch Ammoniak zur Reduktion des Na^+ -Transportes mittels Na^+/H^+ -Austauscher (entsprechend einer Alkalinisierung durch Influx von NH_3). Bei mit Konzentrat gefütterten Tieren führte die Ammoniakexposition hingegen zu einer Stimulation des Na^+/H^+ -Austauschers, entsprechend der auch von uns beim Rind beobachteten Ansäuerung des Zytosols. Sie schlossen aus ihren Ergebnissen, dass bei konzentratgefütterten Schafen der Anteil des Gesamtammoniaks, der in protonierter Form als NH_4^+ resorbiert wurde, deutlich gegenüber nur mit Heu gefütterten Schafen erhöht war (Abdoun et al., 2003). Dieser fütterungsabhängige Effekt ist ebenso auf unsere Ergebnisse übertragbar, da die zur Schlachtung bestimmten Rinder zumeist sehr konzentratreich gefüttert werden.

5.2.3.1 Die Lokalisation der ruminalen Leitfähigkeit für Cl^- mit konventionellen Mikroelektroden

Viele Epithelien exprimieren apikale Leitfähigkeiten für Chlorid. Diese Möglichkeit ist auch für das Pansenepithel immer wieder diskutiert worden. (Patho-)Physiologisch spielen diese Leitfähigkeiten im Bereich des Darmes oder der Lunge eine große Rolle bei der Produktion von Sekreten, die dem Ausspülen von Erregern dienen. Zwar liegen anders als beim Darm keine Anzeichen für eine cAMP-induzierbare Leitfähigkeit im Sinne eines CFTR am Pansen des Schafs vor (Wolffram et al., 1989; Gäbel et al., 1999); auch erscheint eine Sekretion von Cl^- am Pansen anders als an sekretorischen Epithelien als wenig sinnvoll, um pathogene Erreger auszuspülen. Ebenso sprechen Punktionsmessungen – zumindest am ovinen Pansen – gegen eine apikale Leitfähigkeit für Chlorid (Leonhard-Marek et al., 2006).

Dennoch muss am Pansen des Rindes die Möglichkeit eines Cl^- -Effluxes aus einer entsprechenden mukosalen Leitfähigkeit als Ursache für die Depolarisation der Zellen nach der Exposition mit NH_4^+ in Betracht gezogen werden. Zur Untersuchung dieser Frage wurden weitere Punktionsmessungen durchgeführt, bei denen das in der mukosalen Lösung befindliche Cl^- fast komplett durch das große und weitestgehend impermeable Anion Glukonat ersetzt wurde.

Es zeigte sich, dass es nach Entzug von apikalem Cl^- zu einer signifikanten Hyperpolarisation des apikalen Potentials kam ($N/n = 4/11$; $p < 0,05$). Geht man aber von einer apikalen Expression eines Cl^- -Kanals aus, hätte der Entzug des mukosalen Chlorids zu einer Depolarisation des apikalen Potentials führen müssen. Diese Beobachtungen lassen sich nicht

mit einer apikalen Leitfähigkeit für Chlorid vereinbaren; eine Sekretion von Chlorid als Ursache für die NH_4^+ -induzierte Depolarisation des apikalen wie auch transepithelialen Potentials scheidet von daher aus (Daten veröffentlicht in Georgi et al., 2013). Auch der fehlende Effekt einer serosalen Zugabe von Bumetanid in unseren Untersuchungen am Rind und in Voruntersuchungen am Schaf spricht gegen eine Sekretion von Chlorid durch das Pansenepithel nach dem am Colon bekannten Muster (Martens und Gäbel 1988; Martens et al., 1991).

5.2.3.2 Die Wirkung von Ammoniak auf den pH_i von Zellen in Zellkultur

Auf den ersten Blick betrachtet scheint die von Abdoun (2005) indirekt und von uns direkt beobachtete ansäuernde Wirkung von Ammoniak auf den intrazellulären pH von intaktem Epithel in der Ussing-Kammer im Gegensatz zu Befunden von Müller et al. (2000) an kultivierten PEZ des Schafes zu stehen. Müller et al. (2000) verwendeten die klassische und an vielen Zellsorten etablierte NH_4Cl -Präpuls-technik (Boron und De Weer 1976) zur Ansäuerung von PEZ für weitere Untersuchungen (Müller et al., 2000). Hierbei bewirkte extrazellulär zugegebenes Ammoniak in sehr typischer Weise eine zunächst starke Alkalinisierung. Erst nach der Rückführung in ein ammoniakfreies Medium kam es zu der typischen und im Rahmen der Präpuls-technik erwünschten Ansäuerung des pH_i .

Demgegenüber beobachteten wir bereits in ammoniakhaltigem Medium vor dem Auswaschen eine Ansäuerung des Zytosols. Ursache für diese Diskrepanz ist ein fundamentaler Unterschied in der Messkonfiguration (siehe Abbildung 44). In unserem Versuch befand sich das Epithel in einem NH_4Cl -Gradienten mit einer hohen Konzentration auf der mukosalen Seite, während der serosale Puffer frei von NH_4Cl war. Hierdurch konnte Ammoniak apikal als NH_4^+ ins Epithel strömen und es basolateral zumindest teilweise in der Form von NH_3 wieder verlassen. Dies ist anders als bei den Versuchen von Müller et al. (2000), bei denen die Zellen von allen Seiten von NH_4Cl -Lösung umgeben waren und ein Efflux von NH_3 erst nach dem Auswaschen von NH_4Cl möglich wurde (Müller et al., 2000).

Allerdings belegt die nach dem Auswaschen von NH_4Cl beobachtete Ansäuerung der Zellen, dass während des NH_4Cl -Präpulses größere Mengen von Ammoniak in Form von NH_4^+ in die Zelle gelangt waren (Boron und De Weer 1976; Müller et al., 2000). Nach Berücksichtigung

der Messkonfiguration können die Ergebnisse von Müller et al. (2000) an kultivierten Zellen demzufolge sehr wohl auf das intakte Epithel übertragen werden (Müller et al., 2000).

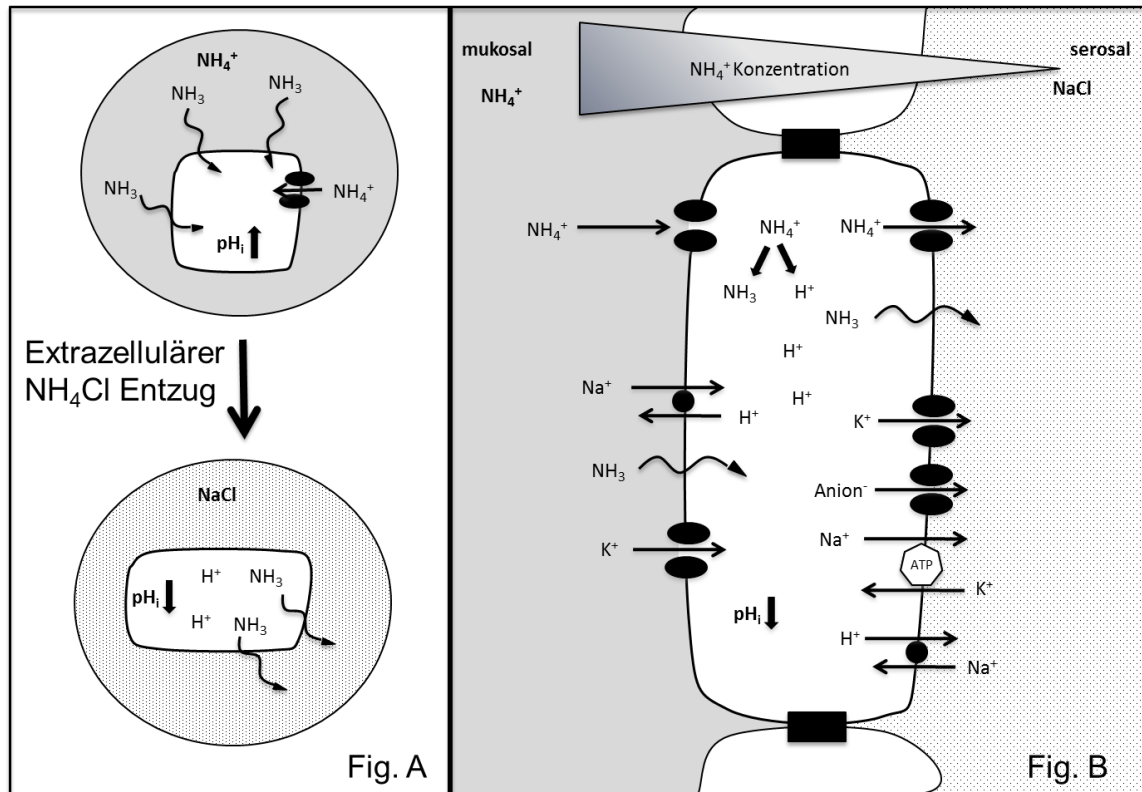


Abbildung 44: Vergleichende Darstellung der Präpuls-Konfiguration (Boron und De Weer 1976; Müller et al., 2000) isolierter PEZ und der Mikroelektroden-Konfiguration am intakten Epithel.

In Abbildung 44 A ist die Konfiguration der Präpuls-Technik dargestellt. Im oberen Teil ist eine isolierte PEZ komplett von einem NH_4Cl -haltigen Medium umgeben. Der Konzentrationsgradient $[\text{NH}_3]_o > [\text{NH}_3]_i$ führt zu einem Einstrom von NH_3 , während der Einstrom in Form von NH_4^+ durch die Depolarisation der Zelle limitiert wird. Der pH_i steigt deutlich an, die Zelle wird alkalisch. Einhergehend mit dem Entzug des extrazellulären NH_4Cl -Mediums und Ersatz durch NaCl -Lösung führt der Konzentrationsgradient $[\text{NH}_3]_i > [\text{NH}_3]_o$ zu einem massiven Ausstrom von NH_3 aus der Zelle heraus. Die unter NH_4Cl -Bedingungen ins (negativ geladene) Zytosol geströmten NH_4^+ -Ionen verlassen die Zelle in Form von NH_3 . Die Protonen bleiben zurück, das Zytosol der Zelle wird deutlich sauer.

Im Gegensatz zu diesem Phänomen ist in Fig. B die Konfiguration bei Mikroelektrodenexperimenten dargestellt. Zwischen der mukosalen und serosalen Seite des Epithels besteht ein NH_4^+ -Konzentrationsgradient und es findet ein kontinuierlicher Transport

durch die Epithelzelle statt. Die Mikroelektrodenmessungen zeigen, dass es durch den mukosalen Wechsel zu einer NH_4Cl -haltigen Lösung zu einer Depolarisation des transepithelialen und apikalen Potentials kommt. Dies deutet auf eine teilweise elektrogene Aufnahme in Form von NH_4^+ in die PEZ hin. Auf der basolateralen Seite verlässt Ammoniak die PEZ in Form von NH_3 und NH_4^+ . Zurückbleibende Protonen führen zum gezeigten pH_i Abfall bzw. zur Ansäuerung des Zytosols.

5.2.3.3 Zeitverlauf

Auffälligerweise fällt die Depolarisation des apikalen Potentials (ΔPD_a) in den ersten 5 Minuten höher aus als die des transepithelialen Potentials (ΔPD_t) (siehe Tabelle 5). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass es durch den Influx von Ammoniak zu einer Zellschwellung kommt, die schwellungsaktivierte Kanäle aktiviert. Hierdurch könnte sich der apikale und basolaterale Widerstand des Epithels in der Weise verändern, dass ein höherer Anteil des von apikal einströmenden NH_4^+ das Epithel in der gleichen Form auch wieder verlässt, wodurch ΔPD_t gegenüber ΔPD_a größer wird. Dieses darf als eine durchaus sinnvolle Adaptation des Gewebes an veränderte Anforderungen gesehen werden.

5.2.3.4 NH_4^+ -Resorption und die ruminale pH-Homöostase

Vor dem Hintergrund der Mikroelektrodenenergebnisse ist es denkbar, dass die Resorption von Ammoniak zusätzlich zur Beseitigung eines Zellgiftes eine Funktion in Bezug auf die Regulierung des Pansen pH-Wertes hat. Aus dem Pansen resorbiertes NH_4^+ gelangt ins Zytosol der Epithelzelle und wird zum überwiegenden Teil auch in protonierter Form ins Blut abgegeben. Darauf deuten unsere Ergebnisse aus der Ussing-Kammer hin, da es zu keiner Alkalinisierung des serosalen Puffers kam und $> 98\%$ des serosalen Ammoniaks in Form von NH_4^+ vorlagen. Zusammen mit Ammoniak werden demzufolge Protonen aus dem Pansen resorbiert.

NH_4^+ wird zur Leber transportiert und dort zu Harnstoff umgewandelt. Über den ruminohepatischen Kreislauf in den Pansen sezernierter Harnstoff wird bereits im *Stratum corneum* des Pansenepithels beziehungsweise unmittelbar auf seiner Oberfläche durch bakterielle Ureasen in zwei Moleküle Ammoniak (NH_3) und CO_2 gespalten. NH_3 wird als

schwache Base (pK~9,2) sofort protoniert. Für die pH-Homöostase des Pansens ist es jetzt entscheidend, in welcher Form die Resorption stattfindet. Bei der Resorption in Form von NH_4^+ kommt es nicht nur zur transienten Pufferung, sondern zur endgültigen Resorption der gebundenen Protonen aus dem Pansenlumen. Dieser Mechanismus könnte eine wirksame Strategie zur Regulierung des Pansen pH-Wertes und damit auch einen Schutz des Pansenepithels darstellen. Die notwendige Energie – 4 Mol ATP pro Mol Ammoniak – stammt aus der Leber und die Energieresourcen des unter Umständen bereits strapazierten Epithels werden entlastet. Es muss jedoch betont werden, dass die Toxizität des Ammoniaks selbst zu Schäden der Leber führt und vermutlich auch vom Epithel nur in begrenztem Umfang toleriert wird. Das Harnstoffrecycling könnte folglich ein stark belastetes Epithel entlasten, nicht aber den Mechanismus der apikalen Protonenausschleusung (z. B. mittels Na^+/H^+ NHE (Chien und Stevens 1972; Martens et al., 1991)) mit anschließender Umwandlung in CO_2 durch das im Speichel enthaltene HCO_3^- ersetzen.

5.2.4 Der Effekt von NH_4^+ auf den I_{sc} - Messung in der modifizierten Ussing-Kammer

Sowohl in unseren Versuchen am Pansen des Rindes als auch bei Messungen von Bödeker et al. (1996) und Abdoun et al. (2005) am Pansen von Schafen konnte gezeigt werden, dass auf der mukosalen Seite zugegebenes Ammoniak zur Steigerung des transepithelialen Stroms führt (Bödeker und Kemkowski 1996; Abdoun et al., 2005). Auch bei von uns durchgeführten Messungen in der modifizierten Ussing-Kammer der Mikroelektrodenapparatur kam es durch den Ersatz von $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NMDG⁺ durch eine äquimolare Menge NH_4^+ zu einer signifikanten Steigerung des I_{sc} ($\Delta I_{\text{sc}} -23,30 \pm 1,63 \text{ }\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$; $n = 37$; $p < 0,05$). Um eine mögliche Interaktion durch ebenfalls in der Pufferlösung enthaltenes Na^+ auszuschließen, wurde der Effekt von NH_4^+ auch unter mukosal Na^+ -freien Bedingungen untersucht. Serosal wurde dabei eine hohe Natriumkonzentration beibehalten, um die Funktionsfähigkeit serosaler natriumabhängiger Transporter wie dem serosalen Na^+/H^+ -Austauscher NHE1 zu erhalten (Rabbani et al., 2011; Yang et al., 2012). Wurde das Epithel dabei mukosal mit einer NH_4^+ - und Na^+ -freien Pufferlösung umspült, konnte zunächst ein negativer Strom von $-20,84 \pm 7,42 \text{ }\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($n = 12$) gemessen werden. Hierbei handelt es sich vermutlich um einen parazellulär durch den chemischen Gradienten verursachten Natriumreflux aus dem serosalen Puffer. Mit dem Wechsel zu einer $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NH_4^+ -Lösung konnte eine signifikante Zunahme des I_{sc}

auch unter mukosal Na^+ -freien Bedingungen nachgewiesen werden ($\Delta I_{sc} -29,37 \pm 2,93 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$; $n = 10$; $p > 0,001$).

5.2.4.1 Die Ca^{2+} - und Mg^{2+} - Sensitivität der Ammoniumleitfähigkeit am intakten Epithel

1985 stellten van Driessche und Zeiske fest, dass die Froschhautmembran bei Entzug von Ca^{2+} für bestimmte monovalente Kationen wie z. B. K^+ , Rb^+ , Cs^+ , Th^+ und NH_4^+ durchlässiger wird (Van Driessche und Zeiske 1985). Im Prinzip könnte diese gesteigerte Durchlässigkeit auf einer Erhöhung der Permeabilität des parazellulären Weges durch Entkopplung der *tight junctions* oder aber auf einer Steigerung der Passage durch Kanäle des transzellulären Weges basieren.

Rübbelke (1998), Schultheiß und Martens (1999) sowie Leonhard-Marek (2002) beobachteten an Epithelien des Vormagenepithels, dass ebenso der Na^+ -induzierte Kurzschlussstrom über das Pansen- bzw. Psalterepithel von Schafen Ca^{2+} -sensitiv ist und es aufgrund des Entzugs zu einer signifikanten Steigerung des transepithelialen Stroms kommt (Rübbelke 1998; Schultheiss und Martens 1999; Leonhard-Marek 2002). Da diese Versuche in Abwesenheit eines chemischen Gradienten für Natrium durchgeführt wurden, kommt lediglich eine Steigerung des transzellulären Weges in Frage. Entsprechende Patch-Clamp-Messungen belegen die Beteiligung eines durch divalente Kationen hemmbaren nicht-selektiven Kationenkanals (Leonhard-Marek et al., 2005; Brinkmann 2007). Wie bereits in Kap. 5.2.2.4 dargelegt wurde, werden entsprechende Kanäle auch von PEZ des Rindes exprimiert, wobei sich erstmalig auch die Permeation des NH_4^+ -Ions identifizieren ließ.

Am intakten Epithel kam es durch den Entzug der divalenten Kationen Ca^{2+} und Mg^{2+} ebenfalls zu einer signifikanten Zunahme des NH_4^+ -induzierten transepithelialen Stroms von $16,18 \pm 13,35 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ auf $26,35 \pm 15,28 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($N/n = 4$; $p = 0,006$).

Da bei diesen Versuchen eine Na^+ -freie Lösung zum Einsatz kam, kann eine Steigerung der Leitfähigkeit für Na^+ als Ursache ausgeschlossen werden, nicht hingegen eine parazelluläre Leitfähigkeit. Die hochsignifikante Interaktion zwischen dem Transport monovalenter Kationen wie Na^+ und NH_4^+ und jenem für Ca^{2+} und Mg^{2+} lässt vor allem an eine Kanalfamilie denken, die auch für den Transport von Ca^{2+} und Mg^{2+} aus dem Gastrointestinaltrakt verantwortlich gemacht wird – die TRP-Kanäle. Am Pansen konnte

bisher erst ein Vertreter dieser Gruppe, der TRPM7, nachgewiesen werden (Schweigel et al., 2008; Schweigel et al., 2009).

5.2.4.2 Verapamil und Rutheniumrot

Die mukosale Zugabe von $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Verapamil führte zu einer signifikanten Abnahme des NH_4^+ -induzierten transepithelialen Stroms über das Pansenepithel von Schafen ($\Delta I_{\text{sc}} -10,73 \pm 0,48 \text{ }\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$; $N/n = 2/4$; $p < 0,05$) und Rindern ($\Delta I_{\text{sc}} -4,49 \pm 0,93 \text{ }\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$; $N/n = 7$; $p = 0,007$). Bei einer Konzentration in Höhe von $100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ blieb der durchaus sichtbare Effekt mit $p = 0,055$ ($N/n = 2/5$) nur knapp unterhalb der Signifikanzgrenze ($\Delta I_{\text{sc}} -2,92 \pm 0,94 \text{ }\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$). Der hemmende Effekt von Verapamil auf die K^+ - (Leonhard-Marek und Martens 1996) und Na^+ -Leitfähigkeit via nicht-selektivem Kationenkanal konnte bereits nachgewiesen werden (Brinkmann 2007). Unsere bisherigen Ergebnisse deuten auf eine Resorption von NH_4^+ über einen durch divalente Kationen und Verapamil hemmbaren Kationenkanal hin.

Im Gegensatz zu Verapamil hatte $100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Rutheniumrot keinen Effekt auf den NH_4^+ -induzierten Kurzschlussstrom. Bei den Versuchen zeigte sich eine sehr deutliche und irreversible Rotfärbung des *Stratum corneum*s des Epithels. Möglicherweise verhinderte diese Zellschicht eine Diffusion des Wirkstoffes bis zur transportierenden Epithelschicht. Auf eine Erhöhung der Konzentration wurde aufgrund der Toxizität des Hemmstoffes verzichtet.

