

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

Charakterisierung eines nicht selektiven Anionenkanals
an kultivierten Pansen- und Psalterepithelzellen des Schafes

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

vorgelegt von
Maria-Ifigenia Georgi
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2010

Journal-Nr. 3448

Gefördert durch die H. Wilhelm Schaumann Stiftung

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. H. Martens
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. A. Gruber
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. G. von Samson-Himmelstjerna

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

anion exchange, chloride, ion channels, ion transport, omasum,
propionic acid, rumen, sheep

Tag der Promotion: 28. März 2011

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: 978-3-86664-953-8

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2010

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 2011

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Meinen Eltern und Großeltern

Wo immer ein Tier in dem Dienste des Menschen gezwungen wird,
geht sein Leiden uns alle an.

Albert Schweitzer

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	5
2	Literaturübersicht.....	7
2.1	Anatomie des Pansens.....	7
2.2	Histologie des Pansenepithels.....	9
2.3	Anatomie des Blättermagens.....	11
2.4	Produktion kurzkettiger Fettsäuren im Pansen.....	13
2.5	Resorption kurzkettiger Fettsäuren am Pansenepithel.....	13
2.5.1	Anstieg der Resorption der kurzkettigen Fettsäuren mit steigender Konzentration.....	14
2.5.2	Anstieg der Resorption der kurzkettigen Fettsäuren mit steigender Kettenlänge.....	15
2.5.3	Anstieg der Resorption der kurzkettigen Fettsäuren bei pH-Wert-Erniedrigung.....	15
2.6	Transport kurzkettiger Fettsäuren am Psalter.....	17
2.7	Einfluss auf den intraruminalen pH-Wert.....	17
2.8	Gestörte Resorption kurzkettiger Fettsäuren: Pansenazidose.....	18
2.9	Transepithelialer Transport.....	20
2.9.1	Parazellulär.....	20
2.9.2	Transzellulär.....	20
2.9.2.1	Diffusion.....	20
2.9.2.2	Elektrochemischer Gradient.....	21
2.9.2.3	Aktiver Transport.....	21
2.9.2.4	Sekundär aktiver Transport.....	21
2.10	Resorption von Natrium und Chlorid: Modell des resorbierenden Epithels.....	21
2.11	Transportmechanismen für die Aufnahme kurzkettiger Fettsäuren am Vormagenepithel.....	24
2.11.1	Parazelluläre Resorption.....	24
2.11.2	Transzelluläre Resorption.....	25
2.11.2.1	Apikale Aufnahme der protonierten, undissoziierten Form der kurzkettigen Fettsäuren (HSCFA).....	25
2.11.2.2	Apikale Aufnahme der kurzkettigen Fettsäureanionen (SCFA ⁻).....	26
2.11.2.2.1	Monocarboxylat-Transporter (MCT).....	26
2.11.2.2.2	Der Chlorid-Bikarbonat Austauscher (Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻ -Anionexchanger) ...	26
2.11.2.2.3	Der Natrium-Protonen-Austauscher (Na ⁺ /H ⁺ -Exchanger, NHE).....	28
2.12	Zusammenfassung der apikalen Aufnahmemechanismen für kurzkettige Fettsäuren.....	28
2.13	Intrazellulärer Metabolismus der kurzkettigen Fettsäuren in den Vormagenepithelzellen.....	29
2.14	Mechanismen für die basolaterale Ausschleusung der kurzkettigen Fettsäuren....	31
2.14.1	Basolaterale Ausschleusung der protonierten, undissoziierten kurzkettigen Fettsäuren (HSCFA).....	31
2.14.2	Basolaterale Ausschleusung der kurzkettigen Fettsäureanionen.....	32
2.14.2.1	Basolateraler Anionenaustausch.....	32
2.14.2.2	Der Monocarboxylat-Transporter 1.....	32
2.14.2.3	Der basolaterale Anionenkanal.....	32
2.15	Zusammenfassung für die eigene Fragestellung.....	35

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

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

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

1 Einleitung

Wiederkäuer haben zur Verwertung zellulosehaltiger Nahrung ein riesiges Vormagensystem entwickelt, welches 10 bis 20 % des gesamten Köpervolumens ausmacht. Der größte Vormagen, der Pansen, dient als Fermentationskammer für Bakterien und Mikroorganismen. Die Mikroorganismen werden dann mit in reichlichen Mengen produziertem Speichel in das Verdauungssystem gespült und verdaut. Der Speichelfluss des Rindes kann in laktierenden Kühen bis zu $310 \text{ l} \cdot \text{d}^{-1}$ betragen (Cassida und Stokes, 1986; Erdman, 1988; Silanikove, 1994; Bowman *et al.*, 2003). Er spielt eine wichtige Rolle zur Erhaltung eines günstigen Milieus für die Mikroorganismen. Ein relativ konstantes pH-Milieu mit konstanter Osmolarität ist dafür notwendig.

Der mikrobielle Abbau von Kohlenhydraten im Darm des Menschen und monogastrischer Tiere führt zur Entstehung kurzkettiger Fettsäuren (short chain fatty acids, SCFA) (Bergman, 1990; Gäbel *et al.*, 2002). Beim Wiederkäuer ist der Pansen der wichtigste Produktionsort für kurzkettige Fettsäuren. Die Aufnahme der kurzkettigen Fettsäuren über die Pansenschleimhaut steigt mit der Menge im Pansen produzierter kurzkettiger Fettsäuren an. Eine schnelle Resorption der kurzkettigen Fettsäuren im Pansen ist von überragender Bedeutung für die Erhaltung der Pansenhomöostase (Kristensen und Harmon, 2004). Somit bleibt normalerweise das ruminale Milieu für die Mikroorganismen im Pansen relativ konstant.

Bei abrupter Futterumstellung kann es zum Versagen der Osmo- und pH-Regulation des Pansenepithels kommen. Die Störungen können von Nahrungsverweigerung bis zur schwerwiegenden Schädigung der Pansenwand im Rahmen einer akuten Pansenazidose reichen (Owens *et al.*, 1998). Die verletzte Pansenwand kann ihre Barrierefunktion nicht mehr gewährleisten und Bakterien aus dem Pansen können in den Blutkreislauf gelangen.

Die Produktion kurzkettiger Fettsäuren im Pansen von Rindern und Schafen liegt zwischen $60 - 150 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ (Bergman, 1990). Die ruminale Produktion kurzkettiger Fettsäuren beim Rind beträgt bis zu $100 \text{ mol} \cdot \text{d}^{-1}$ (Allen, 1997). Das Rind deckt über 75 % seines täglichen Energiebedarfs aus diesen kurzkettigen Fettsäuren (Cummings *et al.*, 1987; Siciliano-Jones und Murphy, 1989; Gäbel *et al.*, 2002).

Trotz der großen ökonomischen Bedeutung des Rindes in Milch- und Fleischwirtschaft ist das Wissen über die Transportphysiologie am Pansen- und Paltarepithel weiterhin unvollständig. Der genaue Aufnahmemechanismus der kurzkettigen Fettsäuren über das Pansenepithel ist unbekannt.

Als Aufnahmeweg der kurzkettigen Fettsäuren in die Pansenepithelzelle hinein wird klassisch die einfache Lipiddiffusion postuliert. Im Zytosol dissoziiert die kurzkettige Fettsäure in Fettsäureanion und Proton. Aktuelle Forschungsergebnisse deuten ebenfalls auf eine Aufnahme über einen kurzkettigen Fettsäure/Bikarbonat-Austauscher (SCFA⁻/HCO₃⁻ -Austauscher) hin (Kramer *et al.*, 1996; Aschenbach *et al.*, 2009). Beide Aufnahmewege führen zu einer Ansäuerung des Zytosols der Pansenepithelzellen, die gleichzeitig die luminal Natriumabsorption fördert (Abdoun *et al.*, 2010). Die Natriumionen werden luminal im Austausch gegen die H⁺-Ionen über den Natrium-Protonen-Austauscher (Na⁺/H⁺-Exchanger, NHE) in die Zelle aufgenommen (Gäbel *et al.*, 1991b). Natrium verlässt die Zelle basolateral über die Na⁺/K⁺-ATPase. Das aufgenommene Natrium wird für die Speichel(re)-sekretion wieder verwendet. Ein zu starkes Absinken des pH-Wertes im Zellinneren wird somit verhindert. Allerdings akkumulieren im Zytosol die kurzkettigen Fettsäureanionen.