Im Anschluss an diese Versuche wurde die Hypothese erwogen, dass es sich bei den vom Pansenepithel exprimierten Kanälen um Kanäle der TRP-Familie handeln könnte (Pedersen et al., 2005; Venkatachalam und Montell 2007; Vriens et al., 2008). Die Selektivität dieser Kationenkanäle ist zwar variabel, aber in aller Regel gering.

Als hochcharakteristisch erweist sich die spezifische Wechselwirkung von bestimmten TRP-Kanälen des Riechepithels oder der Zunge mit pflanzlichen Wirkstoffen wie z. B. Menthol und Capsaicin (Wang et al., 2011). Oftmals reichen bereits kleinste Spuren davon aus, um eine sichere Identifikation des Duftstoffes zu ermöglichen. Auf molekularer Ebene binden diese Wirkstoffe dabei an die entsprechenden Kanäle, gefolgt von einer Öffnung mit Einstrom von Na^+ und Ca^{2+} sowie der Erzeugung eines entsprechenden Rezeptorpotentials als Ausgangspunkt für die Erregungsweiterleitung (Clapham 2003).

Doch auch zahlreiche andere Epithelien exprimieren Kanäle der TRP-Familie. Im Darm und an der Niere spielen TRPV5 sowie TRPV6 eine große Rolle bei der Resorption von Ca^{2+} (Hoenderop et al., 2003; Bianco et al., 2007; Benn et al., 2008; Suzuki et al., 2008; Holzer 2011a; Holzer 2011b). Und auch am Gastrointestinaltrakt von Wiederkäuern konnte TRPV6 bereits nachgewiesen werden, wobei die Expression im Pansen eher gering ist (Wilkins et al., 2009). TRPM7 ist als magnesiumresorbierender Kanal bekannt, die Expression am Pansen von Schafen ist belegt (Schweigel et al., 2008; Schweigel et al., 2009). TRPV3 wird insbesondere von Keratinozyten der Haut exprimiert (Peier et al., 2002a; Nilius und Biro 2013). Zur Expression am Pansen fehlen Untersuchungen. Ferner existiert eine reichhaltige Literatur zur Modulation dieses Kanals durch verschiedene Agonisten. Einschränkend muss allerdings gesagt werden, dass die meisten dieser Versuche an überexprimierenden Zellsystemen durchgeführt wurden.

Der klare Vorteil der Messungen an Zelllinien mit bekanntem Expressionsmuster manifestiert sich in der Möglichkeit der Abgrenzung zwischen einzelnen Kanaltypen, die bei dem von uns verwendeten nativen Epithel nicht möglich ist. Demgegenüber ist die Übertragbarkeit von Ergebnissen aus Versuchen an Zellkulturen auf das native Epithel nicht immer möglich. Aus diesem Grunde wurde in den folgenden Versuchen die Wirkung bekannter TRP-Modulatoren auf den NH_4^+ -induzierten Strom über das intakte native Pansenepithel des Rindes untersucht.

5.2.5 Einfluss von verschiedenen TRP-Modulatoren auf den NH_4^+ -induzierten Kurzschlussstrom über das Pansenepithel

5.2.5.1 Die Effekte von Menthol auf den NH_4^+ -induzierten Kurzschlussstrom

Die Zugabe von $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ sowie $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Menthol führte in unseren Messungen zu einer transienten und signifikanten Steigerung des NH_4^+ -induzierten transepithelialen Stroms, wobei dies unabhängig davon geschah, ob Na^+ in der mukosalen Pufferlösung enthalten war oder nicht. Eine Steigerung des Kurzschlussstroms konnte auch bei der Verwendung von NH_4^+ -freier NaCl -Pufferlösung festgestellt werden. Insbesondere die letztgenannte Beobachtung untermauert eindeutig die Aktivierung eines transzellulären Resorptionsweges. Da bei den NH_4^+ -freien Versuchen in beidseitigem NaCl -Puffer kein Ionengradient zwischen der mukosalen und serosalen Lösung vorlag, kommt als Triebkraft hinter der Steigerung des

Kurzschlussstromes allein die Na⁺/K⁺-ATPase in Frage. In Anbetracht der äußerst gut belegten und recht spezifischen Modulation von TRPM8, TRPA1 wie auch TRPV3 durch Menthol erscheint eine Beteiligung einer dieser Kanäle – oder aller drei – an der apikalen Aufnahme von monovalenten Kationen wie Na⁺ oder NH₄⁺ als hochgradig wahrscheinlich.

Menthol gilt in der Literatur als einer der potentesten Aktivatoren von TRPM8, TRPA1 und TRPV3 (Macpherson et al., 2006; Vriens et al., 2008; Farco und Grundmann 2013). Gegen eine echte funktionale Rolle des TRPM8 spricht dabei, dass in den von uns durchgeführten Messungen mit Icilin, das als potentester TRPM8 Modulator beschrieben wird (Behrendt et al., 2004), keine Effekte zu sehen waren. Einschränkend muss aber auf die Möglichkeit hingewiesen werden, dass die Bindung an die nicht am epithelialen Transport beteiligten Zellschichten eine Wirkung verhindert haben kann oder aber eine nicht wirksame Konzentration verwendet wurde.

Menthol (1 mmol·l⁻¹) führte an primären nativen Maus-Keratinocyten zu einer Aktivierung des Ca²⁺-Influx, nicht aber an TRPV3-knockout-Keratinocyten der gleichen Spezies (Macpherson et al., 2006). In diesem Zusammenhang zeigten TRPV3-knockout-Mäuse eine verzögerte Reaktion auf die Hitzeeinwirkung von außen (Moqrich et al., 2005). Beim Olmsted Syndrom des Menschen führt eine Mutation des TRPV3 zur Allopezie mit schwersten Verstümmelungen durch Palmoplantarkeratosen (Nilius und Biro 2013). Diese Ergebnisse sprechen für eine wichtige funktionelle Rolle des TRPV3 in der Haut und sind vor dem Hintergrund des ähnlichen Gewebeaufbaus zwischen Pansenepithel und Haut für die Interpretation unserer Ergebnisse durchaus interessant.

Eine weitere Besonderheit der Wirkung von Menthol stellte sich bei Untersuchungen an Maus-TRPA1 heraus. Karashima et al. (2007) stellten fest, dass Menthol ein bimodales Wirkprinzip aufweist: Führt niedrige Konzentrationen im submikromolaren bis niedrig-mikromolaren Bereich zu einer Aktivierung, so hatten höhere Konzentrationen eher einen hemmenden Effekt (Karashima et al., 2007). Auch bei Versuchen an humanen embryonalen Nierenzellen (*human embryonic kidney cells* 293; HEK Zellen) oder CHO-Zellen wurde nachgewiesen, dass die aktivierende Wirkung von Menthol auf TRPM8, TRPV3 und TRPV1 stark konzentrationsabhängig ist (TRPM8 (ED₅₀ = 30µM), TRPV3 (ED₅₀ = 20mM), TRPA1 (ID₅₀ = 68µM)) (Macpherson et al., 2006). Im Hinblick auf unsere Ergebnisse könnte der von uns gemessene typische Messkurvenverlauf (zunächst Zunahme, dann Abnahme) mit der

Dauer der Exposition des Pansenepithels zusammenhängen. Hierzu ist zu bedenken, dass am intakten Epithel apikal appliziertes Menthol durch das mehrschichtige *Stratum corneum* bis zur ersten transportierenden Epithelschicht – dem *Stratum granulosum* – diffundieren muss. Die dort wirksame Konzentration dürfte von daher mit voranschreitender Dauer der Zeit zunehmen. Demgegenüber werden auch aus der Literatur Hinweise auf einen biphasischen Verlauf der Wirkung von Menthol auf TRPV3 vermittelte Ströme über die Membran isolierter, überexprimierender Zellen gegeben (Sherkheli et al., 2009). Ferner muss berücksichtigt werden, dass die Öffnung eines Kationenkanals sowohl den Influx von NH_4^+ als auch den Efflux von K^+ zur Folge hat – mit inverser Wirkung auf die gemessenen Ströme. Eine zeitabhängige Veränderung der relativen Permeabilität für NH_4^+ und K^+ könnte also durchaus zur beobachteten Stromkinetik führen. Denkbar ist weiterhin die entgegengesetzte Wirkung auf unterschiedliche Kanäle.

Auch die gewählte Temperatur (Peier et al., 2002b) und der intrazelluläre pH-Wert (Andersson et al., 2004) können einen Einfluss auf die Wirkungsintensität von Kanalmodulatoren besitzen, wie dies z. B. offenbar bei Icilin der Fall ist. Sowohl eine Veränderung des extrazellulären als auch intrazellulären pH-Wertes hatte in diesen Studien einen Einfluss auf die Wirkung von Icilin. Eine Ansäuerung führte zur deutlichen Inhibition der aktivierenden Wirkung von Icilin, wohingegen eine Alkalinisierung die Wirkung von Icilin potenzierte (Andersson et al., 2004).

Theoretisch wäre es möglich, dass es nach einer Menthol-vermittelten Aktivierung des Kationenkanals zu einer vermehrten Resorption von NH_4^+ und H^+ mit einer sekundären Veränderung des intrazellulären pH-Wertes kommt. Diese könnte wiederum eine direkte Auswirkung auf die Interaktion von Menthol mit dem Kanal aufweisen. Jedoch konnte an CHO-Zellen nachgewiesen werden, dass die Wirkung von Menthol auf TRPM8 unabhängig vom intrazellulären pH-Wert war (Andersson et al., 2004).

5.2.5.2 Der Effekt von Thymol auf den NH_4^+ -induzierten Kurzschlussstrom

Neben Menthol gilt auch Thymol, ein Hauptbestandteil von Thymian und Oregano, als Aktivator des TRPV3 (Macpherson et al., 2006; Xu et al., 2006; Vogt-Eisele et al., 2007) und TRPA1 (Lee et al., 2008). So konnten Xu et al. (2006) sowohl an TRPV3-exprimierenden Zellen der Maus als auch an humanen TRPV3-exprimierenden Zellen zeigen, dass die Zugabe

von $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ bzw. $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Thymol zu einer signifikanten Zunahme des Stroms führt (Xu et al., 2006). Thymol zeigte ebenfalls eine aktivierende Wirkung auf TRPA1, was unter anderem anhand einer Depolarisation des Membranpotentials und einer Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels bei Versuchen an TRPA1 exprimierenden humanen embryonalen Nierenzellen (*human embryonic kidney cells* 293; HEK Zellen) gezeigt wurde (Lee et al., 2008).

Interessant in Bezug auf unsere Ergebnisse sind außerdem zwei Studien von Kaji et al. (2011) sowie Boudry und Perrier (2008), bei denen die Effekte von Thymol auf den epithelialen Transport an Darmgeweben untersucht wurde. Dabei zeigte sich, dass die mukosale Zugabe von Thymol ($1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ bzw. $10\text{-}100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) zu einer transienten Steigerung des I_{sc} führte (Boudry und Perrier 2008; Kaji et al., 2011).

In unseren Messungen offenbarten $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Thymol recht unterschiedliche Wirkungen auf den NH_4^+ -induzierten Kurzschlussstrom und es konnte insgesamt kein signifikanter Effekt nachgewiesen werden (Abbildung 39). Auch bei der Verwendung einer Na^+ -freien NH_4^+ -Pufferlösung und unter Einsatz einer höheren Thymolkonzentration ($1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) waren die Effekte in den Einzelmessungen zwar deutlicher ausgeprägt, aber weiterhin nicht einheitlich. Auffallend ist, dass einzelne Messungen jedoch ein im Verlauf sehr ähnliches Bild zu den Messungen von Kaji et al. (2011) erkennen ließen, wobei es zunächst zu einer geringen Steigerung des Stromes kam, bevor in der Folge eine Rückkehr auf den Ausgangswert eintrat (Kaji et al., 2011). Nach einer Zeitspanne von ca. 20 Minuten (Kaji et al., 2011) bzw. 5 bis 6 Minuten (Boudry und Perrier 2008) nach der Zugabe fand auch bei diesen Messungen eine Rückkehr des I_{sc} auf den basalen Wert statt.

Boudry und Perrier (2008) schlossen aus ihren Ergebnissen auf eine durch Thymol aktivierte Sekretion von Cl^- und HCO_3^- . Ihrer Meinung nach handelt es sich allerdings nicht um direkte Effekte auf das Epithel selbst, sondern um einen Sekundäreffekt nach Aktivierung neuronaler nikotinerger Rezeptoren im Epithelverband (Boudry und Perrier 2008). Auch Kaji et al. (2011) führten den steigenden Effekt von Thymol auf eine Sekretion von Anionen zurück, da es unter $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ -freien Bedingungen zu einem um 60 % reduzierten Effekt auf die Zugabe von Thymol kam. Bumetanid, ein Hemmstoff des $\text{Na}/\text{K}/2\text{Cl}^-$ -Transporters, und der TRPA1-Blocker (HC-030031) führten in diesen Versuchen zu einer signifikanten Reduktion des Thymol-induzierten Stromanstiegs über das Epithel. Anders als bei Boudry und Perrier (2008)

konnte die Wirkung von Thymol jedoch nicht durch die Gabe des neuronalen Natriumkanalblockers Tetrodotoxin (TTX) wieder aufgehoben werden; auch Serotoninmodulatoren blieben ohne Wirkung (Boudry und Perrier 2008). Als inhibitorisch erwies sich dagegen ein extrazellulärer Calciumentzug. Da es ebenfalls möglich war, den TRPA1-Kanals auf mRNA-Ebene nachzuweisen, schlossen die Autoren auf eine Aktivierung des TRP-Kanals durch Thymol mit anschließender Öffnung calciumaktivierbarer Anionenkanäle (Kaji et al., 2011).

Am Pansenepithel gibt es weder in der Literatur (Martens und Gäbel 1988; Martens et al., 1991) noch in der vorliegenden Untersuchung Hinweise auf die Existenz eines Na/K/2Cl⁻-Transporters als Voraussetzung für eine Chloridsekretion, wie sie z. B. am Colon zu beobachten ist. Auch für eine apikale Anionenleitfähigkeit finden sich keine Hinweise (Georgi et al., 2013). Der bei unseren Messungen gezeigte hemmende Effekt von Thymol auf den transepithelialen Strom dürfte von daher eher einer direkten Hemmung der Resorption von Kationen (NH₄⁺) entsprechen. Dabei ist es durchaus denkbar, dass sich die Kanalkonfiguration so verändert, dass parallel zur von uns beobachteten Hemmung der Resorption monovalenter Kationen eine aus anderen Arbeiten bekannte Steigerung der Permeation von Ca²⁺ auftritt.

Ein genereller Effekt von Thymol auf den Influx von Kationen (insbesondere Ca²⁺ und K⁺) konnte so an Skelettmuskelzellen, Herzmuskelzellen und am ventrikulären Trabekelwerk nachgewiesen werden (Magyar et al., 2002; Szentandrassy et al., 2003; Szentandrassy et al., 2004; Sarkozi et al., 2007). Szentandrassy et al. (2004) stellten eine vermehrte Freisetzung von Ca²⁺ aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) wie auch eine verminderte Aktivität der Ca²⁺-Pumpen fest, was zu einem Ca²⁺-Mangel im SR führt. Die Folge davon ist eine negativ inotrophe Wirkung (Szentandrassy et al., 2004). Es konnte auch an Skelettmuskelzellen und Herzzellen ein Effekt von Thymol auf den K⁺-Strom festgestellt werden (Magyar et al., 2002; Szentandrassy et al., 2003).

Es sei an dieser Stelle angemerkt, dass in Analogie zu Menthol auch Thymol eine agonistische Wirkung auf den humanen GABA_A-Rezeptor besitzt. (Mohammadi et al., 2001; Priestley et al., 2003). Hier besteht aber zweifellos noch weiterer Forschungsbedarf.

5.2.5.3 Der Effekt von Capsaicin auf den NH_4^+ -induzierten Kurzschlussstrom

Capsaicin ist die scharfe Komponente in Chili und eine der wirksamsten sensorischen Komponenten überhaupt (Macpherson et al., 2006). Das durch Capsaicin ausgelöste heiße und brennende Gefühl ist auf eine Öffnung von TRPV1-Kanälen mit nachfolgender Aktivierung entsprechender Neuronen zurückzuführen (Caterina et al., 1997). TRPV1-knockout-Mäuse zeigen keine Schmerzempfindung auf die Applikation von Capsaicin, was die Theorie für TRPV1 als alleinigen Rezeptor für die Wirkung von Capsaicin unterstützt (Caterina et al., 2000; Davis et al., 2000). Zu beachten ist dabei aber, dass hier wiederum eine konzentrationsabhängige Wirkung vorliegt, wobei Konzentrationen bis $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ zu einer hochselektiven Aktivierung des TRPV1 führen, höhere Konzentrationen von $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ hingegen zu einer unspezifischen Hemmung des TRPV3 und TRPM8 bei gleichzeitiger Aktivierung von TRPA1 führen (Macpherson et al., 2006).

In unseren Messungen führte die Zugabe von $100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Capsaicin zu einer signifikanten Hemmung des NH_4^+ -induzierten Kurzschlussstroms ($\Delta I_{\text{sc}} 3,25 \pm 1,16 \text{ }\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$; $n = 6$; $p < 0,05$). Als denkbare Ursache ist die von Macpherson et al. (2006) beschriebene konzentrationsabhängige Hemmung von TRPV3 oder TRPM8 anzuführen (Macpherson et al., 2006).

5.2.5.4 Der Effekt von Zimtaldehyd auf den NH_4^+ -induzierten Kurzschlussstrom

Zimtaldehyd wird aus der Rinde des Zimtbaumes (*Cinnamomum cassia*) gewonnen und ruft bei Aufnahme in den Mund, aber auch bei Hautkontakt ein brennendes und kribbelndes Gefühl hervor (Namer et al., 2005; Vriens et al., 2008). Zimtaldehyd besitzt im mikromolaren Bereich eine aktivierende Wirkung auf TRPA1, was z. B. an TRPA1-überexprimierenden CHO-Zellen zu einer Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels führt (Bandell et al., 2004). Alpizar et al. (2013) demonstrierten einen bimodalen Effekt mit deutlicher Aktivierung bei $100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, während $3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ eine schnelle, hemmende, aber reversible Wirkung auf TRPA1 hatten (Alpizar et al., 2013). Bei höheren Konzentration zwischen $0,5$ und $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ stimuliert Zimtaldehyd am gleichen Präparat außerdem TRPV3 (Macpherson et al., 2006).

Wie bereits für Thymol diskutiert wurde, führt Zimtaldehyd ebenfalls (10 bis $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) zu einer transienten Steigerung des I_{sc} über das Jejunumgewebe von Schweinen, wobei eine Steigerung der HCO_3^- -Sekretion nach Aktivierung nikotinerger Rezeptoren diskutiert wird (Boudry und Perrier 2008). Bei anderen Versuchen an Jejunum- und Nierengewebe von Ratten wurde dagegen der hemmende Effekt von Zimtextrakt auf eine Inhibition der intestinalen Na^+/K^+ -ATPase mit Sekundärwirkung auf multiple andere Transportprozesse zurückgeführt (Kreydiyyeh et al., 2000).

In unseren Versuchen hatte Zimtaldehyd bei einer verwendeten Konzentration von $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ keinen signifikanten Effekt auf den NH_4^+ -induzierten Kurzschlussstrom über das Pansenepithel des Rindes. Nicht ausgeschlossen werden sollte ein möglicher Effekt bei niedrigeren oder höheren Konzentrationen.

5.2.5.5 Der Effekt von Kampher und Methylsalicylat auf den NH_4^+ -induzierten Kurzschlussstrom

Kampher, hauptsächlich in ätherischen Ölen von Lorbeergewächsen, Korbgewächsen und Lippenblüten enthalten, gilt als Aktivator von TRPV1 und TRPV3, wobei es gleichzeitig eine hemmende Wirkung auf TRPA1 hat (Xu et al., 2005; Macpherson et al., 2006; Vogt-Eisele et al., 2007; Alpizar et al., 2013). Auch Methylsalicylat, ein synthetischer Wirkstoff der Gruppe der Salicylate, der anstatt des natürlichen Wintergrünöls (*Gaultheria aetheroleum*) häufig in Duftprodukten zur Anwendung kommt, führt zur spezifischen TRPA1- ($600 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) und TRPV1- ($2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) Aktivierung (Bandell et al., 2004).

Bei den von uns durchgeführten Versuchen hatte Kampher keinen eindeutigen Effekt ($N/n = 3/6$), während Methylsalicylat einen geringen, jedoch nicht signifikant hemmenden Effekt auf den NH_4^+ -induzierten Kurzschlussstrom hatte (beide $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Es kann in diesem Zusammenhang wiederum nicht ausgeschlossen werden, dass die verwendete Konzentration nicht optimal gewählt wurde. Nach Literaturangaben führt Kampher bei einer sehr hohen Konzentration von $4,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ zu einer deutlichen Steigerung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels von HEK-Zellen mit Überexpression von hTRPM8 und rTRPM8 (Selescu et al., 2013). In der Arbeit von Selescu et al. (2013) wird ferner eine hemmende Wirkung von

Kampher auf den durch Menthol induzierten Strom thematisiert. Vor diesem Hintergrund sollten in der Zukunft weitere Untersuchungen am Pansenepithel durchgeführt werden.

5.3 Schlussfolgerung

5.3.1 Entwicklung eines Transportmodells für die Resorption von Ammoniak aus dem Pansen

Nachdem 1948 erstmalig gezeigt werden konnte, dass Ammoniak aus dem Pansen ins Blut gelangt (McDonald 1948), stellte sich relativ schnell heraus, dass die Annahme eines Transportes allein durch die Diffusion in Form von NH_3 mit vielen Beobachtungen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* unvereinbar war. So fällt postprandial der pH-Wert im Pansen ab. Gleichzeitig nimmt die Resorptionsrate des im Rahmen des Fermentationsgeschehens freigesetzten Ammoniaks in der Regel zu und nicht ab. Dennoch hielt sich die Annahme, dass Ammoniak primär *per diffusionem* aus dem Pansen ins Blut gelangt, Jahrzehnte lang.

Aus *in vitro* Versuchen in der Ussing-Kammer ist seit fast 20 Jahren bekannt, dass Ammoniak einen positiven Kurzschlussstrom induziert und der Transport von Ammoniak durch die transepitheliale Potentialdifferenz beeinflusst werden kann (Bödeker und Kemkowski 1996). Der gleichzeitig nachgewiesene hemmende Effekt von Quinidin auf den NH_4^+ -induzierten Strom weist auf einen Transport durch Ionenkanäle hin.

In der Arbeit von Abdoun et al. (2005) konnte in der Folge gezeigt werden, dass der NH_4^+ -induzierte Kurzschlussstrom direkt mit der Resorption des Ammonium-Ions in Verbindung steht. Bei einem pH-Wert von 6,4 wurden ca. 70 % des vorhandenen Ammoniaks in Form von NH_4^+ in das Epithel aufgenommen, wohingegen bei einem pH-Wert von 7,4 die apikale Resorption in Form von NH_3 überwog (Abdoun et al., 2005). In der gleichen Arbeit wurde ferner mittels der Patch-Clamp-Technik der Nachweis dafür erbracht, dass NH_4^+ -Ionen auf elektrogenem Wege über Kanäle die Zellmembran isolierter Pansenepithelzellen des Schafes permeieren können. Abdoun et al. (2005) gingen damals von einem Transport durch Kaliumkanäle aus, deren Existenz zu diesem Zeitpunkt als unstrittig belegt galt (Leonhard-Marek und Martens 1996). Es darf vermutet werden, dass der basolaterale Efflux des NH_4^+ tatsächlich über solche, für das Na^+ -Ion impermeable, Ionenkanäle vollzogen wird, da

andernfalls ein aktiver Transport von Na^+ über das Epithel undenkbar erscheint. Die Möglichkeit, dass an der apikalen Aufnahme von NH_4^+ auch nicht-selektive Kationenkanäle beteiligt sein könnten, wurde damals nur peripher erwogen und nicht hinreichend untersucht. Diese Lücke zu füllen war das Ziel dieser Arbeit.

Die Ergebnisse dieser Dissertation bestätigen die elektrogene Resorption von Ammoniak aus dem Pansen. Es konnte gezeigt werden, dass bei einem pH-Wert von sowohl 6,4 als auch 7,4 der überwiegende Teil des über das Epithel transportierten Ammoniaks in Form des Ammonium-Ions resorbiert wird, was mit einer Ansäuerung des Epithels verbunden ist. Der direkte Nachweis dieser Ansäuerung bestätigt die zuvor postulierten Hypothesen (Abdoun et al., 2003; Abdoun et al., 2005).

Es stellte sich des Weiteren heraus, dass sowohl der über die Membran von Einzelzellen gemessene NH_4^+ -induzierte Strom, wie auch der Kurzschlussstrom über das intakte Gewebe, durch divalente Kationen (Ca^{2+} und Mg^{2+}) und trivalente Kationen (Gd^{3+} und La^{3+}) beeinflussbar ist. Dieser Zusammenhang deutet auf eine wenig selektive Porenregion und eine Beteiligung von NSCC des TRP-Typs hin. Entscheidender Durchbruch war der Nachweis, dass verschiedene Modulatoren der TRP-Kanalfamilie (wie z. B. Menthol, Thymol, Capsaicin) einen signifikanten Einfluss auf den NH_4^+ -induzierten Kurzschlussstrom haben.

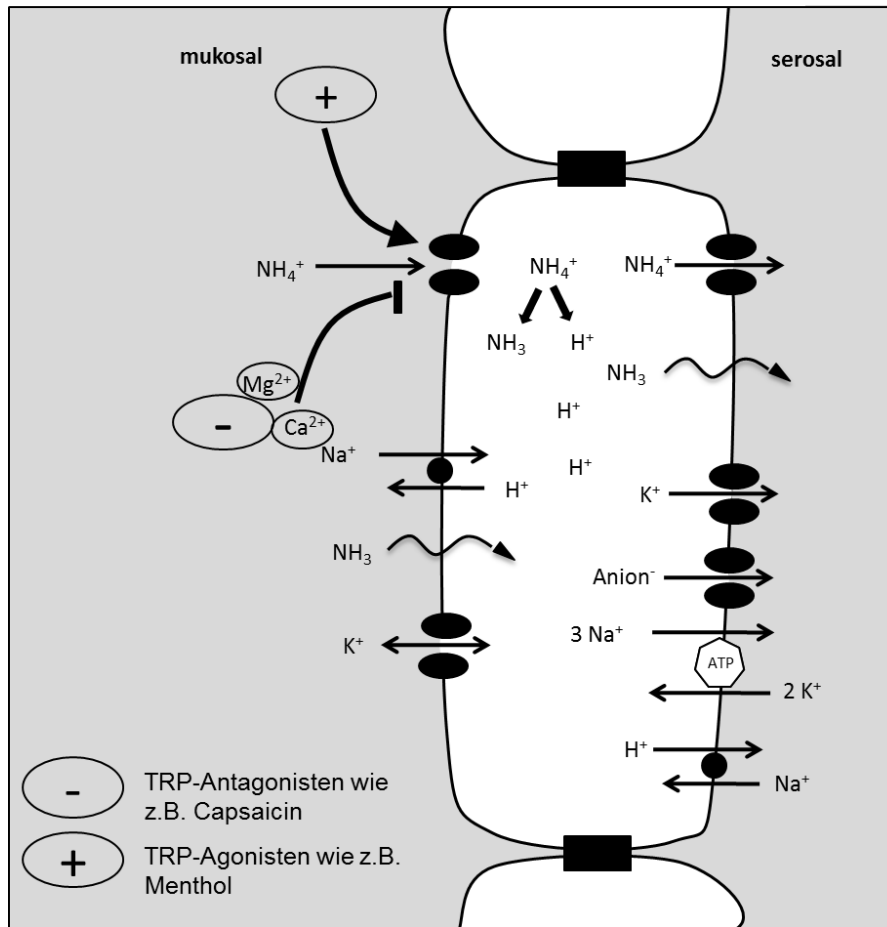


Abbildung 45: Transportmodell für Ammoniak über das Pansenepithel. Dargestellt ist die Aufnahme von NH_4^+ über einen nicht-selektiven Kationenkanal, der durch Ca^{2+} und Mg^{2+} gehemmt wird. TRP-Agonisten wie z. B. Menthol haben eine aktivierende, TRP-Antagonisten wie z. B. Capsaicin dagegen eine hemmende Wirkung.

In Anbetracht des begrenzten Spektrums von Kanälen, mit denen diese Agonisten nach Literaturangaben interagieren, kann sich die Anzahl der möglichen Kandidaten für diese wesentliche Komponente des Ammoniaktransportes zunächst auf TRPM8, TRPV1, TRPV3 und TRPA1 eingegrenzt werden.

Es ist möglich, diesem zunächst unsinnig anmutenden Kreisprozess eine physiologische Funktion zuzuschreiben (siehe Abbildung 46), wenn man annimmt, dass Ammoniak in protonierter Form als NH_4^+ den Pansen verlässt. In Anbetracht der großen Mengen Ammoniak, die aus dem Pansen von Hochleistungsrindern resorbiert werden ($\sim 20 \text{ mol} \cdot \text{Tag}^{-1}$), könnten auf diese Weise fast 25 % der täglich im Pansen produzierten Protonen entsorgt werden. Die für die Harnstoffsynthese erforderliche Energie stammt aus der Leber und somit könnte dieser Mechanismus die epithelialen Mechanismen der pH-Regulation entlasten. Zudem werden bei den apikalen pH-regulatorischen Mechanismen die Protonen zurück ins Pansenlumen gepumpt, ein Abtransport findet also nicht statt.

6 Zusammenfassung

Untersuchung über die Beteiligung von nicht-selektiven Kationenkanälen am Ammoniaktransport über das Pansenepithel des Rindes

Landwirtschaftliche Nutztiere tragen in erheblichen Umfang zur weltweit wachsenden Stickstoffemission in die Umwelt bei. Insbesondere beim Wiederkäuer führen erhebliche Anteile des eingesetzten Futterproteins nicht wie erwünscht zu mehr Fleischansatz und erhöhter Milchproduktion, sondern werden nach fermentativer Aufspaltung zu Ammoniak über die Epithelien des Gastrointestinaltraktes resorbiert, in der Leber energieaufwendig zu Harnstoff entgiftet und nachfolgend über die Niere in die Umwelt ausgeschieden.

Unzählige Versuche, durch ruminale Ansäuerung oder Synchronisation der Verfütterung von Kohlenhydraten und Proteinen eine Reduktion der Stickstoffemission zu erzielen, haben nicht zum Durchbruch geführt. *In vitro* Versuche am Schafspansen belegen, dass Ammoniak nicht alleine durch physikalische Diffusion der ungeladenen Form (NH_3) aus dem Pansen entweicht, sondern dass zusätzlich ein Efflux des protonierten Ammonium-Ions (NH_4^+) erfolgt. Über die beteiligten Mechanismen ist bisher fast nichts bekannt. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Resorptionsmechanismen für Ammoniak über das Pansenepithel des Rindes mittels der Patch-Clamp-Technik, Fluxmessungen in der Ussing-Kammer und Messungen mittels pH-selektiver Mikroelektroden näher zu charakterisieren.

Im Einzelnen wurden die folgenden Ergebnisse erzielt:

- Ammoniak induzierte einen positiven Kurzschlussstrom über Pansenepithelien des Rindes in der Ussing-Kammer ($10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$; $*40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$; $*p < 0,05$, $N/n = 8/40$).
- Bei Bestimmung des Ammoniak-Fluxes über das intakte Epithel wurden nach einer Fluxdauer von 150 Minuten bei mukosalem Einsatz von $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NH}_4^+$ serosal $3,08 \pm 0,17 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NH}_4^+$ nachgewiesen. Bei Einsatz von apikal $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NH}_4^+$ erhöhte sich die serosal nachgewiesene Menge auf $8,72 \pm 0,65 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NH}_4^+$. Dabei kam es zu keiner Alkalinisierung des serosalen pH-Wertes, wie sie bei überwiegendem Efflux von NH_3 in die nur gering gepufferte serosale Lösung zu erwarten gewesen wäre ($p = 0,18$; $N/n = 8/40$).
- Bei Mikroelektroden-Messungen führte der Ersatz von $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NMDG}^+$ durch eine äquimolare Menge NH_4^+ sowohl bei einem mukosalen pH-Wert von 6,4 als auch bei 7,4 zu einer signifikanten Steigerung des transepithelialen und apikalen Potentials (pH 6,4: ΔPD_t $2,78 \pm 0,37 \text{ mV}$; ΔPD_a $2,13 \pm 0,5 \text{ mV}$; pH 7,4: ΔPD_t $2,53 \pm 0,46 \text{ mV}$; ΔPD_a $1,0 \pm 1,8 \text{ mV}$;

N/n = 6/12, $p < 0,05$). Gleichzeitig konnte unter beiden Versuchsbedingungen ein signifikanter Abfall des pH_i gemessen werden ($\text{pH } 6,4$: $\Delta\text{pH}_i -0,13 \pm 0,02$; $\text{pH } 7,4$: $\Delta\text{pH}_i -0,16 \pm 0,05$; N/n = 6/12, $p < 0,05$). Dieses Ergebnis belegt einen transzellulären Effluxmechanismus und deutet weiterhin darauf hin, dass sowohl bei einem pH-Wert in Höhe von 6,4 als auch 7,4 die apikale elektrogene Aufnahme in Form von NH_4^+ leicht gegenüber der serosalen Abgabe in dieser Form überwiegt.

- Die Leitfähigkeit für NH_4^+ wurde durch extrazelluläre divalenten Kationen (Ca^{2+} und Mg^{2+}) blockiert. Dies konnte sowohl in Patch-Clamp Messungen an isolierten Zellen, die mit einer Na-Glukonat oder K-Glukonat Pipettenlösung gefüllt waren ($n = 8$, $p = 0,008$ und $n = 7$, $p = 0,016$), als auch an intakten Epithelien (Mikroelektrodeentechnik) (N/n = 3/4, $p = 0,005$) gezeigt werden. Verapamil hatte ebenfalls eine hemmende Wirkung (N/n = 3/7, $p = 0,008$).
- Verschiedene spezifische Modulatoren der TRP-Kanalfamilie hatten einen Einfluss auf den NH_4^+ induzierten Kurzschlussstrom. So konnte gezeigt werden, dass Menthol (200 $\mu\text{mol/l}$; 1 mmol/l) zu einer transienten Steigerung des I_{sc} über das Epithel führte ($\Delta I_{\text{sc}} 5,35 \pm 0,97 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$; N/n = 4/11, $p = 0,02$ bzw. $\Delta I_{\text{sc}} 4,53 \pm 0,94 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$; N/n = 3/12, $p = 0,022$). Capsaicin (100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) führte dagegen zu einer signifikanten Hemmung dieses Kurzschlussstroms ($\Delta I_{\text{sc}} -3,25 \pm 1,16 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$; N/n = 4/6, $p = 0,02$). Die Applikation von Thymol (100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ und 1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) hatte ebenfalls einen deutlichen, wenn auch stark vom individuellen Epithel abhängigen Effekt auf den NH_4^+ induzierten Kurzschlussstrom (N/n = 2/4 und N/n = 6/9). Eine Applikation von Lösungsmittel ohne Agonist blieb hingegen ohne Effekt (N/n = 3/6). Auch an Epithelien von Schafen waren entsprechende Effekte nachweisbar.
- Da der apikale Ersatz von Chlorid durch Glukonat zu einer Hyperpolarisation des apikalen Potentials führte, dürften die in Zellen des Pansenepithels nachweisbaren Anionenkanäle basolateral exprimiert werden. Eine Beteiligung an den durch TRP-Modulatoren auslösbaren Stromantworten erscheint daher unwahrscheinlich.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse auf die Beteiligung von nicht-selektiven Kationenkanälen der TRP-Familie am Efflux von Ammoniak aus dem Pansen hin. Eine mögliche Beteiligung dieser Kanäle am Efflux von Protonen aus dem Pansen im Sinne der intraruminalen pH-Homöostase wird diskutiert. Eine gezielte Beeinflussung des Ammoniumtransportes aus dem Pansen des Rindes durch Züchtung oder dem Einsatz entsprechender Modulatoren erscheint möglich.

7 Summary

A study of the involvement of non-selective cation channels in the transport of ammonia across the bovine ruminal epithelium

The impact of the livestock industry on the globally increasing emissions of nitrogen is profound. Particularly in ruminants, a large percentage of the protein that is fed does not lead to the desired increases in meat and milk production, but is microbially broken down into ammonia, absorbed across the epithelia of the gastro-intestinal tract, hepatically converted into urea in an energy-consuming process and finally emitted into the environment via the kidney.

Countless studies attempting to reduce nitrogen emissions by ruminal acidification or synchronisation of the carbohydrate and protein content of the diet have not resolved this issue. In vitro studies on the sheep rumen show that epithelial efflux of ammonia does not only involve simple diffusion of the uncharged form (NH_3), but also a transport of the protonated ammonium ion (NH_4^+). So far, there is very little information on the underlying mechanisms. The aim of the present study was to characterize the mechanisms for the absorption of ammonia across the bovine ruminal epithelium using the patch-clamp-technique, flux studies in the Ussing chamber and pH-selective microelectrodes.

The experiments yielded the following results:

- The absorption of ammonia across the ruminal epithelium of cows induced a positive short-circuit current in the Ussing chamber ($10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$; $*40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ $*p < 0.05$).
- A 2.5-hour incubation in the Ussing chamber exposing the mucosal side of the tissue to $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NH_4Cl led to a serosal concentration of $3.08 \pm 0.17 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NH_4^+ . Increasing the mucosal concentration to $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NH_4Cl resulted in an increased serosal concentration of $8.72 \pm 0.65 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NH_4^+ . No significant alkalinization of the only lightly buffered serosal solution was observed, as should have been the case if NH_3 were the primary form transported ($p = 0.18$; $N/n = 8/40$).
- In microelectrode measurements, the replacement of $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NMDG^+ by an equimolar amount of NH_4^+ (pH 6.4 and 7.4) resulted in a significant depolarization of the transepithelial and apical potential (pH 6.4: ΔPD_t $2.78 \pm 0.37 \text{ mV}$; ΔPD_a $2.13 \pm 0.5 \text{ mV}$; pH 7.4: ΔPD_t $2.53 \pm 0.46 \text{ mV}$; ΔPD_a $1.0 \pm 1.8 \text{ mV}$ $N/n = 6/12$, $p < 0.05$).

Simultaneously the intracellular pH dropped significantly at both values of pH (pH 6.4: $\Delta\text{pH}_i -0.13 \pm 0.02$; pH 7.4: $\Delta\text{pH}_i -0.16 \pm 0.05$; N/n = 6/12, $p < 0.05$). These results suggest a transcellular pathway. The acidification observed also implies that the apical influx of NH_4^+ slightly exceeded the basolateral efflux at pH 6.4 as well as 7.4.

- The NH_4^+ conductance of the ruminal epithelium was blocked by divalent cations (Ca^{2+} and Mg^{2+}). This was shown in patch clamp measurements of isolated cells filled with Na-gluconate solution or K-gluconate solution ($n = 8$, $p = 0.008$ and $n = 7$, $p = 0.016$), as well as in intact epithelia measured in the Ussing Chamber (microelectrode-technique) (N/n = 3/4, $p = 0.005$). Verapamil ($1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) had an inhibitory effect (N/n = 3/7, $p = 0.008$).
- Various specific modulators of the TRP-channel-family had an effect on the NH_4^+ induced current. The mucosal application of menthol ($200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$; $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) resulted in a clear but transient increase of I_{sc} ($\Delta I_{\text{sc}} 5.35 \pm 0.97 \text{ }\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ (N/n = 4/11, $p = 0.02$) and $\Delta I_{\text{sc}} 4.53 \pm 0.94 \text{ }\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ (N/n = 3/12, $p = 0.022$), respectively). In contrast, the application of capsaicin ($100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) led to a significant decrease of the transepithelial current ($\Delta I_{\text{sc}} -3.25 \pm 1.16 \text{ }\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$, N/n = 4/6, $p = 0.02$). Thymol ($100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ and $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) showed clearly visible effects on the NH_4^+ induced current, although with great variability depending on the tissue studied (N/n = 2/4 and N/n = 6/9). The application of the solvent alone had no effect (N/n = 3/6). Similar effects could be demonstrated on ovine ruminal epithelium.
- Apical replacement of chloride by gluconate led to a hyperpolarization of the apical potential, suggesting a basolateral localisation of the anion-channels expressed by ruminal epithelial cells. A participation of these channels in the currents induced by TRP-modulators appears unlikely.

In summary, the results suggest an involvement of non-selective cation channels belonging to the TRP-family in the efflux of ammonia from the rumen. A participation of these channels in the efflux of protons across the ruminal epithelium to maintain pH-homeostasis is discussed. A targeted manipulation of ammonium transport across the ruminal epithelium of cows through breeding or the application of TRP-channel modulators appears possible.