Der Ausschleusungsmechanismus über die basolaterale Seite aus der Zelle hinaus bleibt weiterhin unklar. In früheren Studien wurde bereits eine basolaterale Leitfähigkeit für Chlorid postuliert (Diernaes *et al.*, 1994; Sehested *et al.*, 1999a). Eine entsprechende Leitfähigkeit konnte an isolierten Zellen nachgewiesen werden (Abdoun *et al.*, 2005). Mikropunktionsversuche bestätigten die basolaterale Lokalisation (Leonhard-Marek *et al.*, 2006). Der basolaterale Efflux sowohl von Chlorid als auch von Azetat findet wahrscheinlich über den zugrundeliegenden, vor kurzem in Pansenepithelzellen charakterisierten großen Anionenkanal statt (Stumpff *et al.*, 2009). Der Efflux wird durch das Potential der basolateralen Na⁺/K⁺-ATPase aufrechterhalten.

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik an isolierten Pansenepithelzellen herauszufinden, ob dieser Kanal ebenfalls für Propionat und möglicherweise auch für Butyrat permeabel ist. Es sollte versucht werden, die Regulationsmechanismen besser zu verstehen.

Zusätzlich wurde die in vorangegangenen Studien etablierte Methode zur Isolierung von Pansenepithelzellen verbessert und eine neue Methode zur Isolierung von Paltarepithelzellen etabliert.

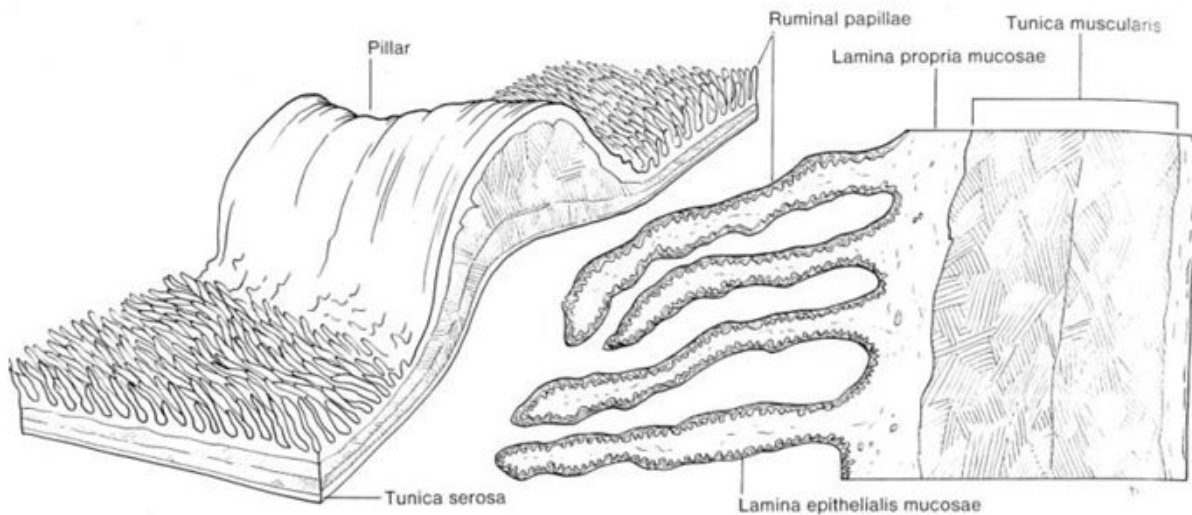
2 Literaturübersicht

Das Vormagensystem der Wiederkäuer besteht aus dem Pansen (lat.: *rumen*), dem Netzmagen (lat.: *reticulum*) und dem Blättermagen (lat.: *omasum*, *psalter*). Der Labmagen (lat.: *abomasum*) entspricht beim Wiederkäuer dem Drüsenmagen anderer Säugetiere. Die drei Abschnitte des Vormagensystems bei Wiederkäuern – Pansen, Netzmagen und Blättermagen - sind mit einem mehrschichtigen, verhornten und drüsenlosen Epithel ausgekleidet (Schnorr und Vollmerhaus, 1967a). Das Vormagenepithel besteht aus vier Zellschichten: *stratum corneum*, *stratum granulosum*, *stratum spinosum* und *stratum basale*.

Das Epithel erfüllt zwei wesentliche Aufgaben: „Barriere“ und „Stofftransport“ (Powell, 1981). Es schützt den Organismus als eine Barriere zwischen der äußeren Umgebung und dem inneren Milieu vor einer unkontrollierten Stoffpassage und verhindert somit sowohl die Aufnahme exogener Schadstoffe als auch den Verlust wertvoller körpereigener Substanzen. Gleichzeitig ermöglicht das Vormagenepithel einen spezifischen, teilweise gerichteten und regulierbaren Transport von Ionen und Molekülen.

2.1 Anatomie des Pansens

Der Pansen (Zottenmagen, lat.: *rumen*) ist der größte Magen der Wiederkäuer und fasst beim Rind 102 – 148 Liter (Nickel *et al.*, 1999). Er liegt mit seiner Wandfläche der linken und ventralen Bauchwand an und berührt mit seiner Eingeweidefläche den Darm, die Leber, den Blättermagen sowie den Labmagen. Die beiden Seitenflächen des Pansens werden durch je eine Längsfurche in einen dorsalen Sack und einen ventralen Sack geschieden. Der Pansen ist mit dem Netzmagen über das *ostium ruminoreticulare* verbunden. Die enge funktionelle Beziehung hat ihm auch die Bezeichnung Reticulorumen eingetragen. An seiner Innenfläche ist der Pansen mit Zotten (lat.: *papillae ruminis*) besetzt (siehe Abbildung 1). Die Zottenzahl liegt zwischen 10 und 121 pro cm² (Schnorr und Vollmerhaus, 1967b).

**Abbildung 1**

Schematische Darstellung des Pansenepithels (Banks, Applied Veterinary Histology 2001)

Die *lamina propria mucosae* befindet sich unter dem Oberflächenepithel. Sie bildet einen mikroskopisch deutlich sichtbaren Papillarkörper aus (Banks, 2001) (siehe Abbildung 2). Eine *lamina muscularis mucosae* existiert allerdings nicht. Die sich anschließende *tela submucosa* ist nur gering ausgebildet und enthält dafür ein dichtes Netz an Blut- und Lymphgefäßen, in deren Endothel zahlreiche Poren und Pinozytosevesikel Nerven und multipolare Ganglienzellen vorhanden sind (Dobson *et al.*, 1956; Hofmann und Schnorr, 1982). Die *tunica muscularis* umschließt diese Schichten zirkulär und longitudinal. Die hierauf folgende *serosa* grenzt den Pansen gegen die Bauchhöhle ab. Die Struktureigenschaften des Pansenepithels - insbesondere die Vergrößerung der Oberfläche durch zahlreiche Zotten - deuten auf resorptive und sekretorische Funktionen des Organs hin (Mosimann und Kohler, 1990), sodass der Pansen nicht nur als Fermentationskammer gesehen werden kann. So werden insbesondere große Mengen an kurzkettigen Fettsäuren resorbiert (Phillipson, A. T., 1949; Bergman *et al.*, 1965; Gäbel *et al.*, 2002); daneben Natrium (Stevens, 1964; Ferreira *et al.*, 1966; Harrison, 1971; Martens *et al.*, 1991), Magnesium (Gäbel *et al.*, 1987a; Leonhard *et al.*, 1990; Schweigel *et al.*, 1999) und Ammoniak (McDonald, 1948; Bodeker *et al.*, 1990; Abdoun *et al.*, 2005), während Harnstoff sezerniert wird (Decker *et al.*, 1961; Houpt und Houpt, 1968; Harmeyer und Martens, 1980; Abdoun *et al.*, 2010).

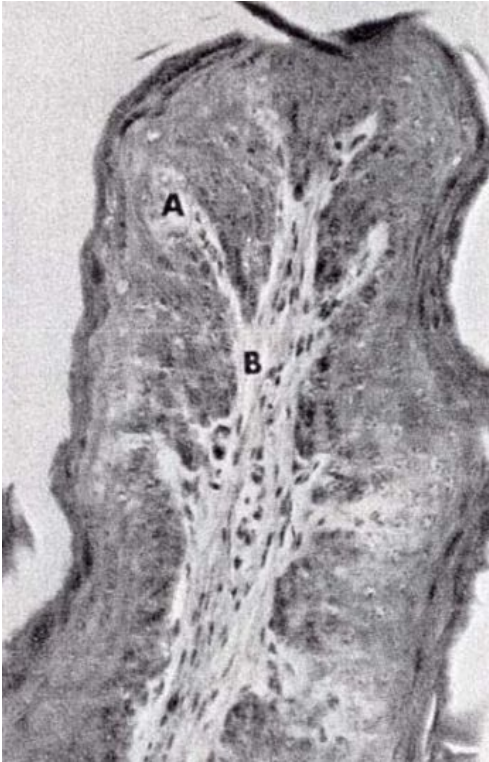


Abbildung 2

Querschnitt durch eine Pansenzotte (HE-Färbung, Vergrößerung x 250, aus Dellmanns Textbook of Veterinary Histology 2006). A: mehrschichtiges Plattenepithel B: *Lamina propria* mit Bindegewebe

2.2 Histologie des Pansenepithels

Die Schleimhaut des Pansens ist drüsenlos und trägt ein mehrschichtig, verhornendes Plattenepithel (Dobson *et al.*, 1956; Graham und Simmons, 2005). In mehrschichtigen Epithelien liegen mehrere Zellschichten übereinander. Grundsätzlich lässt sich eine Dreiteilung vornehmen: In der basalen Schicht, die an der Basallamina verankert ist, finden Zellteilungen statt. Die Zellen steigen auf und differenzieren in einer Mittel- oder Intermediärschicht auf spezifische Weise; schließlich erreichen sie die Oberflächen- oder Superfizialschicht. Mehrschichtige Plattenepithelien befinden sich in den Bereichen, an denen die mechanische Belastung groß ist. Beim mehrschichtig verhornenden Epithel kommt es durch das Absterben und Verhornen der äußeren Zellschichten zu einer weiteren Schutzfunktion. Beim Menschen ist die Epidermis das einzig verhornende Plattenepithel.

Epithelzellen besitzen einen Haftkomplex (Schlussleistenkomplex) bestehend aus *zonula occludens* (Tight Junction), *zonula adhaerens* (Adhaerens Junction, Gap Junction) und Desmosom (*macula adhaerens*). Beim Pansenepithel sind die Interzellularspalten der Zellen des oberen *stratum granulosum* und im unteren *stratum spinosum* enger als in den übrigen Zonen und außerdem durch Tight Junctions verschlossen (Graham und Simmons, 2005).

Sie enthalten die Proteine Claudin 1 und ZO1, die Gap Junction das Protein Connexin-43 (Dobson *et al.*, 1956; Graham und Simmons, 2005). Der Schlussleistenskomplex kann eine physikochemische Schranke für großmolekulare Stoffe darstellen, für kleinemolekulare Stoffe ist er jedoch kein Hindernis (Mosimann und Kohler, 1990). Durch den Schlussleistenskomplex ist das Zytosol der Zellen miteinander verbunden, sodass das Pansenepithel ein funktionelles Syncytium bildet.

Im Hinblick auf die Resorptionsfunktion ist das Pansenepithel modifiziert und in fünf Schichten untergliedert (Eurell, 2006) (siehe Abbildung 3).

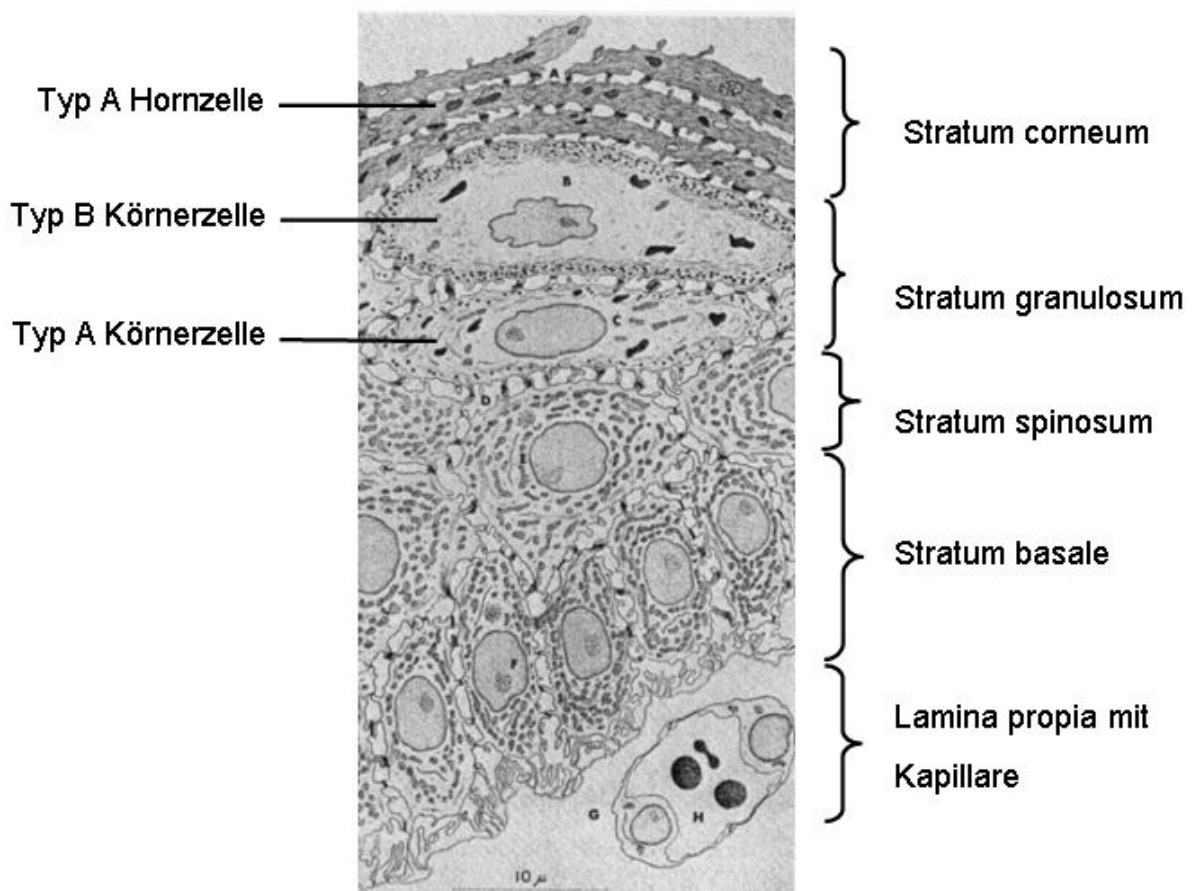


Abbildung 3

Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Pansenzotte (aus Dellmanns Textbook of Veterinary Histology 2006).

Das *stratum basale* des Epithels liegt der Basalmembran an. Die hochprismatischen Basalzellen sind über Hemidesmosome an der Basalmembran verankert. Die Zwischenräume zwischen den Basalzellen sind relativ weit, die Verbindung der Zellen untereinander erfolgt durch Desmosomen, die auf den Zellfortsätzen sitzen.

Die tiefe Stachelzellschicht (*stratum spinosum profundum*) des Pansenepithels besteht aus polygonalen Parabasalzellen. Sie überbrücken ebenfalls durch Zellfortsätze die Zellzwischenräume. Die Zellfortsätze reichen teilweise bis zur Basalmembran. Die oberflächliche Stachelzellschicht (*stratum spinosum superficiale*) setzt sich aus den abgeflachten Intermediärzellen zusammen. Ihre Fortsätze sind besonders reich an Tonofilamenten und Haftplatten zur Bildung von Desmosomen.

Elektronenmikroskopisch können in der Körnerzellschicht (*stratum granulosum*) des Pansenepithels zwei Typen von Körnerzellen unterschieden werden (Eurell, 2006) (siehe Abbildung 3). Die tiefer liegenden Typ A-Körnerzellen sind normal abgeflacht und ähneln den Intermediärzellen, allerdings haben sie kurze Zellfortsätze. Die höher liegenden Typ B-Körnerzellen sind größer und aufgequollen; sie bilden keine zusammenhängende Zellschicht. Die Zellmembranen benachbarter Zellen sind durch eingelagerte Proteine (Tight Junctions) miteinander verbunden.