8 Abkürzungsverzeichnis

AMT	Ammoniummethyllumonium transport
AQP	Aquaporin
AS	Aminosäure(n)
Ba ²⁺	Barium-Ion
CA	Carboanhydrase
Ca ²⁺	Calcium-Ion
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Cl ⁻	Chlorid-Ion
CO ₂	Kohlendioxid
DIDS	4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffer Saline
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-Tetraessigsäure
EIPA	5-(N-Ethyl-N-isopropyl)amiloride
EIPA	Ethyl-Isopropyl Amilorid
FKS	fetales Kälberserum
GHK	Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung
G _t	Gewebeleitfähigkeit
HCl	Chlorwasserstoff
HEPES	N-Hydroxyethyl-Piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HOE-642	4-Isopropyl-3-Methylsulfonylbenzoyl, Guanidin Methanesulfonat
HOE-694	3-Methylsulphonyl-4-Piperidinobenzoyl, Guanidin Hydrochlorid
HSCFA	protonierte kurzkettige Fettsäure
I _{sc}	Kurzschlussstrom
K ⁺	Kalium-Ion
LJP	Liquid Junction Potential
Mep	Methylammonium (ammonium permease)
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
Mg ²⁺	Magnesium-Ion

Abkürzungsverzeichnis

N	Anzahl der Tiere
n	Anzahl der Zellen/Epithelien
N ₂	molekularer Stickstoff
N ₂ O	Distickstoffmonoxid
Na ⁺	Natrium-Ion
NaOH	Natriumhydroxid
NH ₃	nichtionisierte Form des Ammoniaks
NH ₄ ⁺	Ammonium-Ion
NHE	Na ⁺ /H ⁺ -Austauscher
NMDG ⁺	N-Methyl-D-Glucamin
NO ₃ ⁻	Nitrat-Ion
NSCC	Non-Selective Cation Channel, nicht-selektiver Kationenkanal
O ₂	Sauerstoff
pA/pF	pico Ampere/pico Farad
PD _a	apikale Potentialdifferenz
PD _t	transepitheliale Potentialdifferenz
PEK	Pansenepithelzelle
pH _i	intrazellulärer pH-Wert
pH-Wert	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
pK-Wert	negativer dekadischer Logarithmus der Dissoziationskonstante eines Elektrolyten
Rh	Rhesusfaktor
R _t	Gewebewiderstand
SCFA	kurzkettige Fettsäuren
SCFA ⁻	kurzkettiges Fettsäureanion
SEM	standard error of the mean, Standardfehler des arithmetischen Mittelwertes
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRP	Transient Receptor Potential
TTX	Tetrodotoxin
UT	urea transporter, Harnstofftransporter
ZNS	Zentrales Nervensystem

9 Literaturverzeichnis

- Abdoun, K., Wolf, K., Arndt, G. und Martens, H. (2003). "Effect of ammonia on Na⁺ transport across isolated rumen epithelium of sheep is diet dependent." Br J Nutr **90** (4): 751-758.
- Abdoun, K., Stumpff, F., Wolf, K. und Martens, H. (2005). "Modulation of electroneutral Na transport in sheep rumen epithelium by luminal ammonia." Am J Physiol **289** (3): G508-520.
- Abdoun, K., Stumpff, F. und Martens, H. (2006). "Ammonia and urea transport across the rumen epithelium: a review." Anim Health Res Rev **7** (1-2): 43-59.
- Abdoun, K., Stumpff, F., Rabbani, I. und Martens, H. (2010). "Modulation of urea transport across sheep rumen epithelium in vitro by SCFA and CO₂." Am J Physiol **298** (2): G190-202.
- Agle, M., Hristov, A. N., Zaman, S., Schneider, C., Ndegwa, P. M. und Vaddella, V. K. (2010). "Effect of dietary concentrate on rumen fermentation, digestibility, and nitrogen losses in dairy cows." J Dairy Sci **93** (9): 4211-4222.
- Aguerre, M. J., Wattiaux, M. A., Powell, J. M., Broderick, G. A. und Arndt, C. (2011). "Effect of forage-to-concentrate ratio in dairy cow diets on emission of methane, carbon dioxide, and ammonia, lactation performance, and manure excretion." J Dairy Sci **94** (6): 3081-3093.
- Aickin, C. C. und Thomas, R. C. (1977). "An investigation of the ionic mechanism of intracellular pH regulation in mouse soleus muscle fibres." J Physiol **273** (1): 295-316.
- Albert, A. P., Saleh, S. N. und Large, W. A. (2009). "Identification of canonical transient receptor potential (TRPC) channel proteins in native vascular smooth muscle cells." Curr Med Chem **16** (9): 1158-1165.
- Allen, S. A. und Miller, E. L. (1976). "Determination of nitrogen requirement for microbial growth from the effect of urea supplementation of a low N diet on abomasal N flow and N recycling in wethers and lambs." Br J Nutr **36** (3): 353-368.
- Allison, M. J. (1969). "Biosynthesis of amino acids by ruminal microorganisms." J Anim Sci **29** (5): 797-807.
- Alpizar, Y. A., Gees, M., Sanchez, A., Apetrei, A., Voets, T., Nilius, B. und Talavera, K. (2013). "Bimodal effects of cinnamaldehyde and camphor on mouse TRPA1." Pflugers Arch **465** (6): 853-864.
- Andersson, D. A., Chase, H. W. und Bevan, S. (2004). "TRPM8 activation by menthol, icilin, and cold is differentially modulated by intracellular pH." J Neurosci **24** (23): 5364-5369.

- Andrade, E. L., Ferreira, J., Andre, E. und Calixto, J. B. (2006). "Contractile mechanisms coupled to TRPA1 receptor activation in rat urinary bladder." Biochem Pharmacol **72** (1): 104-114.
- Aronson, P. S., Suhm, M. A. und Nee, J. (1983). "Interaction of external H^+ with the Na^+-H^+ exchanger in renal microvillus membrane vesicles." J Biol Chem **258** (11): 6767-6771.
- Arruda, J. A. und Dytko, G. (1989). "Permeability of the urinary bladder of the turtle, *Pseudemys scripta elegans*, to ammonia." Comp Biochem Physiol A Comp Physiol **93** (3): 519-522.
- Aschenbach, J. R., Bilk, S., Tadesse, G., Stumpff, F. und Gäbel, G. (2009). "Bicarbonate-dependent and bicarbonate-independent mechanisms contribute to nondiffusive uptake of acetate in the ruminal epithelium of sheep." Am J Physiol **296** (5): 1098-1107.
- Awayda, M. S., Bengrine, A., Tobey, N. A., Stockand, J. D. und Orlando, R. C. (2004). "Nonselective cation transport in native esophageal epithelia." Am J Physiol Cell Physiol **287** (2): C395-402.
- Azarani, A., Goltzman, D. und Orlowski, J. (1995a). "Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide inhibit the apical Na^+/H^+ exchanger NHE-3 isoform in renal cells (OK) via a dual signaling cascade involving protein kinase A and C." J Biol Chem **270** (34): 20004-20010.
- Azarani, A., Orlowski, J. und Goltzman, D. (1995b). "Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide activate the Na^+/H^+ exchanger NHE-1 isoform in osteoblastic cells (UMR-106) via a cAMP-dependent pathway." J Biol Chem **270** (39): 23166-23172.
- Bakouh, N., Benjelloun, F., Hulin, P., Brouillard, F., Edelman, A., Cherif-Zahar, B. und Planelles, G. (2004). " NH_3 is involved in the NH_4^+ transport induced by the functional expression of the human Rh C glycoprotein." J Biol Chem **279** (16): 15975-15983.
- Bandell, M., Story, G. M., Hwang, S. W., Viswanath, V., Eid, S. R., Petrus, M. J., Earley, T. J. und Patapoutian, A. (2004). "Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin." Neuron **41** (6): 849-857.
- Barry, P. H. und Lynch, J. W. (1991). "Liquid junction potentials and small cell effects in patch-clamp analysis." J Membr Biol **121** (2): 101-117.
- Behrendt, H. J., Germann, T., Gillen, C., Hatt, H. und Jostock, R. (2004). "Characterization of the mouse cold-menthol receptor TRPM8 and vanilloid receptor type-1 VR1 using a fluorometric imaging plate reader (FLIPR) assay." Br J Pharmacol **141** (4): 737-745.
- Benn, B. S., Ajibade, D., Porta, A., Dhawan, P., Hediger, M., Peng, J. B., Jiang, Y., Oh, G. T., Jeung, E. B., Lieben, L., Bouillon, R., Carmeliet, G. und Christakos, S. (2008). "Active

- intestinal calcium transport in the absence of transient receptor potential vanilloid type 6 and calbindin-D9k." Endocrinology **149** (6): 3196-3205.
- Berry, P. H. und Coleman, J. Y. (1998). "Ionic mobility tables." Abgerufen am 18/10/2013 um 14 Uhr, von http://web.med.unsw.edu.au/phbsoft/mobility_listings.htm.
- Bianco, S. D., Peng, J. B., Takanaga, H., Suzuki, Y., Crescenzi, A., Kos, C. H., Zhuang, L., Freeman, M. R., Gouveia, C. H., Wu, J., Luo, H., Mauro, T., Brown, E. M. und Hediger, M. A. (2007). "Marked disturbance of calcium homeostasis in mice with targeted disruption of the Trpv6 calcium channel gene." J Bone Miner Res **22** (2): 274-285.
- Bödeker, D., Winkler, A. und Holler, H. (1990). "Ammonia absorption from the isolated reticulo-rumen of sheep." Exp Physiol **75** (4): 587-595.
- Bödeker, D., Shen, Y., Kemkowski, J. und Holler, H. (1992a). "Influence of short-chain fatty acids on ammonia absorption across the rumen wall in sheep." Exp Physiol **77** (2): 369-376.
- Bödeker, D., Oppelland, G. und Holler, H. (1992b). "Involvement of carbonic anhydrase in ammonia flux across rumen mucosa in vitro." Exp Physiol **77** (3): 517-519.
- Bödeker, D. und Kemkowski, J. (1996). "Participation of NH_4^+ in total ammonia absorption across the rumen epithelium of sheep (*Ovis aries*)." Comp Biochem Physiol A Physiol **114** (4): 305-310.
- Boron, W. F. und De Weer, P. (1976). "Intracellular pH transients in squid giant axons caused by CO_2 , NH_3 , and metabolic inhibitors." J Gen Physiol **67** (1): 91-112.
- Boron, W. F. (2010). "Sharpey-Schafer lecture: gas channels." Exp Physiol **95** (12): 1107-1130.
- Boudry, G. und Perrier, C. (2008). "Thyme and cinnamon extracts induce anion secretion in piglet small intestine via cholinergic pathways." J Physiol Pharmacol **59** (3): 543-552.
- Bourgeois, S., Meer, L. V., Wootla, B., Bloch-Faure, M., Chambrey, R., Shull, G. E., Gawenis, L. R. und Houillier, P. (2010). "NHE4 is critical for the renal handling of ammonia in rodents." J Clin Invest **120** (6): 1895-1904.
- Briggs, P. K., Hogan, J. P. und Reid, R. L. (1957). "Effect of volatile fatty acids, lactic acid and ammonia on rumen pH in sheep." Aust J Agric Res **8** (6): 674 - 690.
- Brinkmann, I. (2007). Charakterisierung eines nicht selektiven Kationenkanals in Epithelzellen des Pansens von Schafen. Institut für Veterinär-Physiologie. Berlin, Freie Universität Berlin; Dissertation: 143.

- Bryant, M. P. und Robinson, I. M. (1962). "Some nutritional characteristics of predominant culturable ruminal bacteria." J Bacteriol **84**: 605-614.
- Bugaut, M. (1987). "Occurrence, absorption and metabolism of short chain fatty acids in the digestive tract of mammals." J Physiol **113** (2-3): 189-206
- Burckhardt, B. C. und Frömter, E. (1992). "Pathways of $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ permeation across *Xenopus laevis* oocyte cell membrane." Pflugers Arch **420** (1): 83-86.
- Cahusac, P. M. (2009). "Effects of transient receptor potential (TRP) channel agonists and antagonists on slowly adapting type II mechanoreceptors in the rat sinus hair follicle." J Peripher Nerv Syst **14** (4): 300-309.
- Calsamiglia, S., Ferret, A., Reynolds, C. K., Kristensen, N. B. und van Vuuren, A. M. (2010). "Strategies for optimizing nitrogen use by ruminants." Animal **4** (7): 1184-1196.
- Care, A. D., Brown, R. C., Farrar, A. R. und Pickard, D. W. (1984). "Magnesium absorption from the digestive tract of sheep." Q J Exp Physiol **69** (3): 577-587.
- Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D. und Julius, D. (1997). "The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway." Nature **389** (6653): 816-824.
- Caterina, M. J., Leffler, A., Malmberg, A. B., Martin, W. J., Trafton, J., Petersen-Zeitz, K. R., Koltzenburg, M., Basbaum, A. I. und Julius, D. (2000). "Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor." Science **288** (5464): 306-313.
- Cermak, R., Minck, K., Lawnitzak, C. und Scharrer, E. (2002). "Ammonia inhibits sodium and chloride absorption in rat distal colon." Exp Physiol **87** (3): 311-319.
- Chambrey, R., St John, P. L., Eladari, D., Quentin, F., Warnock, D. G., Abrahamson, D. R., Podevin, R. A. und Paillard, M. (2001). "Localization and functional characterization of Na^+/H^+ exchanger isoform NHE4 in rat thick ascending limbs." Am J Physiol Renal Physiol **281** (4): F707-717.
- Cheng, H., Beck, A., Launay, P., Gross, S. A., Stokes, A. J., Kinet, J. P., Fleig, A. und Penner, R. (2007). "TRPM4 controls insulin secretion in pancreatic beta-cells." Cell Calcium **41** (1): 51-61.
- Chien, W. J. und Stevens, C. E. (1972). "Coupled active transport of Na and Cl across forestomach epithelium." Am J Physiol **223** (4): 997-1003.
- Clapham, D. E., Montell, C., Schultz, G. und Julius, D. (2003). "International Union of Pharmacology. XLIII. Compendium of voltage-gated ion channels: transient receptor potential channels." Pharmacol Rev **55** (4): 591-596.

- Clapham, D. E. (2003). "TRP channels as cellular sensors." *Nature* **426** (6966): 517-524.
- Danielli, J. F., Hitchcock, W. S., Marshal, R. A. und Phillipson, A. T. (1945). "The mechanism of absorption from the rumen as exemplified by the behaviour of acetic, propionic, and butyric acids." *J Exp Biol* **22**: 75-84.
- Davis, J. B., Gray, J., Gunthorpe, M. J., Hatcher, J. P., Davey, P. T., Overend, P., Harries, M. H., Latcham, J., Clapham, C., Atkinson, K., Hughes, S. A., Rance, K., Grau, E., Harper, A. J., Pugh, P. L., Rogers, D. C., Bingham, S., Randall, A. und Sheardown, S. A. (2000). "Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia." *Nature* **405** (6783): 183-187.
- Decker, P., Hill, H., Gärtner, K. und Hörnicke, H. (1961). "Über die Wiederverwertung des Körperharnstoffes im Pansen des Wiederkäuers nach Versuchen mit ^{14}C - Harnstoff an der Ziege." *Dt Tierärztl Wschr* **67**: 539.
- Delgado-Elorduy, A., Theurer, C. B., Huber, J. T., Alio, A., Lozano, O., Sadik, M., Cuneo, P., De Young, H. D., Simas, I. J., Santos, J. E., Nussio, L., Nussio, C., Webb, K. E., Jr. und Tagari, H. (2002a). "Splanchnic and mammary nitrogen metabolism by dairy cows fed dry-rolled or steam-flaked sorghum grain." *J Dairy Sci* **85** (1): 148-159.
- Delgado-Elorduy, A., Theurer, C. B., Huber, J. T., Alio, A., Lozano, O., Sadik, M., Cuneo, P., De Young, H. D., Simas, I. J., Santos, J. E., Nussio, L., Nussio, C., Webb, K. E., Jr. und Tagari, H. (2002b). "Splanchnic and mammary nitrogen metabolism by dairy cows fed steam-rolled or steam-flaked corn." *J Dairy Sci* **85** (1): 160-168.
- Dengler, F., Rackwitz, R., Benesch, F., Pfannkuche, H. und Gabel, G. (2013). "Bicarbonate-dependent transport of acetate and butyrate across the basolateral membrane of sheep rumen epithelium." *Acta Physiol (Oxf)*. DOI 10.1111/apha.12155
- DeSoignie, R. und Sellin, J. H. (1994). "Propionate-initiated changes in intracellular pH in rabbit colonocytes." *Gastroenterology* **107** (2): 347-356.
- Diernaes, L., Sehested, J., Moller, P. D. und Skadhauge, E. (1994). "Sodium and chloride transport across the rumen epithelium of cattle in vitro: effect of short-chain fatty acids and amiloride." *Exp Physiol* **79** (5): 755-762.
- Dijkstra, J., Oenema, O., van Groenigen, J. W., Spek, J. W., van Vuuren, A. M. und Bannink, A. (2013). "Diet effects on urine composition of cattle and N_2O emissions." *Animal* **7** Suppl 2: 292-302.
- Dimke, H., Hoenderop, J. G. und Bindels, R. J. (2011). "Molecular basis of epithelial Ca^{2+} and Mg^{2+} transport: insights from the TRP channel family." *J Physiol* **589** (Pt 7): 1535-1542.
- Dobson, A. und Phillipson, A. T. (1958). "The absorption of chloride ions from the reticulo-rumen sac." *J Physiol* **140** (1): 94-104.

- Dobson, A. (1959). "Active transport through the epithelium of the reticulo-rumen sac." J Physiol **146** (2): 235-251.
- Fakler, B. und Fahlke, C. (2010). Grundlagen zellulärer Erregbarkeit. Physiologie des Menschen. R. F. Schmidt, F. Lang und M. Heckmann. Heidelberg, Springer Medizin Verlag. ISBN 978-3-642-01650-9; S.57-84
- Farco, J. A. und Grundmann, O. (2013). "Menthol-pharmacology of an important naturally medicinal "cool"." Mini Rev Med Chem **13** (1): 124-131.
- Ferreira, H. G., Harrison, F. A. und Keynes, R. D. (1966a). "The potential and short-circuit current across isolated rumen epithelium of the sheep." J Physiol **187**: 631-644.
- Ferreira, H. G., Harrison, F. A., Keynes, R. D. und Nauss, A. H. (1966b). "Observations on the potential across the rumen of sheep." J Physiol **187**: 615-630.
- Firth, A. L., Remillard, C. V. und Yuan, J. X. (2007). "TRP channels in hypertension." Biochim Biophys Acta **1772** (8): 895-906.
- Freichel, M., Suh, S. H., Pfeifer, A., Schweig, U., Trost, C., Weissgerber, P., Biel, M., Philipp, S., Freise, D., Droogmans, G., Hofmann, F., Flockerzi, V. und Nilius, B. (2001). "Lack of an endothelial store-operated Ca^{2+} current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4^{-/-} mice." Nat Cell Biol **3** (2): 121-127.
- Freyer, M. (2005). In vitro Untersuchungen zur Widerstandsanalyse des Pansenepithels in Abhängigkeit von intraruminalen Veränderungen. Institut für Veterinär-Physiologie. Berlin, Freie Universität Berlin; Dissertation: 139.
- Fromm, M. (2004). Transport in Membranen und Epithelien. Physiologie des Menschen. R. F. Schmidt, F. Lang und G. Thews. Heidelberg, Springer. ISBN 4-24.978-3-642-01650-9; S. 39-55.
- Gäbel, G. und Martens, H. (1986). "The Effect of Ammonia on Magnesium Metabolism in Sheep." J Anim Physiol Anim Nutr **55**: 278-287.
- Gäbel, G., Bestmann, M. und Martens, H. (1991a). "Influences of diet, short-chain fatty acids, lactate and chloride on bicarbonate movement across the reticulo-rumen wall of sheep." Zbl Vet Med A **38** (7): 523-529.
- Gäbel, G., Vogler, S. und Martens, H. (1991b). "Short-chain fatty acids and CO₂ as regulators of Na⁺ and Cl⁻ absorption in isolated sheep rumen mucosa." J Comp Physiol (B) **161** (4): 419-426.
- Gäbel, G. und Sehested, J. (1997). "SCFA transport in the forestomach of ruminants." Comp Biochem Physiol A Physiol **118** (2): 367-374.