Die zum Hohlraum des Pansens liegende Hornschicht (*stratum corneum*) besteht aus Hornzellen. Die Typ A Hornzellen sind abgeplattet und enthalten noch Zellkernreste, sie sind über Tight Junctions miteinander verbunden. Aus ihnen entstehen die Typ B-Hornzellen (nicht abgebildet). Diese Zellen können sich aus dem Epithelverband lösen oder zu Typ C-Hornzellen (Ballon- oder Quellzellen) entwickeln. Die oberflächlich liegenden Zellen (Typ C) sind sehr stark aufgequollen (nicht abgebildet).

Beim Pansenepithel unterscheidet man nach der Ausrichtung eine apikale Seite, die zum Lumen hin weist, und eine basale Seite, die zur Basalmembran bzw. zum Blutgefäßsystem zeigt. Diese Polarität besteht nicht nur am Epithel als Gesamtstruktur, sondern auch auf Ebene der einzelnen Epithelzellen. Der apikale und der basolaterale Zellpol weisen ebenfalls unterschiedliche Transportproteine in der Zellmembran auf.

2.3 Anatomie des Blättermagens

Der Blättermagen (Psalter, Buch, Löser, lat.: *omasum*) ist der dritte Abschnitt und die kleinste Magenabteilung des drüsenlosen Vormagensystems der Wiederkäuer (Favilli, 1937; Yamamoto *et al.*, 1991; Nickel *et al.*, 1999). Er ist von fast kugeliger Gestalt mit leicht abgeplatteten Seitenflächen und liegt zwischen Netzmagen und Labmagen rechts im intrathorakalen Teil der Bauchhöhle (Nickel *et al.*, 1999). Hinsichtlich seiner Anatomie zeigt der Blättermagen die charakteristische Ausbildung von zahlreichen, unterschiedlich großen mondsichelförmigen Schleimhautfalten, die als Psalterblätter (*Laminae omasi*) in das Innere des Organs hervorragen und so die Oberfläche um ein Vielfaches vergrößern (Nickel *et al.*,

1999). Je nach Autor wird die Anzahl der Psalterblätter beim Schaf zwischen 33 und 53 (Mc Sweeney, 1986) bzw. zwischen 72 und 80 (Towne und Nagaraja, 1990; Nickel *et al.*, 1999) angegeben. Die Blätter sind mit kleinen warzenförmigen Papillen besetzt, die samt ihrer Hornkappen von oral (haubenwärts) nach aboral (labmagenwärts) abflachen (Scott, 1971; Nickel *et al.*, 1999).

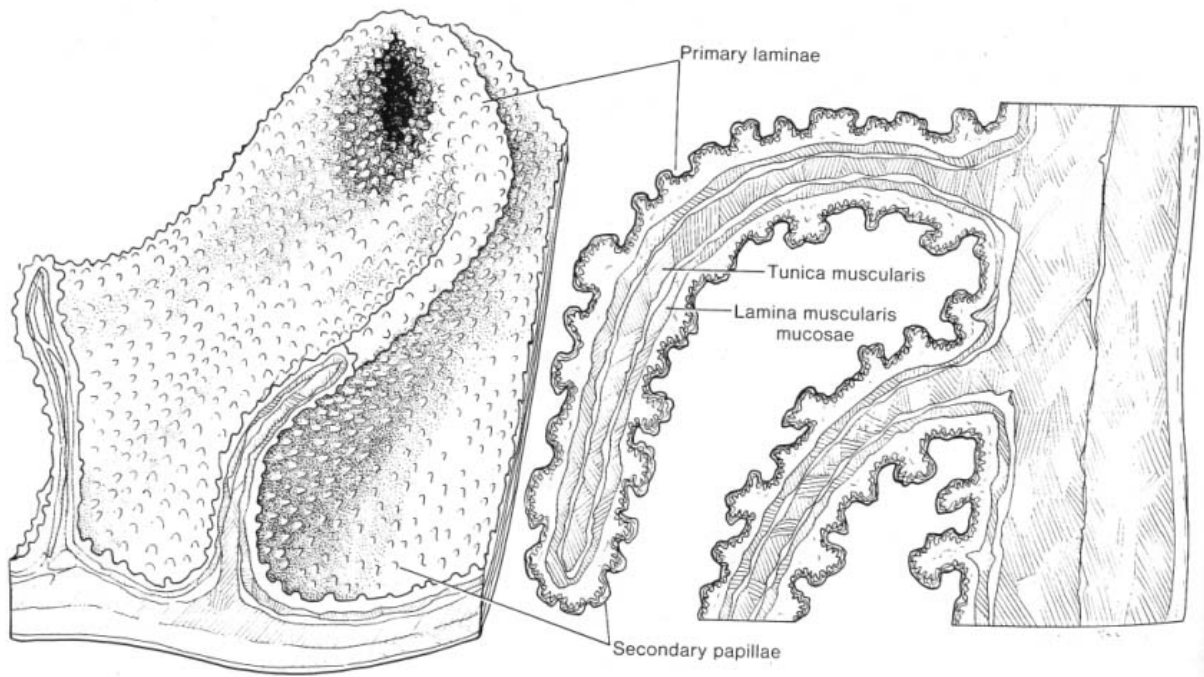


Abbildung 4

Schematische Darstellung eines Psalterblattes mit Querschnitt durch das Epithel (aus Banks, Applied Veterinary Histology 2001).

Anfangs wurde dem Blättermagen als Hauptfunktion die Nahrungszerkleinerung bzw. Zerreißung zugeschrieben (Favilli, 1937; Ellenberger, 1981). Weitere Untersuchungen ließen aber darauf schließen, dass die schon früh vermutete resorptive Funktion (Trautmann und Schmitt, 1935; Ekman und Sperber, 1953; Oyaert und Bouckaert, 1961; Ritzhaupt *et al.*, 1998) gegenüber der mechanischen Funktion größere Bedeutung hat als vorher angenommen (Hauffe und Engelhardt, 1975; Edrison *et al.*, 1986). Das teilweise Fehlen eines echten *stratum granulosum* an den Papillen (Verringerung der Epitheldicke) und die zur Oberfläche vertikal orientierten Parabasal- und Intermediärzellen (Vergrößerung der basolateralen Membran) (Yamamoto *et al.*, 1991) weisen auf die regen epithelialen Transportprozesse hin. Das im interpapillaren Bereich sehr dünne Epithel wird von einem engmaschigen, subepithelialen Gefäßnetz durchzogen, welches die Aufnahme und Abgabe von Substanzen ermöglicht (Favilli, 1937; Brownlee und Elliot, 1960; McSweeney, 1988; Yamamoto *et al.*, 1991; Yamamoto *et al.*, 1994). Eine der wichtigsten Funktionen des

Blättermagens der Wiederkäuer ist die Absorption von Puffern. Hierzu zählen insbesondere großen Mengen von HCO_3^- (Hydrogencarbonat, Bikarbonat) und kurzkettigen Fettsäuren (Phillipson, AT und McAnnally, 1942; Ekman und Sperber, 1953; Oyaert und Bouckaert, 1961; Tilling, 1997; Ali *et al.*, 2006), um eine ausreichende Ansäuerung der Ingesta im Labmagen gewährleisten zu können und um eine übermäßige Gasbildung in Form von CO_2 zu verhindern.

2.4 Produktion kurzkettiger Fettsäuren im Pansen

Da Wiederkäuer Pflanzenfresser sind, besteht ihre Nahrung hauptsächlich aus Pflanzenzellen. Bei der Futtermitteldauung durch im Pansen lebende Mikroorganismen werden komplexe Kohlenhydrate wie Zellulose, Hemizellulose, Pektine, Stärke, Dextrane und lösliche Kohlenhydrate fermentiert. Durch den mikrobiellen Fermentationsprozess dieser Polysaccharide entstehen die kurzkettigen Fettsäuren (SCFA, short chain fatty acids) als Hauptprodukt (Counotte und Prins, 1981; Bugaut, 1987; Bergman, 1990). Pro Kilogramm aufgenommene Trockenmasse werden im Vormagen 4 – 6 Mol kurzkettige Fettsäuren gebildet (Allen, 1997), wobei die Mengen bei laktierenden Kühen bis zu $100 \text{ Mol} \cdot \text{d}^{-1}$ betragen können. Es kommt zu einem starken Anstieg der Konzentration kurzkettiger Fettsäuren im Pansen; bei Rindern und Schafen wurden Werte von $60 - 150 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ gemessen (Bergman *et al.*, 1965). Bei mikrobieller Entgleisung können sogar Maximalwerte von bis zu $200 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ kurzkettige Fettsäuren erreicht werden (Gäbel, 1988; Bergman, 1990).

Die Gesamtproduktion kurzkettiger Fettsäuren teilt sich auf in Azetat (Essigsäure-Anion, $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$) 40 – 75 %, Propionat (Propionsäure-Anion, $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_2$) 15 – 47 %, Butyrat (Buttersäure-Anion, $\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2$) 7 – 20 % und ca. 5 % längerkettige Fettsäuren (Annison *et al.*, 1957; Bugaut, 1987; Bergman, 1990). Das Verhältnis der drei kurzkettigen Fettsäuren Azetat, Propionat und Butyrat zueinander ist abhängig von der Art der Fütterung. Dabei unterliegt die Konzentration kurzkettiger Fettsäuren im Vormagen tagesrhythmischen Schwankungen. Die höchsten Konzentrationen werden zwei bis vier Stunden nach der Fütterung gemessen (Remond *et al.*, 1993).

2.5 Resorption kurzkettiger Fettsäuren am Pansenepithel

Die im Pansen gebildeten kurzkettigen Fettsäuren werden zur Synthese bakterieller Lipide verwandt, vom Pansenepithel resorbiert oder in den Pfortaler weitergeleitet und dort resorbiert (Allen, 1997).

Durch verschiedene *in vivo* Versuchsmethoden wie z. B. der Untersuchung am gewaschenem Pansen durch intraruminale Infusion von kurzkettigen Fettsäuren und Bestimmung der Netto-Resorptionsrate, konnte gezeigt werden, dass 75 - 88 % der intraruminal produzierten kurzkettigen Fettsäuren direkt vom Pansenepithel resorbiert werden (Phillipson, AT und McAnnally, 1942; Phillipson, A. T., 1949; Thorlacius und Lodge, 1973; Hauffe und Engelhardt, 1975; Peters *et al.*, 1992; Lopez *et al.*, 1994; Gäbel *et al.*, 2002).

70 – 80 % des täglichen Energiebedarfes des Wiederkäuers werden aus den resorbierten kurzkettigen Fettsäuren gedeckt. Somit sind die kurzkettigen Fettsäuren die Hauptenergiequelle für den Wiederkäuer (Carroll und Hungate, 1954; Bergman *et al.*, 1965; Bugaut, 1987; Fahey und Berger, 1988; Bergman, 1990; Gäbel *et al.*, 2002)

Dirksen 1984 und Gäbel 1988 fanden bei längerfristig erhöhtem Krafffutterangebot eine deutliche Steigerung der Resorptionskapazität des Pansens für kurzkettige Fettsäuren (Dirksen *et al.*, 1984; Gäbel, 1988). Somit ist die Resorptionskapazität der Vormägen für kurzkettige Fettsäuren fütterungsabhängig; der Energiegehalt der Ration spielt dabei eine entscheidende Rolle.

Die Resorptionsmechanismen müssen dabei gleichzeitig verschiedene Funktionen erfüllen: erstens muss der Energiebedarf des Wiederkäuers gedeckt werden, zweitens müssen die Nebenwirkungen einer zu hohen Konzentration kurzkettiger Fettsäuren im Pansen verhindert werden, drittens muss der intraruminale pH-Wert in bestimmten Grenzen konstant gehalten werden und viertens darf die Homeostase der Zellen des Epithels nicht beeinträchtigt werden.

2.5.1 Anstieg der Resorption der kurzkettigen Fettsäuren mit steigender Konzentration

Die Resorption der kurzkettigen Fettsäuren aus dem Pansen und dem Psalter steigt mit zunehmender Konzentration an (Weigand *et al.*, 1972a; Weigand *et al.*, 1972b; Dijkstra *et al.*, 1993; Ali *et al.*, 2006). Eine ähnliche Beziehung konnte an zahlreichen anderen Epithelien beobachtet werden; so für Propionat am distalen Colon des Kaninchens (Sellin *et al.*, 1993) und für Butyrat am distalen Colon der Ratte (Charney *et al.*, 1998).

Im portalen Blut des Wiederkäuers beträgt die Konzentration der kurzkettigen Fettsäuren normalerweise 1 – 5 % der Konzentration im Pansen (Masson und Phillipson, 1951; Annison *et al.*, 1957; Reynolds, C. K. *et al.*, 1988). Es besteht also normalerweise ein enormes

Konzentrationsgefälle zwischen Pansenlumen und Blut, das die Resorption der kurzkettigen Fettsäuren antreibt.

2.5.2 Anstieg der Resorption der kurzkettigen Fettsäuren mit steigender Kettenlänge

Klassisch wird davon ausgegangen, dass die kurzkettigen Fettsäuren in der protonierten, undissoziierten Form (HSCFA) durch die Lipidmembran der Zelle ins Zytosol strömen können. Da die kurzkettigen Fettsäuren unterschiedlich lange Molekülketten besitzen, ist ihre Lipophilie unterschiedlich stark. Am Pansen konnte durch vielfältige Untersuchungen gezeigt werden, dass die Clearance bzw. die Resorptionsrate der kurzkettigen Fettsäuren in der Reihenfolge Butyrat > Propionat > Azetat abnimmt (Weigand *et al.*, 1972a; Thorlacius und Lodge, 1973; Dirksen *et al.*, 1984; Gäbel *et al.*, 1991a; Dijkstra *et al.*, 1993; Sehested *et al.*, 1999b), und somit grob der Lipophiliesequenz folgt. Allerdings ist der Anstieg der Resorption der kurzkettigen Fettsäuren mit zunehmender Kettenlänge wesentlich geringer als aufgrund der unterschiedlichen Lipophilie zu erwarten wäre. So wurde *in vivo* eine nur um 1,6 – 1,9 mal größere fraktionelle Resorption von Propionat gemessen als von Acetat; ebenfalls bezogen auf die Konzentration, wurde Butyrat nur 1,2 mal so schnell resorbiert wie Propionat (Dijkstra *et al.*, 1993). Nach Messungen von Walter und Gutknecht an synthetischen Lipidmembranen ist die Permeabilität von Butyrat hingegen etwa zweimal so hoch wie die Permeabilität von Propionat, welche wiederum 5-mal so hoch wie die Permeabilität von Azetat ist (Walter und Gutknecht, 1986). Es muss allerdings gesagt werden, dass auch an synthetischen Membranen je nach Zusammensetzung erhebliche Verschiebungen in diesen Relationen beobachtet werden können, so dass hieraus keine Verwerfung der Hypothese einer Aufnahme durch lipophile Diffusion erfolgen kann.