- Gäbel, G., Butter, H. und Martens, H. (1999). "Regulatory role of cAMP in transport of Na⁺, Cl⁻ and short-chain fatty acids across sheep ruminal epithelium." Exp Physiol **84** (2): 333-345.
- Gäbel, G. und Aschenbach, J. R. (2002). "Influence of food deprivation on the transport of 3-O-methyl-alpha-D-glucose across the isolated ruminal epithelium of sheep." J Anim Sci **80** (10): 2740-2746.
- Galfi, P., Neogrady, S. und Kutas, F. (1981). "Culture of epithelial cells from bovine ruminal mucosa." Vet Res Commun **4** (4): 295-300.
- Gamberucci, A., Giurisato, E., Pizzo, P., Tassi, M., Giunti, R., McIntosh, D. P. und Benedetti, A. (2002). "Diacylglycerol activates the influx of extracellular cations in T-lymphocytes independently of intracellular calcium-store depletion and possibly involving endogenous TRP6 gene products." Biochem J **364** (Pt 1): 245-254.
- Gärtner, K., Decker, P. und Hill, H. (1961). "Untersuchungen über die Passage von Harnstoff und Ammoniak durch die Pansenwand von Ziegen." Pflugers Arch **274**: 281-288.
- Gärtner, K. (1962). "Untersuchungen über den Transportmechanismus von Harnstoff-Stickstoff durch die Pansenschleimhaut von Rindern in vitro." Pflugers Arch **276**: 292-302.
- Gärtner, K. (1963). "Untersuchungen in vitro über die Ammoniakpassage durch die Pansenschleimhaut von Rindern und deren Beeinflussung durch pH-Wert und antidiuretisches Hormon." Zbl Vet Med A: 11-20.
- Gärtner, K. und von Engelhardt, W. (1964). "[Experiments concerning the resorption mechanism of ammonia through the ruminal mucosa of ruminants]." Dtsch Tierarztl Wochenschr **71** (3): 57-60.
- Georgi, M. I. (2011). Charakterisierung eines nicht selektiven Anionenkanals an kultivierten Pansen- und Psalterepithelzellen des Schafes. Institut für Veterinär-Physiologie. Berlin, Freie Universität Berlin: 178.
- Georgi, M. I., Rosendahl, J., Ernst, F., Günzel, D., Aschenbach, J. R., Martens, H. und Stumpff, F. (2013). "Epithelia of the ovine and bovine forestomach express basolateral maxi-anion channels permeable to the anions of short-chain fatty acids." Pflugers Arch. DOI 10.1007/S00424-013-1386-x
- Geyer, R. R., Musa-Aziz, R., Qin, X. und Boron, W. F. (2013a). "Relative CO₂/NH₃ selectivities of mammalian aquaporins 0-9." Am J Physiol Cell Physiol **304** (10): C985-994.
- Geyer, R. R., Musa-Aziz, R., Enkavi, G., Mahinthichaichan, P., Tajkhorshid, E. und Boron, W. F. (2013b). "Movement of NH₃ through the human urea transporter B: a new gas channel." Am J Physiol Renal Physiol **304** (12): F1447-1457.

- Good, D. W. (1988). "Active absorption of NH_4^+ by rat medullary thick ascending limb: inhibition by potassium." Am J Physiol **255** (1 Pt 2): F78-87.
- Good, D. W. (1994). "Ammonium transport by the thick ascending limb of Henle's loop." Annu Rev Physiol **56**: 623-647.
- Goytain, A. und Quamme, G. A. (2005). "Identification and characterization of a novel mammalian Mg^{2+} transporter with channel-like properties." BMC Genomics **6**: 48.
- Graham, C. und Simmons, N. L. (2005). "Functional organization of the bovine rumen epithelium." Am J Physiol **288** (1): R173-181.
- Graham, C., Gatherar, I., Haslam, I., Glanville, M. und Simmons, N. L. (2007). "Expression and localization of monocarboxylate transporters and sodium/proton exchangers in bovine rumen epithelium." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **292** (2): R997-1007.
- Hall, M. B. und Huntington, G. B. (2008). "Nutrient synchrony: sound in theory, elusive in practice." J Anim Sci **86** (14 Suppl): E287-292.
- Harmeyer, J. und Martens, H. (1980). "Aspects of urea metabolism in ruminants with reference to the goat." J Dairy Sci **63** (10): 1707-1728.
- Harrison, F. A., Keynes, R. D., Rankin, J. C. und Zurich, L. (1975). "The effect of ouabain on ion transport across isolated sheep rumen epithelium." J Physiol **249** (3): 669-677.
- Hoenderop, J. G., van Leeuwen, J. P., van der Eerden, B. C., Kersten, F. F., van der Kemp, A. W., Merillat, A. M., Waarsing, J. H., Rossier, B. C., Vallon, V., Hummler, E. und Bindels, R. J. (2003). "Renal Ca^{2+} wasting, hyperabsorption, and reduced bone thickness in mice lacking TRPV5." J Clin Invest **112** (12): 1906-1914.
- Hogan, J. P. (1961). "The absorption of ammonia through the rumen of the sheep." Aust J Biol Sci **14**: 448.
- Holm, L. M., Jahn, T. P., Moller, A. L., Schjoerring, J. K., Ferri, D., Klaerke, D. A. und Zeuthen, T. (2005). " NH_3 and NH_4^+ permeability in aquaporin-expressing *Xenopus* oocytes." Pflugers Arch **450** (6): 415-428.
- Holzer, P. (2011a). "Transient receptor potential (TRP) channels as drug targets for diseases of the digestive system." Pharmacol Ther **131** (1): 142-170.
- Holzer, P. (2011b). "TRP channels in the digestive system." Curr Pharm Biotechnol **12** (1): 24-34.
- Haupt, T. R. (1959). "Utilization of blood urea in ruminants." Am J Physiol **197** (1): 115-120.

- Houpt, T. R. und Houpt, K. A. (1968). "Transfer of urea nitrogen across the rumen wall." Am J Physiol **214** (6): 1296-1303.
- Hristov, A. und Broderick, G. A. (1994). "In vitro determination of ruminal protein degradability using [15N]ammonia to correct for microbial nitrogen uptake." J Anim Sci **72** (5): 1344-1354.
- IFA und Unfallversicherung, I.f.A.d.D.G. (2012). "GESTIS Stoffdatenbank Ammoniak." Abgerufen am 10.12.2013 um 12.45 Uhr, von [http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/000000.xml?f=templates\\$fn=default.htm\\$3.0](http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/000000.xml?f=templates$fn=default.htm$3.0).
- Janssens, A. und Voets, T. (2011). "Ligand stoichiometry of the cold- and menthol-activated channel TRPM8." J Physiol **589** (Pt 20): 4827-4835.
- Jardin, I., Dionisio, N., Lopez, J. J., Salido, G. M. und Rosado, J. A. (2013). "Pharmacology of TRP Channels in the Vasculature." Curr Vasc Pharmacol **11** (4): 480-489.
- Kaji, I., Karaki, S. und Kuwahara, A. (2011). "Effects of luminal thymol on epithelial transport in human and rat colon." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **300** (6): G1132-1143.
- Kandasamy, R. A., Yu, F. H., Harris, R., Boucher, A., Hanrahan, J. W. und Orłowski, J. (1995). "Plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger isoforms (NHE-1, -2, and -3) are differentially responsive to second messenger agonists of the protein kinase A and C pathways." J Biol Chem **270** (49): 29209-29216.
- Kang-Meznarich, J. H. und Broderick, G. A. (1980). "Effects of Incremental Urea Supplementation on Ruminal Ammonia Concentration and Bacterial Protein Formation." J Anim Sci **2** (51): 422-431.
- Karashima, Y., Damann, N., Prenen, J., Talavera, K., Segal, A., Voets, T. und Nilius, B. (2007). "Bimodal action of menthol on the transient receptor potential channel TRPA1." J Neurosci **27** (37): 9874-9884.
- Keicher, E. und Meech, R. (1994). "Endogenous Na⁺-K⁺ (or NH₄⁺)-2Cl⁻ cotransport in Rana oocytes; anomalous effect of external NH₄⁺ on pHi." J Physiol **475** (1): 45-57.
- Kemp, P. J. und Kim, K. J. (2004). "Spectrum of ion channels in alveolar epithelial cells: implications for alveolar fluid balance." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **287** (3): L460-464.
- Kennedy, P. und Milligan, L. (1980). "The degradation and utilization of endogenous urea in the gastrointestinal tract of ruminants: a review." Can J Anim Sci **60**: 205-221.

- Kennedy, P. M. (1980). "The effects of dietary sucrose and the concentration of plasma urea and rumen ammonia on the degradation of urea in the gastrointestinal tract of cattle." Br J Nutr **43** (1): 125-140.
- Kenyon, E., Maminishkis, A., Joseph, D. P. und Miller, S. S. (1997). "Apical and basolateral membrane mechanisms that regulate pHi in bovine retinal pigment epithelium." Am J Physiol **273** (2 Pt 1): C456-472.
- Khan, K. und Elia, M. (1991). "Factors affecting the stability of L-glutamine in solution." Clin Nutr **10** (4): 186-192.
- Kikeri, D., Sun, A., Zeidel, M. L. und Hebert, S. C. (1989). "Cell membranes impermeable to NH₃." Nature **339** (6224): 478-480.
- Kinne, R., Kinne-Saffran, E., Schutz, H. und Scholermann, B. (1986). "Ammonium transport in medullary thick ascending limb of rabbit kidney: involvement of the Na⁺,K⁺,Cl⁻-cotransporter." J Membr Biol **94** (3): 279-284.
- Kinsella, J. L. und Aronson, P. S. (1981). "Interaction of NH₄⁺ and Li⁺ with the renal microvillus membrane Na⁺-H⁺ exchanger." Am J Physiol **241** (5): C220-226.
- Kirchgeßner, M., Roth, F. X. und Windisch, W. (1993). "Verminderung der Stickstoff- und Methanausscheidung von Schwein und Rind durch die Fütterung." Übers Tierernährg **21**: 89-120.
- Kirchgeßner, M., Roth, F. X., Schwarz, F. J. und Stangl, G. I. (2011). Tierernährung. Frankfurt am Main, DLG-Verlag GmbH. ISBN 978-3-7690-0803-6.
- Köttgen, M., Leipziger, J., Fischer, K. G., Nitschke, R. und Greger, R. (1994). "pH regulation in HT29 colon carcinoma cells." Pflugers Arch **428** (2): 179-185.
- Kramer, T., Michelberger, T., Gurtler, H. und Gäbel, G. (1996). "Absorption of short-chain fatty acids across ruminal epithelium of sheep." J Comp Physiol (B) **166** (4): 262-269.
- Kreydiyyeh, S. I., Usta, J. und Copti, R. (2000). "Effect of cinnamon, clove and some of their constituents on the Na⁺-K⁺-ATPase activity and alanine absorption in the rat jejunum." Food Chem Toxicol **38** (9): 755-762.
- Kusumoto, I. (2001). "Industrial production of L-glutamine." J Nutr **131** (9 Suppl): 2552S-2555S.
- Lang, I. (1997). In vitro Untersuchungen zur Charakterisierung eines spannungsabhängigen Kationenkanals in der luminalen Membran des Pansenepithels beim Schaf. Institut für Veterinär-Physiologie. Berlin, Freie Universität Berlin; Dissertation: 116.

- Lang, I. und Martens, H. (1999). "Na transport in sheep rumen is modulated by voltage-dependent cation conductance in apical membrane." Am J Physiol **277** (3 Pt 1): G609-618.
- Lascano, G. J., Zanton, G. I., Moody, M. L., Topper, P. A., Wheeler, E. F. und Heinrichs, A. J. (2008). "Short communication: effect of changing the ratio of forage to concentrate on ammonia emissions by dairy heifers." J Dairy Sci **91** (11): 4301-4306.
- Latorre, R. und Miller, C. (1983). "Conduction and selectivity in potassium channels." J Membr Biol **71** (1-2): 11-30.
- Lee, H. W., Verlander, J. W., Handlogten, M. E., Han, K. H., Cooke, P. S. und Weiner, I. D. (2013). "Expression of the rhesus glycoproteins, ammonia transporter family members, RHCG and RHBG in male reproductive organs." Reproduction **146** (3): 283-296.
- Lee, S. P., Buber, M. T., Yang, Q., Cerne, R., Cortes, R. Y., Sprous, D. G. und Bryant, R. W. (2008). "Thymol and related alkyl phenols activate the hTRPA1 channel." Br J Pharmacol **153** (8): 1739-1749.
- Leonhard-Marek, S. und Martens, H. (1996). "Effects of potassium on magnesium transport across rumen epithelium." Am J Physiol **271** (6 Pt 1): G1034-1038.
- Leonhard-Marek, S., Gabel, G. und Martens, H. (1998). "Effects of short chain fatty acids and carbon dioxide on magnesium transport across sheep rumen epithelium." Exp Physiol **83** (2): 155-164.
- Leonhard-Marek, S. (2002). "Divalent cations reduce the electrogenic transport of monovalent cations across rumen epithelium." J Comp Physiol (B) **172** (7): 635-641.
- Leonhard-Marek, S., Stumpff, F., Brinkmann, I., Breves, G. und Martens, H. (2005). "Basolateral Mg²⁺/Na⁺ exchange regulates apical nonselective cation channel in sheep rumen epithelium via cytosolic Mg²⁺." Am J Physiol **288** (4): G630-645.
- Leonhard-Marek, S. und Stumpff, F. (2005). Forskolin and Isoproterenol affect Na, K and Rb currents across forestomach epithelium. J Physiol. Biochem **61** (4): 581.
- Leonhard-Marek, S., Breves, G. und Busche, R. (2006). "Effect of chloride on pH microclimate and electrogenic Na⁺ absorption across the rumen epithelium of goat and sheep." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **291** (2): G246-252.
- Leonhard-Marek, S., Stumpff, F. und Martens, H. (2010). "Transport of cations and anions across forestomach epithelia: conclusions from in vitro studies." Animal **4**: 1037-1056.
- Leonhard, S., Smith, E., Martens, H., Gabel, G. und Ganzoni, E. (1990). "Transport of magnesium across an isolated preparation of sheep rumen: a comparison of MgCl₂, Mg aspartate, Mg pidolate, and Mg-EDTA." Magnes Trace Elem **9** (5): 265-271.

- Lewis, D., Hill, K. J. und Annison, E. F. (1957). "Studies on the portal blood of sheep. I. Absorption of ammonia from the rumen of the sheep." Biochem J **66** (4): 587-592.
- Liebich, H.-G. (2004). Funktionelle Histologie der Haussäugetiere. Stuttgart, Schattauer. ISBN 3-7945-2311-3.
- Litman, T., Sogaard, R. und Zeuthen, T. (2009). "Ammonia and urea permeability of mammalian aquaporins." Handb Exp Pharmacol (190): 327-358.
- Lu, Z., Stumpff, F., Deiner, C., Rosendahl, J., Braun, H., Abdoun, K., Aschenbach, J. R. und Martens, H. (2014). "Modulation of sheep rumen urea transport by ammonia and pH." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **307** (5): R558-570.
- Ludden, P. A., Stohrer, R. M., Austin, K. J., Atkinson, R. L., Belden, E. L. und Harlow, H. J. (2009). "Effect of protein supplementation on expression and distribution of urea transporter-B in lambs fed low-quality forage." J Anim Sci **87** (4): 1354-1365.
- Ludewig, U. (2004). "Electroneutral ammonium transport by basolateral rhesus B glycoprotein." J Physiol **559** (Pt 3): 751-759.
- Macpherson, L. J., Hwang, S. W., Miyamoto, T., Dubin, A. E., Patapoutian, A. und Story, G. M. (2006). "More than cool: promiscuous relationships of menthol and other sensory compounds." Mol Cell Neurosci **32** (4): 335-343.
- Magyar, J., Szentandrassy, N., Banyasz, T., Fulop, L., Varro, A. und Nanasi, P. P. (2002). "Effects of thymol on calcium and potassium currents in canine and human ventricular cardiomyocytes." Br J Pharmacol **136** (2): 330-338.
- Mak, D. O., Dang, B., Weiner, I. D., Foskett, J. K. und Westhoff, C. M. (2006). "Characterization of ammonia transport by the kidney Rh glycoproteins RhBG and RhCG." Am J Physiol Renal Physiol **290** (2): F297-305.
- Marini, J. C. und Van Amburgh, M. E. (2003). "Nitrogen metabolism and recycling in Holstein heifers." J Anim Sci **81** (2): 545-552.
- Martens, H. und Rayssiguier, Y. (1980). "Magnesium metabolism and hypomagnesaemia. In: Proceedings of the 5th International Symposium on Ruminant Physiology (ed. Ruckebush, Y & Thivend, P.)." 447-466.
- Martens, H., Gäbel, G. und Strozyk, H. (1987). "The effect of potassium and the transmural potential difference on magnesium transport across an isolated preparation of sheep rumen epithelium." Q J Exp Physiol **72** (2): 181-188.
- Martens, H. und Gäbel, G. (1988). "Transport of Na and Cl across the epithelium of ruminant forestomachs: rumen and omasum. A review." Comp Biochem Physiol A **90** (4): 569-575.

- Martens, H., Heggemann, G. und Regier, K. (1988). "Studies on the effect of K, Na, NH_4^+ , VFA and CO_2 on the net absorption of magnesium from the temporarily isolated rumen of heifers." Zentralbl Veterinarmed A **35** (1): 73-80.
- Martens, H., Gäbel, G. und Strozyk, B. (1991). "Mechanism of electrically silent Na and Cl transport across the rumen epithelium of sheep." Exp Physiol **76**: 103-114.
- Masson, M. J. und Phillipson, A. T. (1951). "The absorption of acetate, propionate and butyrate from the rumen of sheep." J Physiol **113** (2-3): 189-206.
- McDonald, I. W. (1948). "The absorption of ammonia from the rumen of the sheep." Biochem J **42** (4): 584-587.
- McKemy, D. D., Neuhauser, W. M. und Julius, D. (2002). "Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation." Nature **416** (6876): 52-58.
- Mercer, J. R. und Annison, E. F. (1976). Utilization of nitrogen in ruminants. Protein metabolism and nutrition. Cole D.J.A. et al. London, Butterworth and Co.: 397-416
- Mohammadi, B., Haeseler, G., Leuwer, M., Dengler, R., Krampf, K. und Bufler, J. (2001). "Structural requirements of phenol derivatives for direct activation of chloride currents via GABA(A) receptors." Eur J Pharmacol **421** (2): 85-91.
- Möller, D. (2009). "Luftverschmutzung durch Industrie, Landwirtschaft und Haushalte." Abgerufen am 19.10.2013 um 11.30 Uhr, von <http://www.bpb.de/gesellschaft/umwelt/dossier-umwelt/61246/luftverschmutzung>.
- Montell, C., Birnbaumer, L. und Flockerzi, V. (2002). "The TRP channels, a remarkably functional family." Cell **108** (5): 595-598.
- Montell, C. (2005). "The TRP superfamily of cation channels." Sci STKE **2005** (272): re3.
- Montell, C. (2011). "The history of TRP channels, a commentary and reflection." Pflugers Arch **461** (5): 499-506.
- Moqrich, A., Hwang, S. W., Earley, T. J., Petrus, M. J., Murray, A. N., Spencer, K. S., Andahazy, M., Story, G. M. und Patapoutian, A. (2005). "Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin." Science **307** (5714): 1468-1472.
- Mudry, B., Guy, R. H. und Delgado-Charro, M. B. (2006). "Transport numbers in transdermal iontophoresis." Biophys J **90** (8): 2822-2830.
- Müller, F., Aschenbach, J. R. und Gäbel, G. (2000). "Role of Na^+/H^+ exchange and HCO_3^- transport in pH_i recovery from intracellular acid load in cultured epithelial cells of sheep rumen." J Comp Physiol (B) **170** (4): 337-343.

- Musa-Aziz, R., Chen, L. M., Pelletier, M. F. und Boron, W. F. (2009). "Relative CO₂/NH₃ selectivities of AQP1, AQP4, AQP5, AmtB, and RhAG." Proc Natl Acad Sci U S A **106** (13): 5406-5411.
- Muscher, A. S., Schroder, B., Breves, G. und Huber, K. (2010). "Dietary nitrogen reduction enhances urea transport across goat rumen epithelium." J Anim Sci **88** (10): 3390-3398.
- Mustafa, S. und Oriowo, M. (2005). "Cooling-induced contraction of the rat gastric fundus: mediation via transient receptor potential (TRP) cation channel TRPM8 receptor and Rho-kinase activation." Clin Exp Pharmacol Physiol **32** (10): 832-838.
- Nagami, G. T. (1990). "Effect of bath and luminal potassium concentration on ammonia production and secretion by mouse proximal tubules perfused in vitro." J Clin Invest **86** (1): 32-39.
- Nakamura, S., Amlal, H., Galla, J. H. und Soleimani, M. (1999). "NH₄⁺ secretion in inner medullary collecting duct in potassium deprivation: role of colonic H⁺-K⁺-ATPase." Kidney Int **56** (6): 2160-2167.
- Nakhoul, N. L., Hering-Smith, K. S., Abdulnour-Nakhoul, S. M. und Hamm, L. L. (2001). "Transport of NH₃/NH₄⁺ in oocytes expressing aquaporin-1." Am J Physiol Renal Physiol **281** (2): F255-263.
- Nakhoul, N. L., Dejong, H., Abdulnour-Nakhoul, S. M., Boulpaep, E. L., Hering-Smith, K. und Hamm, L. L. (2005). "Characteristics of renal Rhbg as an NH₄⁺ transporter." Am J Physiol Renal Physiol **288** (1): F170-181.
- Namer, B., Seifert, F., Handwerker, H. O. und Maihofner, C. (2005). "TRPA1 and TRPM8 activation in humans: effects of cinnamaldehyde and menthol." Neuroreport **16** (9): 955-959.
- Nealen, M. L., Gold, M. S., Thut, P. D. und Caterina, M. J. (2003). "TRPM8 mRNA is expressed in a subset of cold-responsive trigeminal neurons from rat." J Neurophysiol **90** (1): 515-520.
- Neher, E. und Sakmann, B. (1976). "Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres." Nature **260** (5554): 799-802.
- Neuenschwander, U. (2012) Abgerufen am 18.10.2013 um 9.00 Uhr, von <http://www.derneueschwan.ch/chemieberatung/question.php?q=14>.
- Nilius, B., Owsianik, G., Voets, T. und Peters, J. A. (2007). "Transient receptor potential cation channels in disease." Physiol Rev **87** (1): 165-217.
- Nilius, B. und Biro, T. (2013). "TRPV3: a 'more than skinny' channel." Exp Dermatol **22** (7): 447-452.

- Nocek, J. E. (1997). "Bovine acidosis: implications on laminitis." J Dairy Sci **80** (5): 1005-1028.
- Nolan, J. V. und Stachiw, S. (1979). "Fermentation and nitrogen dynamics in Merino sheep given a low-quality-roughage diet." Br J Nutr **42** (1): 63-80.
- Norton, B. W., Janes, A. N. und Armstrong, D. G. (1982). "The effects of intraruminal infusions of sodium bicarbonate, ammonium chloride and sodium butyrate on urea metabolism in sheep." Br J Nutr **48** (2): 265-274.
- Numberger, M. und Draguhn, A. (1996). Patch-Clamp-Technik, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg; Berlin; Oxford. ISBN 3-8274-0023-6.
- Oberleithner, H. (2004). Grundlagen der Zellphysiologie. Physiologie des Menschen. R. F. Schmidt, F. Lang und G. Thews. Heidelberg, Springer. ISBN 4-24.978-3-642-01650-9; S. 3-24.
- Oenema, O., Bannink, A., Sommer, S. G., van Groenigen, J. W. und Velthof, G. L. (2008). Gaseous nitrogen emissions from livestock farming systems. Nitrogen in the environment sources, problems, and management. J. L. Hatfield und R. F. Follett. London, Elsevier. ISBN 978-0-12-374347-3; S: 395-411.
- Okorie, A. U., Buttery, P. J. und Lewis, D. (1977). "Ammonia concentration and protein synthesis in the rumen." Proc Nutr Soc **36** (1): 38A.
- Overton, E. (1897). "Über die osmotischen Eigenschaften der Zelle in ihrer Bedeutung für die Toxikologie und Pharmakologie." Z Phys Chem. **22**: 189–209.
- Overton, E. (1901). Studien über die Narkose, zugleich ein Beitrag zur allgemeinen Pharmakologie. Jena, Gustav Fischer Verlag.
- Owsianik, G., Talavera, K., Voets, T. und Nilius, B. (2006). "Permeation and selectivity of TRP channels." Annu Rev Physiol **68**: 685-717.
- Pedersen, S. F., Owsianik, G. und Nilius, B. (2005). "TRP channels: an overview." Cell Calcium **38** (3-4): 233-252.
- Peier, A. M., Reeve, A. J., Andersson, D. A., Moqrich, A., Earley, T. J., Hergarden, A. C., Story, G. M., Colley, S., Hogenesch, J. B., McIntyre, P., Bevan, S. und Patapoutian, A. (2002a). "A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes." Science **296** (5575): 2046-2049.
- Peier, A. M., Moqrich, A., Hergarden, A. C., Reeve, A. J., Andersson, D. A., Story, G. M., Earley, T. J., Dragoni, I., McIntyre, P., Bevan, S. und Patapoutian, A. (2002b). "A TRP channel that senses cold stimuli and menthol." Cell **108** (5): 705-715.

- Peters, D. (2007). Molekulare Adaptation des Harnstofftransporters "UT" in Pansen- und Kolonepithel ruminierender Ziegen bei unterschiedlicher Stickstoff- und Energieversorgung. Physiologisches Institut. Hannover, Tierärztliche Hochschule Hannover. Dissertation: 163.
- Phillipson, A. T. und McAnnally, R. A. (1942). "Studies on the fate of Carbohydrates in the Rumen of Sheep." J Exp Biol **19**: 199.
- Pilgrim, A. F., Gray, F. V. und Belling, G. B. (1969). "Production and absorption of ammonia in the sheep's stomach." Br J Nutr **23** (3): 647-655.
- Powell, D. W. (1981). "Barrier function of epithelia." Am J Physiol **241** (4): G275-288.
- Priestley, C. M., Williamson, E. M., Wafford, K. A. und Sattelle, D. B. (2003). "Thymol, a constituent of thyme essential oil, is a positive allosteric modulator of human GABA(A) receptors and a homo-oligomeric GABA receptor from *Drosophila melanogaster*." Br J Pharmacol **140** (8): 1363-1372.
- Pusch, M. und Neher, E. (1988). "Rates of diffusional exchange between small cells and a measuring patch pipette." Pflugers Arch **411** (2): 204-211.
- Rabbani, I., Siegling-Vlitakis, C., Noci, B. und Martens, H. (2011). "Evidence for NHE3-mediated Na transport in sheep and bovine forestomach." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **301** (2): R313-319.
- Remond, D., Chaise, J. P., Delval, E. und Poncet, C. (1993a). "Net flux of metabolites across the ruminal wall of sheep fed twice a day with orchardgrass hay." J Anim Sci **71** (9): 2529-2538.
- Remond, D., Chaise, J. P., Delval, E. und Poncet, C. (1993b). "Net transfer of urea and ammonia across the ruminal wall of sheep." J Anim Sci **71** (10): 2785-2792.
- Remond, D., Bernard, L., Chauveau, B., Noziere, P. und Poncet, C. (2003). "Digestion and nutrient net fluxes across the rumen, and the mesenteric- and portal-drained viscera in sheep fed with fresh forage twice daily: net balance and dynamic aspects." Br J Nutr **89** (5): 649-666.
- Reynolds, C. K. und Kristensen, N. B. (2008). "Nitrogen recycling through the gut and the nitrogen economy of ruminants: an asynchronous symbiosis." J Anim Sci **86** (14 Suppl): E293-305.
- Riccio, A., Mattei, C., Kellsell, R. E., Medhurst, A. D., Calver, A. R., Randall, A. D., Davis, J. B., Benham, C. D. und Pangalos, M. N. (2002). "Cloning and functional expression of human short TRP7, a candidate protein for store-operated Ca²⁺ influx." J Biol Chem **277** (14): 12302-12309.

- Ritzhaupt, A., Breves, G., Schröder, B., Winckler, C. und Shirazi-Beechey, S. (1997). "Urea transport in gastrointestinal tract of ruminants: effect of dietary nitrogen." Biochem Soc Trans **25**: S 490.
- Ritzhaupt, A., Wood, I., Jackson, A., Moran, B. und Shirazi-Beechey, S. (1998). "Isolation of a RT-PCR fragment from human colon and sheep rumen RNA with nucleotide sequence similarity to human and rat urea transporter isoforms." Biochem Soc Trans **26**: S 122.
- Rojen, B. A., Poulsen, S. B., Theil, P. K., Fenton, R. A. und Kristensen, N. B. (2011). "Short communication: Effects of dietary nitrogen concentration on messenger RNA expression and protein abundance of urea transporter-B and aquaporins in ruminal papillae from lactating Holstein cows." J Dairy Sci **94** (5): 2587-2591.
- Rossier, B. C., Pradervand, S., Schild, L. und Hummler, E. (2002). "Epithelial sodium channel and the control of sodium balance: interaction between genetic and environmental factors." Annu Rev Physiol **64**: 877-897.
- Rübelke, M. K. (1998). In vitro Untersuchungen des Pansenepithels von Schafen zur Charakterisierung eines elektrogenen, calcium-sensitiven Natriumtransportes. Institut für Veterinär-Physiologie. Berlin, Freie Universität Berlin; Dissertation: 65.
- Sands, J. M. (2003). "Mammalian urea transporters." Annu Rev Physiol **65**: 543-566.
- Sarkadi, B. und Parker, J. C. (1991). "Activation of ion transport pathways by changes in cell volume." Biochim Biophys Acta **1071** (4): 407-427.
- Sarkozi, S., Almassy, J., Lukacs, B., Dobrosi, N., Nagy, G. und Jona, I. (2007). "Effect of natural phenol derivatives on skeletal type sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and ryanodine receptor." J Muscle Res Cell Motil **28** (2-3): 167-174.
- Satter, L. D. und Slyter, L. L. (1974). "Effect of ammonia concentration of rumen microbial protein production in vitro." Br J Nutr **32** (2): 199-208.
- Schmidt-Nielsen, B. und Osaki, H. (1958). "Renal response to changes in nitrogen metabolism in sheep." Am J Physiol **193** (3): 657-661.
- Schröder, B. und Diener, M. (2005). Grundlagen der Zellphysiologie. Physiologie der Haustiere. W. von Engelhardt und G. Breves. Stuttgart, Enke Verlag. ISBN 3-8304-1039-5; S. 5-21
- Schultheiß, G. (1995). Calcium-sensitiver elektrogener Natriumtransport des Pansenepithels von Schafen. Institut für Veterinär-Physiologie. Berlin, Freie Universität Berlin. Dissertation: 149.
- Schultheiss, G. und Martens, H. (1999). "Ca-sensitive Na transport in sheep omasum." Am J Physiol **276** (6 Pt 1): G1331-1344.

- Schwab, C. G., Huhtanen, P., Hunt, C. W. und Hvelplund, T. (2005). Nitrogen requirements of cattle. Nitrogen and Phosphorus Nutrition of Cattle. Reducing the Environmental Impact of Cattle Operations. E. Pfeffer und A. Hristov. King's Lynn, UK., Biddles Ltd.. ISBN 0-851990134; S. 13-70
- Schwartz, J. H. und Tripolone, M. (1983). "Characteristics of NH_4^+ and NH_3 transport across the isolated turtle urinary bladder." Am J Physiol **245** (2): F210-216.
- Schweigel, M., Lang, I. und Martens, H. (1999). " Mg^{2+} transport in sheep rumen epithelium: evidence for an electrodiffusive uptake mechanism." Am J Physiol **277** (5 Pt 1): G976-982.
- Schweigel, M. und Martens, H. (2003). "Anion-dependent Mg^{2+} influx and a role for a vacuolar H^+ -ATPase in sheep ruminal epithelial cells." Am J Physiol **285** (1): G45-53.
- Schweigel, M., Freyer, M., Leclercq, S., Etschmann, B., Lodemann, U., Bottcher, A. und Martens, H. (2005). "Luminal hyperosmolarity decreases Na transport and impairs barrier function of sheep rumen epithelium." J Comp Physiol (B) **175** (8): 575-591.
- Schweigel, M., Park, H. S., Etschmann, B. und Martens, H. (2006). "Characterization of the Na^+ -dependent Mg^{2+} transport in sheep ruminal epithelial cells." Am J Physiol **290** (1): G56-65.
- Schweigel, M., Kolisek, M., Nikolic, Z. und Kuzinski, J. (2008). "Expression and functional activity of the Na/Mg exchanger, TRPM7 and MagT1 are changed to regulate Mg homeostasis and transport in rumen epithelial cells." Magnes Res **21** (2): 118-123.
- Schweigel, M., Kuzinski, J., Deiner, C. und Kolisek, M. (2009). "Rumen epithelial cells adapt magnesium transport to high and low extracellular magnesium conditions." Magnes Res **22** (3): 133-150.
- Sehested, J., Diernaes, L., Moller, P. D. und Skadhauge, E. (1996). "Transport of sodium across the isolated bovine rumen epithelium: interaction with short-chain fatty acids, chloride and bicarbonate." Exp Physiol **81** (1): 79-94.
- Sehested, J., Diernaes, L., Moller, P. D. und Skadhauge, E. (1999). "Transport of butyrate across the isolated bovine rumen epithelium--interaction with sodium, chloride and bicarbonate." Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol **123** (4): 399-408.
- Selescu, T., Ciobanu, A. C., Dobre, C., Reid, G. und Babes, A. (2013). "Camphor Activates and Sensitizes Transient Receptor Potential Melastatin 8 (TRPM8) to Cooling and Icilin." Chem Senses **38** (7): 563-575.
- Sherkheli, M. A., Benecke, H., Doerner, J. F., Kletke, O., Vogt-Eisele, A. K., Gisselmann, G. und Hatt, H. (2009). "Monoterpenoids induce agonist-specific desensitization of transient receptor potential vanilloid-3 (TRPV3) ion channels." J Pharm Pharm Sci **12** (1): 116-128.

- Siddons, R. C., Nolan, J. V., Beever, D. E. und Macrae, J. C. (1985). "Nitrogen digestion and metabolism in sheep consuming diets containing contrasting forms and levels of N." Br J Nutr **54** (1): 175-187.
- Simon, E. E., Merli, C., Herndon, J., Cragoe, E. J., Jr. und Hamm, L. L. (1992). "Effects of barium and 5-(N-ethyl-N-isopropyl)-amiloride on proximal tubule ammonia transport." Am J Physiol **262** (1 Pt 2): F36-39.
- Singh, B. B., Zheng, C., Liu, X., Lockwich, T., Liao, D., Zhu, M. X., Birnbaumer, L. und Ambudkar, I. S. (2001). "Trp1-dependent enhancement of salivary gland fluid secretion: role of store-operated calcium entry." FASEB J **15** (9): 1652-1654.
- Slepkov, E. R., Rainey, J. K., Sykes, B. D. und Fliegel, L. (2007). "Structural and functional analysis of the Na⁺/H⁺ exchanger." Biochem J **401** (3): 623-633.
- Sperber, I. und Hyden, S. (1952). "Transport of chloride through the ruminal mucosa." Nature **169** (4301): 587.
- Stein, R. J., Santos, S., Nagatomi, J., Hayashi, Y., Minnery, B. S., Xavier, M., Patel, A. S., Nelson, J. B., Futrell, W. J., Yoshimura, N., Chancellor, M. B. und De Miguel, F. (2004). "Cool (TRPM8) and hot (TRPV1) receptors in the bladder and male genital tract." J Urol **172** (3): 1175-1178.
- Stevens, C. E. (1964). "Transport of Sodium and Chloride by the Isolated Rumen Epithelium." Am J Physiol **206**: 1099-1105.
- Stevens, C. E. und Hume, I. D. (1995). Comparative Physiology of the Vertebrate Digestive System. Cambridge, England, Cambridge Univ. Press. ISBN 0-521-44418-7.
- Stewart, G. S., Graham, C., Cattell, S., Smith, T. P., Simmons, N. L. und Smith, C. P. (2005). "UT-B is expressed in bovine rumen: potential role in ruminal urea transport." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **289** (2): R605-R612.
- Strecker, K. (2011). Untersuchungen zur pH-Regulation am Blättermagenepithel des Schafes mit H⁺-sensitiven Mikroelektroden. Institut für Veterinär-Physiologie. Berlin, Freie Universität Berlin; Dissertation: 178.
- Stumpff, F., Brinkmann, I., Schweigel, M. und Martens, H. (2004a). High potassium diet, sodium and magnesium in ruminants: the story is not over. Production diseases in farm animals. N. P. Joshi und T. H. Herdt: 284-285. ISBN 978-90-76998-57-2.
- Stumpff, F., Brinkmann, I., Schweigel, M. und Martens, H. (2004b). "Regulation of electrogenic sodium transport across the ruminal epithelium involves a divalent sensitive cation channel." Pflugers Arch **447**: O-28.
- Stumpff, F., Georgi, M. I., Martens, H. und Gäbel, G. (2009a). "Ruminal epithelial cells express a conductance for Propionate." Acta Physiol **195** (P175): P175.

- Stumpff, F., Martens, H., Bilk, S., Aschenbach, J. R. und Gäbel, G. (2009b). "Cultured ruminal epithelial cells express a large-conductance channel permeable to chloride, bicarbonate, and acetate." Pflugers Arch **457** (5): 1003-1022.
- Stumpff, F. (2011). Ionic Conductances of the Ruminal Epithelium. Institut für Veterinär-Physiologie. Berlin, Freie Universität Berlin, Habilitation: 141.
- Stumpff, F., Lodemann, U., Van Kessel, A. G., Pieper, R., Klingspor, S., Wolf, K., Martens, H., Zentek, J. und Aschenbach, J. R. (2013). "Effects of dietary fibre and protein on urea transport across the cecal mucosa of piglets." J Comp Physiol B.
- Suzuki, M., Mizuno, A., Kodaira, K. und Imai, M. (2003). "Impaired pressure sensation in mice lacking TRPV4." J Biol Chem **278** (25): 22664-22668.
- Suzuki, Y., Landowski, C. P. und Hediger, M. A. (2008). "Mechanisms and regulation of epithelial Ca²⁺ absorption in health and disease." Annu Rev Physiol **70**: 257-271.
- Szentandrassy, N., Szentesi, P., Magyar, J., Nanasi, P. P. und Csernoch, L. (2003). "Effect of thymol on kinetic properties of Ca and K currents in rat skeletal muscle." BMC Pharmacol **3**: 9.
- Szentandrassy, N., Szigeti, G., Szegedi, C., Sarkozi, S., Magyar, J., Banyasz, T., Csernoch, L., Kovacs, L., Nanasi, P. P. und Jona, I. (2004). "Effect of thymol on calcium handling in mammalian ventricular myocardium." Life Sci **74** (7): 909-921.
- Thorlacius, S. O., Dobson, A. und Sellers, A. F. (1971). "Effect of carbon dioxide on urea diffusion through bovine ruminal epithelium." Am J Physiol **220** (1): 162-170.
- Togashi, K., Hara, Y., Tominaga, T., Higashi, T., Konishi, Y., Mori, Y. und Tominaga, M. (2006). "TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion." EMBO J **25** (9): 1804-1815.
- Uppal, S. K., Wolf, K., Khahra, S. S. und Martens, H. (2003a). "Modulation of Na⁺ transport across isolated rumen epithelium by short-chain fatty acids in hay- and concentrate-fed sheep." J Anim Physiol Anim Nutr (Berl) **87** (11-12): 380-388.
- Uppal, S. K., Wolf, K. und Martens, H. (2003b). "The effect of short chain fatty acids on calcium flux rates across isolated rumen epithelium of hay-fed and concentrate-fed sheep." J Anim Physiol Anim Nutr (Berl) **87** (1-2): 12-20.
- Ussing, H. H. und Zerahn, K. (1951). "Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin." Acta Physiol Scand **23** (2-3): 110-127.
- v. Engelhardt, W. und Nickel, W. (1965). "Die Permeabilität der Pansenwand für Harnstoff, Antipyrin und Wasser." Pflugers Arch **286**: 57-75.

- v. Engelhardt, W. und Nickel, W. (1978). Factors influencing the endogenous urea-N secretion and utilization in the gastrointestinal tract. Ruminants digestion and feed evaluation. D. Osbourn, D. Beever und D. Thomson. London, Agricultural Research Council: 4.1-4.12.
- van der Eerden, B. C., Hoenderop, J. G., de Vries, T. J., Schoenmaker, T., Buurman, C. J., Uitterlinden, A. G., Pols, H. A., Bindels, R. J. und van Leeuwen, J. P. (2005). "The epithelial Ca²⁺ channel TRPV5 is essential for proper osteoclastic bone resorption." Proc Natl Acad Sci U S A **102** (48): 17507-17512.
- Van Driessche, W. und Zeiske, W. (1985). "Ca²⁺-sensitive, spontaneously fluctuating, cation channels in the apical membrane of the adult frog skin epithelium." Pflugers Arch **405** (3): 250-259.
- Van Driessche, W., Aelvoet, I. und Erlij, D. (1987). "Oxytocin and cAMP stimulate monovalent cation movements through a Ca²⁺-sensitive, amiloride-insensitive channel in the apical membrane of toad urinary bladder." Proc Natl Acad Sci U S A **84** (1): 313-317.
- Van Driessche, W., Simaels, J., Aelvoet, I. und Erlij, D. (1988). "Cation-selective channels in amphibian epithelia: electrophysiological properties and activation." Comp Biochem Physiol A Comp Physiol **90** (4): 693-699.
- Van Haute, C., De Ridder, D. und Nilius, B. (2010). "TRP channels in human prostate." Sc World J **10**: 1597-1611.
- Venkatachalam, K. und Montell, C. (2007). "TRP channels." Annu Rev Biochem **76**: 387-417.
- Vennekens, R., Voets, T., Bindels, R. J., Droogmans, G. und Nilius, B. (2002). "Current understanding of mammalian TRP homologues." Cell Calcium **31** (6): 253-264.
- Voets, T., Talavera, K., Owsianik, G. und Nilius, B. (2005). "Sensing with TRP channels." Nat Chem Biol **1** (2): 85-92.
- Vogt-Eisele, A. K., Weber, K., Sherkheli, M. A., Vielhaber, G., Panten, J., Gisselmann, G. und Hatt, H. (2007). "Monoterpenoid agonists of TRPV3." Br J Pharmacol **151** (4): 530-540.
- Vriens, J., Owsianik, G., Voets, T., Droogmans, G. und Nilius, B. (2004). "Invertebrate TRP proteins as functional models for mammalian channels." Pflugers Arch **449** (3): 213-226.
- Vriens, J., Nilius, B. und Vennekens, R. (2008). "Herbal compounds and toxins modulating TRP channels." Curr Neuropharmacol **6** (1): 79-96.