2.5.3 Anstieg der Resorption der kurzkettigen Fettsäuren bei pH-Wert-Erniedrigung

Problematischer ist es hingegen, zu erklären, warum Verschiebungen des pH-Wertes nicht die erwarteten Effekte auf die Resorptionsrate aufweisen. Wie bereits erwähnt, besteht ein Gleichgewicht zwischen der protonierten Form der kurzkettigen Fettsäuren (HSCFA) und der dissoziierten Form (SCFA⁻). Dieses Gleichgewicht hängt einerseits von dem pK-Wert der kurzkettigen Fettsäure und zweitens von dem pH-Wert der Lösung ab. Diese leitet sich aus der Henderson-Hasselbalch-Gleichung ab:

$$\text{pH} = \text{pK} + \log (\text{SCFA}^- / \text{HSCFA})$$

Bei wiederkäuergerechter Fütterung liegt der pH-Wert bei 5,8 – 6,8. (Dijkstra *et al.*, 1993). Die pK-Werte der kurzkettigen Fettsäuren Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure liegen dicht beieinander um $\sim 4,8$. Nach der Henderson-Hasselbalch-Gleichung liegen bei einem pH-Wert von 6,8 nur 1 % der kurzkettigen Fettsäuren in der protonierten, undissoziierten Form vor. Bei einem pH-Wert von 5,8 sind es hingegen 10 %. In Übereinstimmung mit dem Diffusionsmodell konnte sowohl *in vivo* in Untersuchungen am gewaschenen Pansen als auch in Ussing-Kammer-Untersuchungen an isolierten Epithelien des Pansens von Schaf und Rind ein Anstieg der Resorption der kurzkettigen Fettsäuren nach Absenken des mukosalen pH-Wertes beobachtet werden (Danielli *et al.*, 1945; Pfander und Phillipson, 1953; Stevens und Stettler, 1966a; Weigand *et al.*, 1972a; Weigand *et al.*, 1972b; Dijkstra *et al.*, 1993; Kramer *et al.*, 1996; Sehested *et al.*, 1999a).

Allerdings beobachteten bereits Danielli 1945, sowie Stevens und Stettler 1966, dass bei pH-Wert-Erniedrigung trotz zehnfacher Erhöhung der Konzentration der undissoziierten kurzkettigen Fettsäure die Resorptionsrate von Azetat weitaus geringer anstieg, als zu erwarten gewesen wäre (Danielli *et al.*, 1945; Stevens und Stettler, 1966b). Somit vermuteten bereits diese Autoren, dass ein weiterer Mechanismus an der Resorption der kurzkettigen Fettsäuren beteiligt sein müsste.

Eine Rolle bei diesen Abweichungen könnte theoretisch jedoch auch ein mukosales Mikroklima spielen, wodurch es an der Grenzschicht zwischen Organlumen und Epithel zu einem unter Umständen erheblich abweichenden pH-Wert kommt. Bei Pufferung dieses Mikroklimas – z.B. durch die Sekretion von Bikarbonat – werden die Resorptionsraten für kurzkettige Fettsäuren unter Umständen nur begrenzt oder gar nicht durch Veränderungen des luminalen pH-Wertes beeinflusst werden. Ein solches Mikroklima wurde nicht nur am Pansen, sondern auch an anderen Epithelien des Gastrointestinaltraktes beobachtet (Lucas *et al.*, 1975; Genz *et al.*, 1999; Leonhard-Marek *et al.*, 2006; Abdoun *et al.*, 2010).

Einen noch gravierenderen Einwand gegen die reine Diffusionshypothese stellt die Beobachtung dar, dass mit zunehmender Alkalinisierung der Effekt der Kettenlänge auf die Resorptionsgeschwindigkeit abnimmt (Danielli *et al.*, 1945; Masson und Phillipson, 1951; Thorlacius und Lodge, 1973; Bugaut, 1987). Diese Beobachtung ist nicht mit dem Efflux durch Lipiddiffusion zu erklären und weist auf eine Beteiligung spezifischer Transportproteine für den Efflux der kurzkettigen Fettsäuren aus dem Pansen hin. Diese Vermutung wurde am Pansen von verschiedenen Autoren bestätigt (Gäbel und Sehested, 1997; Gäbel *et al.*, 2002; Aschenbach *et al.*, 2009).

Der größte Teil der im Pansen produzierten kurzkettigen Fettsäuren wird bereits vom Pansenepithel selbst resorbiert; es gelangen aber bis zu 40% der im Pansen produzierten kurzkettigen Fettsäuren in den Psalter (Phillipson, AT und McAnnally, 1942; Barcroft *et al.*, 1944; Yang und Thomas, 1965; Edrison *et al.*, 1977; Edrison und Smith, 1979; Edrison *et al.*, 1986; Ali *et al.*, 2006). Bei Ankunft der Ingesta im Labmagen sind die kurzkettigen Fettsäuren fast vollständig resorbiert (Yang und Thomas, 1965; Edrison *et al.*, 1986). Die Kapazität des Blättermagens, ebenfalls kurzkettige Fettsäuren zu resorbieren, ist besonders bei mit krautfutterreichen Rationen gefütterten Tieren von Bedeutung. Die erhöhte Trockensubstanzaufnahme (Tamminga und Van Vuuren, 1988) und die größere Menge an leichtfermentierbaren Kohlenhydraten (Penner *et al.*, 2009) führen zur einer größeren Menge kurzkettiger Fettsäuren, die vom Pansen in den Blättermagen abfließen. In *in vivo* Versuchen zeigte Barcroft 1944 durch Blutentnahmen aus der Psaltervene, dass der Gehalt kurzkettiger Fettsäuren dort zwei bis zehnfach höher war als im entnommenen Blut aus der Labmagenvene (Barcroft *et al.*, 1944). Gray zeigte 1954 in *post mortem* Studie, dass 40 - 69 % der in den Blättermagen gelangten kurzkettigen Fettsäuren dort resorbiert wurden (Gray *et al.*, 1954). Niedrigere Werte fand von Engelhardt 1975, der zeigte, dass der Anteil der im Blättermagen resorbierten kurzkettigen Fettsäuren bei 10 % der Gesamtresorption über das Vormagenepithel liegt (Hauffe und Engelhardt, 1975).

Da die Zusammensetzung der Mikroflora des Blättermagens der des Pansens entspricht (Smith, 1984), können auch hier noch zusätzlich kurzkettige Fettsäuren produziert werden. Bei Schafen wurde die Produktion kurzkettiger Fettsäuren im Blättermagen auf ca. 15 % der Gesamtproduktion kurzkettiger Fettsäuren geschätzt (Giesecke und Engelhardt, 1975; Smith, 1984), so dass die gesamte Resorptionsleistung des Psalters höher sein dürfte als die sich aus dem ruminalen Efflux ergebende. Insgesamt gibt es jedoch erstaunlich wenige Untersuchungen zu diesem Thema, was sicherlich mit den Schwierigkeiten zusammenhängt, die sich bei einer operativen Fistulierung des Psalters *in vivo* ergeben.

2.7 Einfluss auf den intraruminalen pH-Wert

Die Produktion kurzkettiger Fettsäuren ist zwar wichtig für den Wiederkäuer, jedoch geht sie mit einer gleichzeitigen Erhöhung der intraruminalen Protonenkonzentration (= Senkung des intraruminalen pH-Wertes) einher. Dieser Ansäuerung wirken basische Substanzen wie HCO_3^- und HPO_4^{2-} (Hydrogenphosphat), die mit dem Speichel produziert werden, entgegen. Dabei gelangen mit dem Speichel $\sim 40 \text{ Mol} \cdot \text{d}^{-1} \text{ NaHCO}_3^-$ in den Pansen, das bei niedrigem pH-Wert eine fast äquimolare Menge an Protonen puffern kann (Kohn und Dunlap, 1998). Ungefähr $\sim 7 \text{ Mol} \cdot \text{d}^{-1}$ Protonen werden durch das im Speichel enthaltene Na_2HPO_4 gepuffert

(Allen, 1997). Das Futter enthält nur wenig puffernde Substanzen ($\sim 9 \text{ Mol}\cdot\text{d}^{-1}$) (Ash und Dobson, 1963; Erdman, 1988; Gäbel *et al.*, 1991b; Martens *et al.*, 1991; Allen, 1997; Sehested *et al.*, 1999a; Gäbel *et al.*, 2002). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass zusätzliche Mechanismen notwendig sind, um den pH-Wert des Pansens zu stabilisieren (Gäbel *et al.*, 2002; Aschenbach *et al.*, 2009).

Durch die Senkung des pH-Wertes im Panseninhalt nähert sich der pH-Wert dem pK-Wert der kurzkettigen Fettsäuren ($\sim 4,8$). Es steigt der Anteil der protonierten, undissoziierten kurzkettigen Fettsäuren (HSCFA) und ebenfalls deren Resorption (Stevens und Stettler, 1966a; Thorlacius und Lodge, 1973). Durch die Aufnahme der protonierten, undissoziierten Form der kurzkettigen Fettsäuren (HSCFA) in das Pansenepithel werden die Protonen zwar aus dem Pansenlumen entfernt (Rechkemmer *et al.*, 1995), jedoch kann das Epithel selbst durch die Aufnahme der kurzkettigen Fettsäuren mitsamt Protonen gefährdet werden. Beim Zusammenbruch einer effektiven pH-Wert-Regulation kommt es zur Beeinträchtigung der Enzymfunktionen mit nachfolgendem Zelltod (Boron und Boulpaep, 2003).