- Wang, B., Danjo, A., Kajiya, H., Okabe, K. und Kido, M. A. (2011). "Oral epithelial cells are activated via TRP channels." J Dent Res **90** (2): 163-167.
- Weiner, I. D. und Verlander, J. W. (2003). "Renal and hepatic expression of the ammonium transporter proteins, Rh B Glycoprotein and Rh C Glycoprotein." Acta Physiol Scand **179** (4): 331-338.
- Weiner, I. D. und Hamm, L. L. (2007). "Molecular mechanisms of renal ammonia transport." Annu Rev Physiol **69**: 317-340.
- Weiner, I. D. und Verlander, J. W. (2010). "Molecular physiology of the Rh ammonia transport proteins." Curr Opin Nephrol Hypertens **19** (5): 471-477.
- Weiner, I. D. und Verlander, J. W. (2011). "Role of NH₃ and NH₄⁺ transporters in renal acid-base transport." Am J Physiol Renal Physiol **300** (1): F11-23.
- Weinstein, A. M. (1994). "Ammonia transport in a mathematical model of rat proximal tubule." Am J Physiol **267** (2 Pt 2): F237-248.
- Wernli, C. G. und Wilkins, R. J. (1980). "Nutritional studies with sheep fed conserved ryegrass. 1. Silage and dried grass offered ad libitum without supplements." J Agric Sci. **94** (1): 209-218.
- Weyrauch, K. G., Smollich, A. und Plendl, J. (2009). Histologie-Kurs für Veterinärmediziner. Stuttgart, Enke Verlag. ISBN 978-3-8304-1083-6.
- Wilkins, M., Kunert-Keil, C. und Schröder, B. (2006). "Expression of the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6 in ovine Ca²⁺ transporting tissues." Acta Physiol **186** (Suppl): 232 (PW203A-215).
- Wilkins, M. R., Kunert-Keil, C., Brinkmeier, H. und Schroder, B. (2009). "Expression of calcium channel TRPV6 in ovine epithelial tissue." Vet J **182** (2): 294-300.
- Winkler, F. K. (2006). "Amt/MEP/Rh proteins conduct ammonia." Pflugers Arch **451** (6): 701-707.
- Wolffram, S., Frischknecht, R. und Scharrer, E. (1989). "Influence of theophylline on the electrical potential difference and ion fluxes (Na, Cl, K) across the isolated rumen epithelium of sheep." Zbl Vet Med A **36** (10): 755-762.
- Wrage, N., Velthof, G. L., van Beusichem, M. L. und Oenema, O. (2001). "Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide." Soil Biology and Biochemistry **33**: 1723-1732.

- Xu, H., Blair, N. T. und Clapham, D. E. (2005). "Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism." J Neurosci **25** (39): 8924-8937.
- Xu, H., Delling, M., Jun, J. C. und Clapham, D. E. (2006). "Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels." Nat Neurosci **9** (5): 628-635.
- Yang, H., Soderholm, J. D., Larsson, J., Permert, J., Lindgren, J. und Wiren, M. (2000). "Bidirectional supply of glutamine maintains enterocyte ATP content in the in vitro using chamber model." Int J Colorectal Dis **15** (5-6): 291-296.
- Yang, W., Shen, Z. und Martens, H. (2012). "An energy-rich diet enhances expression of Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 and 3 messenger RNA in rumen epithelium of goat." J Anim Sci **90** (1): 307-317.
- Yang, X. R., Lin, M. J., McIntosh, L. S. und Sham, J. S. (2006). "Functional expression of transient receptor potential melastatin- and vanilloid-related channels in pulmonary arterial and aortic smooth muscle." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **290** (6): L1267-1276.
- Zeuthen, T. und Klaerke, D. A. (1999). "Transport of water and glycerol in aquaporin 3 is gated by H⁺." J Biol Chem **274** (31): 21631-21636.
- Zhao, H., Wiederkehr, M. R., Fan, L., Collazo, R. L., Crowder, L. A. und Moe, O. W. (1999). "Acute inhibition of Na/H exchanger NHE-3 by cAMP. Role of protein kinase a and NHE-3 phosphoserines 552 and 605." J Biol Chem **274** (7): 3978-3987.
- Zidi-Yahiaoui, N., Mouro-Chanteloup, I., D'Ambrosio, A. M., Lopez, C., Gane, P., Le van Kim, C., Cartron, J. P., Colin, Y. und Ripoche, P. (2005). "Human Rhesus B and Rhesus C glycoproteins: properties of facilitated ammonium transport in recombinant kidney cells." Biochem J **391** (Pt 1): 33-40.

10 Anhang

10.1 Verwendete Materialien und Arbeitsprotokolle

Tabelle 17: Übersicht über die in der Ussing-Kammer und bei der Bestimmung der Ammoniak-Fluxe verwendeten Materialien:

<u>Ussing-Kammer</u>	<u>Firma</u>
Zur Herstellung der Puffer verwendete Substanzen (NaCl, KCl, Glukose,...)	Merck, Carl Roth
Ammoniaelektrode (High performance ammonia electrode with waterproof BNC connector) , Kat.-Nr. 9512HPBNWP	Thermo Fisher Scientific
Storage Solution	Thermo Fisher Scientific
Alkaline Reagent (Thermo)	Thermo Fisher Scientific
10 M NaOH	Merck
NH ₄ Cl	Merck
Dulbecco´s PBS ohne Ca ²⁺ / Mg ²⁺	Biochrom

Zusammensetzung der in der Zellkultur verwendeten Medien

Medium M1

- Verwendung zur Isolierung der Pansenepithelzellen und Anzucht (ersten 48 h)

Basismedium:

Medium 199 (mit Earle´s Salzen und stabilem Glutamin), z.B. Biochrom (Kat.-Nr. FG0615)

Medium M2

- Anzucht der primären Pansenzellen (ab 48 h) und für alle weiteren Passagen.

Basismedium:

Dulbecco´s Modified Essential Medium DMEM (mit stabilem Glutamin), z.B. Biochrom (Kat. Nr. FG0415)

Zum jeweiligen Basismedium werden die aufgeführten Substanzen unter sterilen Bedingungen hinzugefügt:

Tabelle 18: Substanzen die dem jeweiligen Basismedium von M1 bzw. M2 zugegeben werden

Medium		Substanz	Endkonz. im Medium	
Medium 1 (M1)		Fetales Kälberserum	15%	75 ml / 500 ml
		Nystatin (2,4 x 10 ⁵ U/l)		
		Gentamycin (50 mg/l)		
		Kanamycin (100 mg/l)		
		Penicillin/Streptomycin 100 x 10 ⁵ U Pen/l und 100 mg Strep/l DPBS	1%	5 ml / 500 ml
Medium 2 (M2)		Fetales Kälberserum	10%	56 ml / 500 ml
		Penicillin/Streptomycin 100 x 10 ⁵ U Pen/l und 100 mg Strep/l DPBS	1%	5,6 ml / 500 ml

Tabelle 19: Übersicht der für die Zellkultur verwendeten Materialien

Zellisolierung und Kultivierung	Firma
Dulbecco´s PBS ohne Ca ²⁺ / Mg ²⁺	Biochrom (Berlin)
Penicillin-Streptomycin Lösung	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Trypsin-EDTA Lösung (0,25%)	Sigma-Aldrich
Collagen A	Biochrom
Dulbecco´s PBS ohne Ca ²⁺ / Mg ²⁺	Biochrom
Dulbecco´s PBS mit Ca ²⁺ / Mg ²⁺	Biochrom
DMEM	Pan-Biotech GmbH
Fetales Kälberserum	Biochrom
HEPES	Sigma-Aldrich
Nystatin	Sigma-Aldrich
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA-Lösung (0,25%)	Sigma-Aldrich
Zellkulturschalen	Biochrom
Deckgläser	Menzel (Braunschweig)

Tabelle 20: Übersicht die bei der Messung mittels Mikroelektrodenmethode verwendeten Materialien

<u>Mikroelektroden</u>	<u>Firma</u>
Zur Herstellung der Puffer verwendete Substanzen (NaCl, KCl, Glukose,.....)	Carl Roth, Merck
GC120F10 und GC150F15	Harvard Apparatus, Kent, UK
Schrumpfschläuchen (Deray-H-set 1/8“ ,)	DSG-Canusa, Meckenheim, Deutschland
Core cable ends (4x10, 611889)	Conrad Bauelemente, Conrad Elektronik, Hirschau, Deutschland
Hydrogen-Ionophor I Cocktail A	Sigma-Aldrich
Dichlormethylsilan	Sigma-Aldrich
Menthol	Sigma-Aldrich
Thymol	Sigma-Aldrich
Zimtaldehyd	Sigma-Aldrich
Capsaicin	Sigma-Aldrich
Methylsalicylat	Sigma-Aldrich
Verapamil	Sigma-Aldrich
Bumetanid	Sigma-Aldrich

Standardprotokoll zur Bestimmung der Ammoniak-Fluxe aus Proben nach Inkubation in der Ussing-Kammer

1. Überprüfen der Elektroden-Steilheit

- 1.1. Elektrode für 15 Min. in *Ammonia Electrode Storage Solution* äquilibrieren.
- 1.2. Standardreihe durch Verdünnung der 0,1 M NH₄Cl-Lösung (Standard Thermo) ansetzen. Standards jeweils 1:10 mit dem Puffer, in dem sich die Proben befinden, in Messkolben verdünnen.
- 1.3. 100 ml Aqua dest. in 150 ml-Becherglas vorlegen, Rührstab zugeben, mäßig rühren.
- 1.4. Elektrode eintauchen, es dürfen sich keine Luftblasen unter der Membran befinden.
- 1.5. Messwertaufzeichnung in LabChart starten.
- 1.6. 1 ml Alkaline Reagent (Thermo) bzw. 1 ml 10 M NaOH zum Puffer geben.

- 1.7. 1 ml Standard (10^{-3} M NH_4Cl) zu pipettieren und auf das Erreichen eines Plateaus warten.
- 1.8. 10 ml des selben Standards (10^{-3} M NH_4Cl) zur Lösung pipettieren.
- 1.9. Messung zweimal wiederholen.
- 1.10. Die Differenz zwischen beiden Werten (zw. 1.7. und 1.8.) sollte zwischen 54 und 60 mV betragen (bei einer Temperatur von 20-25 °C). Sonst Membran und die Elektrodenfülllösung tauschen.

2. Messung der Proben (Additionsmethode)

- 2.1. Deckel und Gummiring auf Elektrode stecken, 10 ml Probe in das spezielle Glasgefäß füllen, das über wenig Totraum verfügt und gut verschlossen werden kann, mäßig rühren, Elektrode einbringen (darauf achten, dass keine Blasen an der Membran sind)
- 2.2. Messwertaufzeichnung in LabChart starten.
- 2.3. Mittels 1 ml-Spritze über spezielle Schlauchzuführung 1 ml 10 M NaOH direkt in die Probe leiten, Spritze nicht abziehen; auf schnelle und vollständige Durchmischung der Probe achten.
- 2.4. Erste Spritze abziehen und mittels zweiter 1 ml-Spritze über die Schlauchzuführung 1 ml geeigneten Standard direkt in die Probe leiten (es muss eine deutliche Spannungsänderung erkennbar werden), Spritze nicht abziehen; auf schnelle und vollständige Durchmischung der Probe achten.
- 2.5. Messung stoppen
- 2.6. Elektrode durch Eintauchen in Aqua dest. spülen und mit nächster Probe fortfahren
- 2.7. Am Ende der Messungen erneut die Elektrodensteilheit ermitteln (siehe Punkt 1.)

Standardprotokoll zur Isolierung und Kultivierung von Pansenepithelzellen

1. Gewinnung des Pansenepithels

- 1.1 Nach der Schlachtung wird der Pansen entnommen und die Gewebestücke aus dem Bereich des Pansenvorhofes geschnitten.
- 1.2 Pansenstücke 3 bis 4 mal mit Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS oder kurz: PBS) ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} mit 4% Penicillin/Streptomycin (4×10^5 U Pen/l und 400 mg Strep/l DPBS) waschen.

- 1.3 Transport zum Labor bei 4°C in PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ mit 4% Penicillin/Streptomycin.
- 1.4 Pansenzotten vorsichtig mit einer sterilen Metzenbaum-Schere abschneiden und mehrfach in PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ mit 4% Penicillin/Streptomycin waschen.

2. Trypsinierung der Pansenzotten

- 2.1 Pansenzotten mit ca. 30 ml 0,25%iger Trypsin-EDTA-Lösung (2,5 g·l⁻¹ Schweinetrypsin und 0,2 g·l⁻¹ EDTA, Sigma Aldrich) im Wasserbad bei 37°C temperiert mittels Magnetrührer rühren (Fraktion F1).
- 2.2 F1 in Trypsin-EDTA-Lösung nach 30 min abgießen, verwerfen und Pansenzotten mit frischer Trypsin-EDTA-Lösung versetzen (F2).
- 2.3 F2 in Trypsin-EDTA-Lösung wiederum nach 30 min abgießen, verwerfen und Pansenzotten mit frischer Trypsin-EDTA-Lösung versetzen (F3).
- 2.4 Zellfraktion F3 zur Trennung von Geweberesten und Pflanzenteilen durch sterile, Baumwoll-Gaze filtrieren, Filtrat in 50 ml Zentrifugenröhrchen auffangen.
- 2.5 Verbleibende Zotten wieder für 30 min bei 37°C trypsinieren (F4-F7 herstellen).

3. Aussäen der Zellen

- 3.1 Fraktionen für 5 min bei 4 °C und 200 x g zentrifugieren,
- 3.2 Überstände verwerfen.
- 3.3 Zellen in 10 ml PBS (**mit** Ca²⁺ und Mg²⁺) mit 1% Penicillin/Streptomycin resuspendieren und erneut bei 4 °C zentrifugieren.
- 3.4 Vorgang 2 x wiederholen.
- 3.5 Zellpellets in Zellkulturmedium M1 resuspendieren, die Vitalität mit Trypanblau überprüfen und Zellzahl bestimmen (z.B. mit einer Neubauer-Zählkammer)
- 3.6 Zellen mit Medium M 1 auf eine Dichte von 5 x 10⁵ Zellen/ml einstellen und je 4 ml Zellsuspension in zuvor kollagenisierte Zellkulturschalen (Durchmesser 60 mm) einsäen.
- 3.7 Für 48 h im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubieren
- 3.8 Nach 48 h wird das alte Medium abgesaugt und die Zellen werden 3 x mit PBS (mit) gewaschen, um nicht angeheftete Zellen zu entfernen.
- 3.9 Wechsel von Medium M1 auf Medium M2.
- 3.10 Weitere Medienwechsel erfolgen zweimal pro Woche.

4. Subkultivierung der Zellen

- 4.1 Pansenepithelzellen 2 x mit PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) waschen.
- 4.2 Zellen mit 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung (0,25% / 0,02%) überschichten und ca. 10 min bei 37 °C inkubieren.
- 4.3 Wenn sich der Großteil der Zellen vom Boden abgelöst hat, wird die Trypsin-Reaktion abgestoppt, indem 3 ml Kulturmedium M2 (enthält 10% FKS) zur Zellsuspension gegeben werden. Suspension gut mit der Pipette mischen.
- 4.4 Zellzahl bestimmen und die Vitalität mit Trypanblau überprüfen.
- 4.5 Zellen mit Medium M 2 auf eine Dichte von 5×10^5 Zellen/ml einstellen und in Zellkulturschalen (Durchmesser 60 mm) einsäen. Ab der zweiten Passage müssen die Schalen nicht mehr mit Kollagen beschichtet sein.

5. Kollagenisieren der Zellkulturschalen

- 5.1 Die verwendete Collagenlösung besteht aus gleichen Teilen Collagen A (Biochrom) und PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} . Pro 60 mm-Kulturschale werden 2 ml fertige Collagenlösung benötigt.
- 5.2 Für jede geplante Fraktion wird am Morgen der Isolierung eine 60 mm-Kulturschale beschichtet und im Brutschrank bei 37°C und gesättigter Wasserdampf-atmosphäre mindestens 2 h inkubiert. Die Collagenlösung wird erst kurz vor der Aussaat der Zellen abgesaugt und verworfen.

6. Aussähen der Zellen auf Deckgläschen

- 6.1 Pro Zellkulturschale (Ø 35 mm) vier sterilisierte Deckgläschen (Ø 13mm, Menzel, Braunschweig) einlegen
- 6.2 Pro Deckgläschen ein Tropfen Zellsuspension auftropfen und mit M2 aufgefüllt.

10.2 Verwendete Pufferlösungen

Transportpuffer

Tabelle 21: Zusammensetzung des Transportpuffers, begast mit Carbogen (95% O_2 / 5% CO_2)

mmol·l ⁻¹	KCl	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	Na ₂ HPO ₄ · H ₂ O	NaCl	NaHCO ₃	Glukose	Hepes	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	MgCl ₂ · 6 H ₂ O
Transportpuffer	5	0,4	2,4	115	25	5	10	1,2	1,2
pH-Wert nach Begasung und RT	7,4	Osmolarität (mmosm/l)		290					

Ussing-Kammerpuffer (Ammoniak-Fluxe)

Tabelle 22: Zusammensetzung der verwendeten Ussing-Kammerpuffer, begast mit 100% O₂

mmol·l ⁻¹	pH	NaCl	NH ₄ Cl	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	Na ₂ HPO ₄ · H ₂ O	KCl	Glukose	MES	Na-Glukonat	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	MgCl ₂ · 6 H ₂ O	NMDG-Cl
Serosaler Puffer NaCl	7,4	75	-	-	-	5	5	-	30	1,2	1,2	40
40mM NH ₄ Cl	6,4	70	40	0,4	2,4	5	5	8	30	1,2	1,2	-
10mM NH ₄ Cl	6,4	70	10	0,4	2,4	5	5	8	30	1,2	1,2	30
0mM NH ₄ Cl	6,4	70	-	0,4	2,4	5	5	8	30	1,2	1,2	40

Verwendete Lösungen bei den Patch-Clamp Experimenten

Tabelle 23: Zusammensetzung der verwendeten Pipettenlösungen

mmol·l ⁻¹	KCl	KH ₂ PO ₄ · H ₂ O	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	NaCl	Na-Glukonat	K-Glukonat	Hepes	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	MgCl ₂ · 6 H ₂ O	EGTA
Na-Glu Pipettenlösung	5	-	1	15	122	-	10	-	1	5
K-Glu Pipettenlösung	-	1	-	10	-	123	10	-	1	5
pH-Wert	7,2	Osmolarität (mmosm/l)		300						

Tabelle 24: Zusammensetzung der verwendeten extrazellulären Badlösungen

mmol·l ⁻¹	KCl	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	NH ₄ -Glukonat	NaCl	NMDG-Glukonat	Na-Glukonat	Hepes	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	MgCl ₂ · 6 H ₂ O	EDTA
NaCl-Standardpuffer	5	1	-	137	-	-	10	1,7	0,9	-
Na-Glukonat	5	1	-	7,2	-	129,8	10	1,7	0,9	-
NMDG-Glukonat	5	1	-	-	137	-	10	1,7	0,9	-
137mM NH ₄ -Glukonat	5	1	137	-	-	-	10	1,7	0,9	-
137mM NH ₄ -Glukonat EDTA ø Ca ²⁺ ø Mg ²⁺	5	1	137	-	5,2	-	5	-	-	5
pH-Wert	7,4	Osmolarität (mmosm/l)		300						

Verwendete Lösungen bei den Mikroelektrodenmessungen

Tabelle 25: Zusammensetzung der verwendeten Mikroelektrodenlösungen

mmol·l ⁻¹	pH	NaCl	NH ₄ Cl	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	Na ₂ HPO ₄ · H ₂ O	KCl	Glukose	MES	MOPS	L-Glutamin	Na-Glukonat	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	MgCl ₂ · 6 H ₂ O	NMDG-Cl	EDTA
NaCl Standardpuffer	7,4	70	-	0,4	2,4	5	5	-	8	2,5	30	1,2	1,2	40	-
NaCl Standardpuffer	6,4	70	-	0,4	2,4	5	5	8	-	2,5	30	1,2	1,2	40	-
Na-Glukonat	7,4	10	-	0,4	2,4	5	5	-	8	2,5	90	1,2	1,2	40	-
40mM NH ₄ Cl	6,4	70	40	0,4	2,4	5	5	8	-	2,5	30	1,2	1,2	-	-
40mM NH ₄ Cl	7,4	70	40	0,4	2,4	5	5	-	8	2,5	30	1,2	1,2	-	-
110mM NMDG	6,4	-	-	0,4	2,4	5	5	8	-	2,5	30	1,2	1,2	110	-
70mM NMDG 40mM NH ₄ Cl	6,4	-	40	0,4	2,4	5	5	8	-	2,5	30	1,2	1,2	70	-
70mM NMDG 40mM NH ₄ Cl EDTA ø Ca ²⁺ ø Mg ²⁺	6,4	-	40	0,4	2,4	5	5	8	-	2,5	30	-	-	70	5

10.3 Ergänzende Ergebnistabellen

Tabelle 26: Tabellarische Darstellung der Umkehrpotentiale der Messreihen mit Na-Glukonat und K-Glukonat im Vergleich

Patchpipette Na-Glukonat						p (Na-Glu vs K-Glu)	Patchpipette K-Glukonat						
Umkehrpotentiale (mV)	mean	SEM	median	25%	75%		Umkehrpotentiale (mV)	mean	SEM	median	25%	75%	
NaCl	-24,28	5,99	-25,39	-36,16	-11,50	0,480	NaCl	-18,59	4,79	-15,05	-30,21	-9,97	
NMDG-Glukonat	-23,25	12,13	-18,95	-34,18	-2,59	0,251	NMDG-Glukonat	-40,39	6,27	-47,84	-52,25	-25,84	
NH ₄ -Glukonat	22,75	4,97	18,72	11,39	34,06	0,007	NH ₄ -Glukonat	4,21	2,38	6,31	0,07	9,06	
NH ₄ -Glukonat EDTA	23,36	1,60	21,95	20,72	25,33	< 0,001	NH ₄ -Glukonat EDTA	13,01	1,12	12,89	11,39	15,23	
NH ₄ -Glukonat (washout)	30,03	3,01	27,92	23,26	39,13	< 0,001	NH ₄ -Glukonat (washout)	7,40	1,86	10,42	3,61	11,45	
NMDG-Glukonat (washout)	10,11	6,50	-0,85	-2,64	27,25	0,003	NMDG-Glukonat (washout)	-18,48	3,75	-20,26	-24,06	-11,63	
NaCl (washout)	-0,49	4,49	-0,18	-9,67	6,07	0,029	NaCl (washout)	-14,41	3,24	-12,04	-17,72	-9,14	
P1 (NMDG-Gluc vs NH ₄ -Gluc)						p = 0,001	P1 (NMDG-Gluc vs NH ₄ -Gluc)						p < 0,001
P2 (NH ₄ -Gluc vs NH ₄ -Gluc EDTA)						p = 0,885	P2 (NH ₄ -Gluc vs NH ₄ -Gluc EDTA)						p = 0,021
P3 (NH ₄ -Gluc EDTA vs NH ₄ -Gluc-w)						p = 0,011	P3 (NH ₄ -Gluc EDTA vs NH ₄ -Gluc-w)						p = 0,040
P4 (NH ₄ -Gluc vs NH ₄ -Gluc-w)						p = 0,050	P4 (NH ₄ -Gluc vs NH ₄ -Gluc-w)						p = 0,009
P5 (NMDG-Gluc-w vs 0)						p = 0,164	P5 (NMDG-Gluc-w vs 0)						p = 0,003
P6 (NMDG-Gluc vs NMDG-Gluc-w)						p = 0,010	P6 (NMDG-Gluc vs NMDG-Gluc-w)						p = 0,012
P7 (NaCl vs NMDG-Gluc)						p = 0,902	P7 (NaCl vs NMDG-Gluc)						p = 0,004
P8 (NMDG-Gluc-w vs NaCl-w)						p = 0,054	P8 (NMDG-Gluc-w vs NaCl-w)						p = 0,297
P9 (NaCl vs NaCl-w)						p = 0,001	P9 (NaCl vs NaCl-w)						p = 0,324

Tabelle 27: Tabellarische Darstellung der Einwärtsströme der Na-Glukonat und K-Glukonat gefüllten Pansenepithelzellen im Vergleich

Patchpipette Na-Glukonat						p (Na-Glu vs K-Glu)	Patchpipette K-Glukonat						
ic (nA/pF) n=8	mean	SEM	median	25%	75%		ic (nA/pF) n=7	mean	SEM	median	25%	75%	
NaCl	-2,81	0,91	-1,62	-4,24	-1,00	0,336	NaCl	-19,50	14,67	-4,80	-11,46	-1,21	
NMDG-Glukonat	-1,85	0,74	-0,85	-2,32	-0,66	0,397	NMDG-Glukonat	-15,82	12,37	-2,05	-8,66	-0,76	
NH ₄ -Glukonat	-4,17	1,08	-2,83	-5,23	-2,23	0,040	NH ₄ -Glukonat	-34,30	21,94	-7,82	-33,56	-3,53	
NH ₄ -Glukonat EDTA	-31,69	8,00	-33,75	-46,37	-9,04	0,014	NH ₄ -Glukonat EDTA	-91,18	22,14	-64,11	-115,47	-47,59	
NH ₄ -Glukonat (washout)	-4,62	1,54	-2,88	-5,26	-2,06	0,072	NH ₄ -Glukonat (washout)	-41,09	25,54	-7,87	-43,63	-3,08	
NMDG-Glukonat (washout)	-2,91	1,77	-1,08	-1,83	-0,77	0,121	NMDG-Glukonat (washout)	-23,67	15,40	-1,93	-26,95	-1,34	
NaCl (washout)	-6,45	4,75	-1,40	-3,16	-1,10	0,094	NaCl (washout)	-36,02	23,47	-3,50	-38,47	-1,79	
P1 (NMDG-Gluc vs NH ₄ -Gluc)						p = 0,008	P1 (NMDG-Gluc vs NH ₄ -Gluc)						p = 0,016
P2 (NH ₄ -Gluc vs NH ₄ -Gluc EDTA)						p = 0,008	P2 (NH ₄ -Gluc vs NH ₄ -Gluc EDTA)						p = 0,016
P3 (NH ₄ -Gluc EDTA vs NH ₄ -Gluc-w)						p = 0,008	P3 (NH ₄ -Gluc EDTA vs NH ₄ -Gluc-w)						p = 0,016
P4 (NH ₄ -Gluc vs NH ₄ -Gluc-w)						p = 0,945	P4 (NH ₄ -Gluc vs NH ₄ -Gluc-w)						p = 1,000
P5 (NMDG-Gluc-w vs NH ₄ -Gluc-w)						p = 0,016	P5 (NMDG-Gluc-w vs NH ₄ -Gluc-w)						p = 0,016
P6 (NMDG-Gluc vs NMDG-Gluc-w)						p = 0,461	P6 (NMDG-Gluc vs NMDG-Gluc-w)						p = 0,078
P7 (NaCl vs NMDG-Gluc)						p = 0,008	P7 (NaCl vs NMDG-Gluc)						p = 0,031
P8 (NMDG-Gluc-w vs NaCl-w)						p = 0,016	P8 (NMDG-Gluc-w vs NaCl-w)						p = 0,016
P9 (NaCl vs NaCl-w)						p = 0,844	P9 (NaCl vs NaCl-w)						p = 0,156

Anhang

Tabelle 28: Tabellarische Darstellung der Auswärtsströme der mit Na-Glukonat und K-Glukonat gefüllten Zellen im Vergleich

Patchpipette Na-Glukonat						p (Na-Glu vs K-Glu)	Patchpipette K-Glukonat					
oc (nA/pF) n=8	mean	SEM	median	25%	75%		oc (nA/pF) n=7	mean	SEM	median	25%	75%
NaCl	7,74	3,52	4,52	2,52	7,69	0,463	NaCl	19,16	12,21	7,66	3,38	13,97
NMDG-Glukonat	3,12	0,74	3,03	1,30	4,47	0,121	NMDG-Glukonat	16,61	10,15	7,46	2,52	14,04
NH ₄ -Glukonat	7,49	2,14	5,79	2,30	12,49	0,004	NH ₄ -Glukonat	39,13	18,54	20,04	15,74	33,31
NH ₄ -Glukonat EDTA	9,85	3,15	6,30	2,93	15,69	0,021	NH ₄ -Glukonat EDTA	42,72	17,43	17,70	15,03	49,48
NH ₄ -Glukonat (washout)	7,68	2,10	6,76	2,14	12,08	0,004	NH ₄ -Glukonat (washout)	44,25	20,07	20,61	14,87	45,41
NMDG-Glukonat (washout)	3,90	1,38	2,44	1,76	4,27	0,009	NMDG-Glukonat (washout)	24,30	13,33	7,96	5,72	23,64
NaCl (washout)	10,41	7,14	3,05	1,83	5,95	0,014	NaCl (washout)	35,77	19,79	10,11	7,64	34,91
P1 (NMDG-Glu vs NH ₄ -Glu)			p = 0,055				P1 (NMDG-Glu vs NH ₄ -Glu)			p = 0,016		
P2 (NH ₄ -Glu vs NH ₄ -Glu EDTA)			p = 0,109				P2 (NH ₄ -Glu vs NH ₄ -Glu EDTA)			p = 0,813		
P3 (NH ₄ -Glu EDTA vs NH ₄ -Glu-w)			p = 0,078				P3 (NH ₄ -Glu EDTA vs NH ₄ -Glu-w)			p = 0,938		
P4 (NH ₄ -Glu vs NH ₄ -Glu-w)			p = 0,844				P4 (NH ₄ -Glu vs NH ₄ -Glu-w)			p = 0,469		
P5 (NMDG-Glu-w vs NH ₄ -Glu-w)			p = 0,039				P5 (NMDG-Glu-w vs NH ₄ -Glu-w)			p = 0,016		
P6 (NMDG-Glu vs NMDG-Glu-w)			p = 0,742				P6 (NMDG-Glu vs NMDG-Glu-w)			p = 0,047		
P7 (NaCl vs NMDG-Glu)			p = 0,008				P7 (NaCl vs NMDG-Glu)			p = 0,219		
P8 (NMDG-Glu-w vs NaCl-w)			p = 0,078				P8 (NMDG-Glu-w vs NaCl-w)			p = 0,016		
P9 (NaCl vs NaCl-w)			P = 0,945				P9 (NaCl vs NaCl-w)			p = 0,031		

Tabelle 29: Zusammenfassende Darstellung des Effekts von Verapamil auf den I_{sc} am Pansenepithel von Schafen

Nr.	Lösung	I _{sc} (μA · cm ⁻²)						normal verteilt	p vs 1	p vs 3
		n	MW	SEM	Median	25 %	75 %			
1	40mM NH ₄ ⁺	4	42,91	5,23	44,25	35,29	50,53	ja		< 0,001
2	40mM NH ₄ ⁺ +1mM Verapamil	4	32,18	5,02	33,48	24,52	39,85		< 0,001	0,017
3	40mM NH ₄ ⁺ (w)	4	34,63	4,34	35,52	27,96	41,31		< 0,001	
1	40mM NH ₄ ⁺	5	40,62	4,66	41,34	30,89	48,85	ja	(p = 0,055)	
2	40mM NH ₄ ⁺ +100μM Verapamil	5	37,69	4,30	36,62	30,34	45,98			
3	40mM NH ₄ ⁺ (w)	5	34,90	3,38	35,98	30,08	40,07			

Tabelle 30: Tabellarische Zusammenfassung der transepithelialen Potentiale der Punktionen mit „double-barreled“ Mikroelektroden 5 und 10 Minuten nach Lösungswechsel

Nr.	Lösung	Zeit (min) nach Lösungswechsel	PD _t (mV)						normal verteilt	p vs 1	p vs 2	p vs 3	p vs 4
			n	MW	SEM	Median	25 %	75 %					
1	NaCl 7,4	5	12	-0,08	0,50	-0,39	-1,43	0,58	nein	-	< 0,05		< 0,05
2	NaCl 6,4	5	12	-0,13	0,42	-0,24	-1,20	0,70		< 0,05	-	< 0,05	
3	NH ₄ Cl 6,4	5	12	2,24	0,62	1,73	0,91	2,62				-	< 0,05
4	NH ₄ Cl 7,4	5	12	2,46	0,54	2,19	1,31	2,81		< 0,05		< 0,05	-
5	NaCl 7,4	5	12	0,49	0,45	0,22	-0,66	1,15		n. s.			< 0,05
1	NaCl 7,4	10	12	-0,11	0,46	-0,31	-1,36	0,49	nein	-	n. s.		< 0,05
2	NaCl 6,4	10	12	-0,10	0,42	-0,24	-1,07	0,71		n. s.	-	< 0,05	
3	NH ₄ Cl 6,4	10	12	2,68	0,74	2,05	1,18	2,81			< 0,05	-	n. s.
4	NH ₄ Cl 7,4	10	12	2,42	0,52	2,22	1,26	2,83		< 0,05		n. s.	-
5	NaCl 7,4	10	12	0,32	0,47	0,10	-0,85	0,93		< 0,05			< 0,05

Anhang

Tabelle 31: Tabellarische Zusammenfassung der gemessenen apikalen Potentialdifferenzen der Punktionen mit „double-barreled“ Mikroelektroden 5 und 10 Minuten nach Lösungswechsel

Nr.	Lösung	Zeit (min) nach Lösungswechsel	PD _a (mV)						normal verteilt	p vs 1	p vs 2	p vs 3	p vs 4
			n	MW	SEM	Median	25 %	75 %					
1	NaCl 7,4	5	12	-14,09	2,12	-16,28	-20,16	-7,12	nein	-	n. s.		< 0,05
2	NaCl 6,4	5	12	-14,71	1,43	-15,59	-19,13	-10,19		n. s.	-	< 0,05	
3	NH ₄ Cl 6,4	5	12	-11,88	1,35	-11,98	-15,79	-8,02		< 0,05		n. s.	-
4	NH ₄ Cl 7,4	5	12	-12,50	1,44	-14,21	-16,47	-9,68		< 0,05		n. s.	-
5	NaCl 7,4	5	12	-13,71	1,67	-15,88	-18,29	-7,89		n. s.	n. s.		< 0,05
1	NaCl 7,4	10	12	-13,92	2,10	-15,64	-20,14	-6,97	nein	-	n. s.		< 0,05
2	NaCl 6,4	10	12	-14,10	1,37	-14,52	-17,83	-9,96		n. s.	-	< 0,05	
3	NH ₄ Cl 6,4	10	12	-11,97	1,34	-12,67	-15,06	-8,24		< 0,05		-	< 0,05
4	NH ₄ Cl 7,4	10	12	-12,91	1,44	-15,09	-16,27	-9,98		< 0,05		< 0,05	-
5	NaCl 7,4	10	12	-13,74	1,67	-15,69	-18,65	-7,50		n. s.			< 0,05

Tabelle 32: Tabellarische Zusammenfassung der intrazellulären pH-Werte der Punktionen mit „double-barreled“ Mikroelektroden 5 und 10 Minuten nach Lösungswechsel

Nr.	Lösung	Zeit (min) nach Lösungswechsel	pH _i						normal verteilt	p vs 1	p vs 2	p vs 3	p vs 4
			n	MW	SEM	Median	25 %	75 %					
1	NaCl 7,4	5	12	6,79	0,05	6,81	6,68	6,91	nein	-	< 0,05		< 0,05
2	NaCl 6,4	5	12	6,62	0,07	6,63	6,46	6,79		< 0,05	-	< 0,05	
3	NH ₄ Cl 6,4	5	12	6,44	0,07	6,42	6,31	6,56		< 0,05		-	< 0,05
4	NH ₄ Cl 7,4	5	12	6,58	0,08	6,57	6,35	6,73		< 0,05		< 0,05	-
5	NaCl 7,4	5	12	6,80	0,06	6,72	6,64	6,94		n. s.			< 0,05
1	NaCl 7,4	10	12	6,80	0,05	6,83	6,70	6,89	nein	-	< 0,05		< 0,05
2	NaCl 6,4	10	12	6,53	0,07	6,53	6,40	6,63		< 0,05	-	< 0,05	
3	NH ₄ Cl 6,4	10	12	6,40	0,06	6,37	6,29	6,54		< 0,05		< 0,05	< 0,05
4	NH ₄ Cl 7,4	10	12	6,63	0,06	6,57	6,48	6,79		< 0,05		< 0,05	-
5	NaCl 7,4	10	12	6,81	0,06	6,81	6,63	6,95		n. s.			< 0,05

Tabelle 33: Tabellarische Zusammenfassung der Leitfähigkeiten der Epithelien bei Punktionen mit „double-barreled“ Mikroelektroden

Nr.	Lösung	Leitfähigkeit (mS)						normal verteilt	p vs 1	p vs 2	p vs 3	p vs 4
		n	MW	SEM	Median	25 %	75 %					
1	NaCl 7,4	10	6,75	0,74	7,16	4,47	8,15	ja		0,394		0,019
2	NaCl 6,4	12	6,43	0,70	6,99	4,05	7,78		0,394		0,514	
3	NH ₄ Cl 6,4	11	6,13	0,81	4,88	3,72	8,21			0,514		< 0,001
4	NH ₄ Cl 7,4	12	6,82	0,70	6,80	4,89	8,46		0,019		< 0,001	
5	NaCl 7,4	11	6,44	0,72	7,17	4,53	8,13		0,15			

11 Publikationsliste

Journal Artikel

GEORGI, M. I., ROSENDAHL, J., ERNST, F., GUNZEL, D., ASCHENBACH, J.R., MARTENS, H., STUMPPFF, F. (2013):

Epithelia of the ovine and bovine forestomach express basolateral maxi-anion channels permeable to the anions of short-chain fatty acids.

Pflugers Arch. DOI: 10.1007/s00424-013-1386-x

LU, Z., STUMPPFF, F., DEINER, C., ROSENDAHL, J., BRAUN, H., ABDOUN, K., ASCHENBACH, J.R., MARTENS, H. (2014):

Modulation of sheep rumen urea transport by ammonia and pH. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 307 (5): R558-570.

Konferenzbeiträge

ROSENDAHL, J., STUMPPFF, F., MARTENS, H., ASCHENBACH, J.R. (2012):

Participation of NH_4^+ in the transport of ammonia across the bovine ruminal epithelium. Proc. Fachgruppentagung Physiologie und Biochemie der DVG 20; S. 71

ROSENDAHL, J., STUMPPFF, F., MARTENS, H., ASCHENBACH, J.R. (2012):

Pathways for the absorption of ammonia across the bovine ruminal epithelium. Proc. Soc. Nutr. Physiol. 21; S. 56

ROSENDAHL, J., ASCHENBACH, J.R., MARTENS, H., STUMPPFF, F. (2013):

Transport of NH_4^+ across the bovine ruminal epithelium involves cation channels stimulated by menthol.

Acta Physiologica, Oxford; 207 (Suppl. 694), S. 258

ROSENDAHL, J., ASCHENBACH, J.R., MARTENS, H., STUMPPFF, F. (2013):

A study of the effects of TRP modulators on NH_4^+ induced currents across the bovine ruminal epithelium.

Proc. Soc. Nutr. Physiol. 22, S. 156

ROSENDAHL, J., ASCHENBACH, J.R., MARTENS, H., STUMPPFF, F. (2013):

The transport of NH_4^+ across the bovine ruminal epithelium: evidence for the involvement of menthol-sensitive non-selective cation channels.

25th Congress of the European Intestinal Transport Group S. 57

STUMPF, F., ROSENDAHL, J., ERNST, F., MARTENS, H., ASCHENBACH, J.R. (2013):
The bovine ruminal epithelium expresses anion channels with a large conductance for
chloride, acetate, propionate and butyrate.

25th Congress of the European Intestinal Transport Group S. 29

ROSENDAHL, J., ASCHENBACH, J.R., STUMPF, F. (2014):
The absorption of ammonia across the bovine ruminal epithelium and the effect on serosal
pH- a flux study in the Ussing chamber.

Proc. Fachgruppentagung Physiologie und Biochemie der DVG 21; P13

ROSENDAHL, J., ASCHENBACH, J.R., STUMPF, F. (2014):
A study of ruminal ammonia transport with implications for understanding the gastrointestinal
recycling of nitrogen.

Acta Physiologica, Oxford; 210 (Suppl. 695), S. 212

PATENT

STUMPF, F., ROSENDAHL, J. & ASCHENBACH, J.R. (2012):
Zusammensetzungen zur Linderung von Gastrointestinaltraktstörungen oder damit assoziierter
systemischer Störungen von Wiederkäuern und Cameliden. Patentamt München, AZ 10 2012
015 029.6

12 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gehört dabei Frau PD Dr. F. Stumpff. Vielen Dank für die Überlassung dieses Themas und vor allem für die tolle Betreuung, die vielen inspirierenden Gespräche, die vielen neuen Ideen und die Unterstützung dieses Projektes weit über diese Dissertation hinaus. Danke auch für Ihre Geduld; es macht sehr viel Spaß mit Ihnen zu Arbeiten.

Herzlichen Dank an Herrn Prof. Dr. J. R. Aschenbach für die Möglichkeit an Ihrem Institut zu promovieren und Ihre tatkräftige Unterstützung.

Vielen Dank an das ganze Institut-für-Veterinärphysiologie für das freundliche und nette Arbeitsklima.

Großer Dank geht vor allem auch an Herrn Uwe Tietjen und Frau Katharina Wolf für die schöne Zeit in der Ussing-Kammer, der großen Bereitschaft bei allen kleinen und großen Problemen zu helfen und vor allem auch für die entspannende Zeit bei den Pferden.

Vielen Dank an Frau Gisela Manz, Frau Susanne Trappe und Herrn Martin Grunau für die große Hilfe und Unterstützung im Labor.

Ein großer Dank geht an meine Mitdotorandinnen für die gemeinsam verbrachte schöne Zeit.

Ein besonderer Dank geht an meine ganze Familie, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

„Last but not least“ möchte ich meinem Mann Thomas danken. Vielen Dank für deine unendliche Geduld und Unterstützung in den letzten zwei Jahren.

13 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 10.04.2014

Julia Rosendahl