2.8 Gestörte Resorption kurzkettiger Fettsäuren: Pansenazidose

Die Pansenazidose stellt die häufigste fütterungsbedingte Problematik bei Produktionswiederkäuern dar und führt zu enormen wirtschaftlichen Verlusten (Enemark, 2008). Eine ruminale Azidose entsteht nach der Aufnahme großer Mengen leicht fermentierbarer Kohlenhydrate, z. B. durch einen hohen Anteil Kraftfutter in der Futtermittelration. Besonders leicht entsteht eine Pansenazidose bei Tieren, denen keine ausreichende Gewöhnungszeit an dieses Futter gegeben wurde (Owens *et al.*, 1998). Bei einer akuten Azidose zeigen die Tiere ein klinisch manifestes Krankheitsbild. Typische Symptome sind Anorexie, abdominale Schmerzen, Tachykardie, Tachypnoe, Diarrhoe, Lethargie, schwankender Gang, Festliegen. Ohne Therapie können die Tiere schnell verenden (Krause und Oetzel, 2005).

Bei der subakuten ruminale Azidose (SARA, subacute ruminal acidosis) ist der pH-Wert im Pansenlumen nur geringgradig herabgesetzt bzw. sogar noch im unteren Normalbereich. Hier ist die Rumenitis (Entzündung des Pansenepithels) die typische Läsion. Sobald das Pansenepithel stärker entzündet ist, werden die Pansenzotten von Bakterien besiedelt. Die Bakterien können nach Durchwanderung der Pansenwand in den portalen Kreislauf übertreten und Leberabszesse oder eine Peritonitis verursachen (Kleen *et al.*, 2003; Plaizier *et al.*, 2008). Ebenfalls kommt es zu immunologischen Störungen, die sich z. B. auch in Form einer Laminitis äußern können (Nocek, 1997).

Beide Erkrankungen, die akute Pansenazidose und die subakute Ruminale Azidose, entstehen als Folge derselben Ursache: einer unzureichenden Pufferung anfallender

Protonen im Pansen. In der Regel kommt es neben einer Zunahme der Protonenkonzentration (= Senkung des intraruminalen pH-Wertes) auch zu einer Akkumulation anderer Fermentationsprodukte, z. B. den kurzkettigen Fettsäuren, die den höchsten Anteil der ruminalen Anionen darstellen (Bramley *et al.*, 2008). Zugleich wird immer auch eine entsprechende Erhöhung der Kationenkonzentration im Pansen vorliegen.

Bei der Rationsgestaltung ist zur Vermeidung der Pansenazidose zum einen besonders auf den Anteil leicht fermentierbarer Kohlenhydrate zu achten und zum anderen auf einen ausreichenden Rohfaseranteil (Owens *et al.*, 1998). Die Raufasern im Futter führen zu vermehrten Kaubewegungen während des Fressens und die Speichelproduktion wird dabei angeregt. Somit wird mehr Speichel, also mehr Bikarbonat und Phosphat in den Pansen befördert. Wie bereits erwähnt, haben diese Substanzen besonders wichtige puffernde Eigenschaften. Neben einer ausreichenden Anreicherung des Futters mit Rohfasern muss ebenfalls eine ausreichend lange Adaptationsphase eingehalten werden, wenn Tiere auf ein energiereicheres Futter umgestellt werden. Bei Betrachtung des Pansenepithels nach erfolgter Adaptation zeigen sich dabei rein morphologische Veränderungen (Gäbel *et al.*, 1987a). Auch die Transporteigenschaften des Epithels verändern sich (Gäbel *et al.*, 1991a). Diese Veränderungen bewirken, dass entsprechend höhere Mengen an kurzkettigen Fettsäuren durch das Epithel hindurch ins Blut transportiert werden können, ohne dass es zur Schädigung des Epithels kommt. Gleichzeitig müssen auch große Mengen an Kationen resorbiert werden, um das osmotische Gleichgewicht wiederherzustellen. Eine einfache Entfernung der Osmolyte über passive Diffusionsprozesse erscheint nicht wahrscheinlich; erforderlich sind vielmehr engmaschig kontrollierte, hocheffiziente Transportmechanismen.

2.9 Transepithelialer Transport

Epithelgewebe schützen einerseits den Organismus vor äußerlichen schädlichen Umwelteinflüssen und ermöglichen andererseits den Stoffaustausch mit der Umwelt. Durch das Epithel hindurch können verschiedene Stoffe wie Wasser, CO₂ und Ionen transportiert werden. Der Stofftransport durch Epithelien kann grundsätzlich in beiden Richtungen erfolgen. Da Epithelgewebe geschlossene Zellverbände sind, gibt es für ein Ion zwei verschiedene Wege, um durch ein Epithel zu gelangen: transzellulär durch die Epithelzellen und/oder parazellulär durch die Schlussleisten (Tight Junctions) zwischen den Zellen.

2.9.1 Parazellulär

Dieser passive Transport über den Interzellularraum wird durch spezielle Tight Junctions der *zonula occludens* ermöglicht. Das Ion muss hier den Widerstand der Tight Junction überwinden. Somit erfolgt die Passage von Wasser und Elektrolyten durch diesen Weg mittels einfacher Diffusion. Sowohl der osmotische Gradient, als auch das transepitheliale Potential dienen dabei als Triebkräfte (elektrochemischer Gradient; s. u.). Dieser Passageweg wird auch als „shunt“ bezeichnet und überwiegt in durchlässigen (leaky) Epithelien (Powell, 1981).

2.9.2 Transzellulär

Der transzelluläre Passageweg besitzt Barrieren, die apikale und die basolaterale Zellmembran. Bei mehrschichtigen Epithelien wie dem des Pansens können zwischen diesen beiden funktionellen Barrieren mehrere Schichten von miteinander durch gap junctions verbundener Zellen liegen, die insgesamt ein funktionelles Syncytium bilden. Der transzelluläre Transportweg hat vor allem in mäßig dichten (moderate tight) oder dichten (tight) Epithelien Bedeutung. Dabei muss das Ion zunächst die äußere (apikale, mukosale, luminale) Seite des Epithels passieren, um dann anschließend über die innere (basolaterale, serosale, interstitielle) Seite wieder hinausgeschleust zu werden. Hier müssen zwei Widerstände passiert werden. Für die Überwindung dieser Widerstände gibt es wiederum verschiedene Möglichkeiten:

2.9.2.1 Diffusion

Die Diffusion ist ein spontaner und passiver Vorgang, bei dem eine Substanz aus einem Bereich hoher Konzentration in einen Bereich mit niedriger Konzentration gelangt. Hierdurch wird letztendlich der Konzentrationsunterschied zwischen beiden Regionen aufgehoben. Damit eine bestimmte Substanz eine Membran passieren kann, muss die Membran für

diesen bestimmten Stoff permeabel sein. CO_2 zum Beispiel ist ein ungeladenes Molekül und kann daher nach klassischen Modellvorstellungen durch einfache Lipiddiffusion ohne die Hilfe eines Transportproteins durch die Zellmembran permeieren.

2.9.2.2 Elektrochemischer Gradient

Durch einen Konzentrations- und/oder Ladungsunterschied, dem sogenannten elektrochemischen Gradienten, kommt es durch die ungeordnete Bewegung der Einzelteilchen zum Ladungs- bzw. Konzentrationsausgleich auf beiden Seiten der Zellmembran. Da Ionen geladene Teilchen sind, und nicht einfach durch die Lipiddoppelschicht der Zellmembran diffundieren können, gibt es spezielle Proteine, die als Ionenkanäle bezeichnet werden und die eine Pore in der Zellmembran bilden, durch die die Ionen permeieren können. Die Ionenkanäle ermöglichen den gerichteten Ionentransport von z. B. extra- nach intrazellulär.

2.9.2.3 Aktiver Transport

Spezifische ATP-getriebene Transporter wie z. B. die Na^+/K^+ -ATPase in der Zellmembran dienen der Zelle dazu, Ionen aktiv entgegen eines Gradienten in die Zelle hinein oder aus der Zelle heraus zu schleusen.

2.9.2.4 Sekundär aktiver Transport

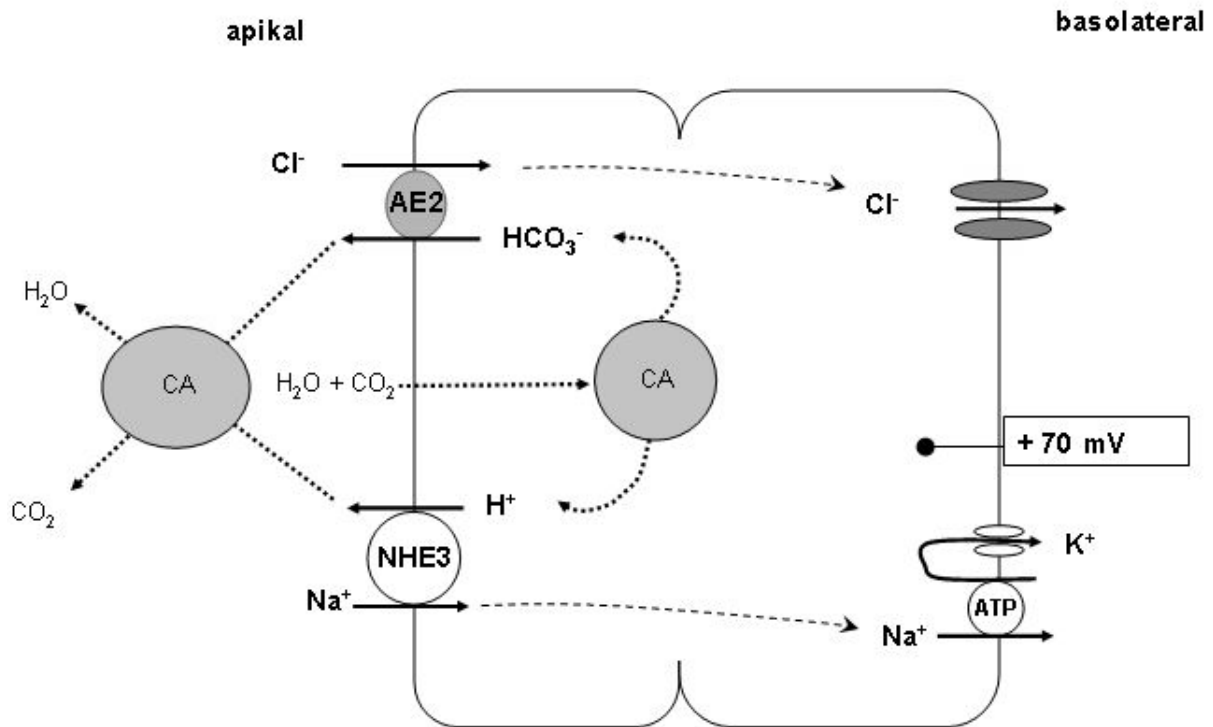
Beim sekundär aktiven Transport stammt die Energie für den Transport der Substanz aus einem elektrochemischen Konzentrationsgradienten, der von einem primär-aktiven Transportvorgang aufgebaut wird. Der sekundär-aktive Transport wird durch aktive Carrier wie z. B. dem Na^+/H^+ -Austauscher (NHE, Na^+/H^+ -Exchanger) und dem $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Austauscher vermittelt (Karp, 1996).

2.10 Resorption von Natrium und Chlorid: Modell des resorbierenden Epithels

Während der Transport von kurzkettigen Fettsäuren über Epithelien noch zahlreiche Fragen aufwirft, die kontrovers diskutiert werden, konnten die Grundzüge für die Resorption von Natrium und Chlorid mittlerweile in zufriedenstellender Weise geklärt werden. Das in Abbildung 5 aufgeführte Modell kann als klassisch bezeichnet werden. Es ist geeignet, die Resorption beider Ionen über zahlreiche resorbierende Epithelien wie z. B. den Epithelien des Dickdarms, der Gallenblase und des Pansens zu erklären.

Postuliert wird zunächst der diffusive Influx von CO_2 , angetrieben durch den erheblichen Konzentrationsgradienten zwischen Pansenlumen ($p\text{CO}_2 \sim 0,7 \text{ atm}$) und Zytosol. Nur ein Teil des aufgenommenen CO_2 passiert die basolaterale Membran, da bei neutralem pH-Wert des Zytosols die Hälfte des aufgenommenen CO_2 zu HCO_3^- und H^+ dissoziiert (Berechnung: siehe Kohn 1998). Das Zytosol wird durch die freigesetzten Protonen angesäuert. Zur Entfernung dieser Protonen dient der Na^+/H^+ -Austauscher, der gleichzeitig den Gradienten hineinströmenden Natriums ausnutzt, um Protonen nach apikal hin zu entfernen. Dadurch kommt es zunächst zu einer Ansäuerung der luminalen Seite des Epithels. Eine zu starke Ansäuerung wird durch Sekretion von Bikarbonat verhindert. Unter Aufnahme von Chlorid ins Epithel wird Bikarbonat durch einen apikalen Anionenaustauscher ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$) sezerniert. Schließlich kommt es im Lumen erneut zur Bildung von CO_2 aus den sezernierten H^+ und HCO_3^- Ionen; ein Prozess, der durch die Einwirkung der Carboanhydrase beschleunigt werden kann.

Basolateral erfolgt die Natriumausschleusung aktiv entgegen dem Konzentrationsgradienten über die Na^+/K^+ -ATPase. An klassischen absorbierenden Epithelien wird Kalium dabei basolateral resorbiert. Es findet also ein Nettotransport von Natrium über die basolaterale Membran statt, mit entsprechendem Stromfluss vom Zytosol nach basolateral. Um einen kontinuierlichen Transport zu gewährleisten, muss ein Ladungsausgleich stattfinden. Chlorid kann basolateral also nicht elektroneutral herausgeschleust werden (z.B. über einen zweiten Anionenaustauscher). Der Efflux muss elektrogen erfolgen. Im klassischen Transportmodell des absorbierenden Epithels - wie es z.B. am Colon ganz zweifelsfrei etabliert ist - erfolgt dies über einen basolateralen Chloridkanal. Durch den elektrogenen Efflux wird gewährleistet, dass die Ladungspartität beim Influx und Efflux erhalten bleibt.

**Abbildung 5**

Schematische Darstellung des klassischen Modells der elektroneutralen NaCl Resorption bei absorbierenden Epithelien. AE: Anion-Exchanger, NHE: Na⁺/H⁺ Exchanger, CA: Carboanhydrase

Auch für das Pansenepithel gilt für den Transport von Natrium und Chlorid dieses klassische Transportmodell. Chien und Stevens konnten 1972 durch Substitutionsversuche zeigen, dass ein indirekt gekoppelter Transport zwischen dem Natrium- und dem Chloridtransport besteht (Chien und Stevens, 1972). Bei einer Reduktion von Natrium in der Inkubationslösung verminderte sich die Chloridaufnahme und umgekehrt. Die Transportraten beider Ionen stiegen bei Begasung mit CO₂. Eine Hemmung der epithelialen Carboanhydrase am isolierten Pansenepithel des Schafes durch Zugabe von Azetazolamid führte ebenfalls zur Hemmung des Chloridtransportes (Emanovic *et al.*, 1976). Die Gabe von Amilorid zur Hemmung des NHE reduzierte den Natriumtransport über das Pansenepithel deutlich (Martens und Gabel, 1988; Martens *et al.*, 1991).

Der Efflux von Natrium erfolgt in klassischer Weise wie bei allen vertebraten Epithelien durch die Na⁺/K⁺-ATPase (Harrison, 1971). Durch *in vitro* und *in vivo* Versuche konnte dabei gezeigt werden, dass das Kaliumion auf der basolateralen Seite wieder recycelt wird (Ferreira *et al.*, 1972; Harrison *et al.*, 1975; Leonhard-Marek und Martens, 1996). Die Kaliumsekretion des Epithels ist hingegen minimal.

Ein elektrogener Efflux von Chlorid durch einen basolateralen Chloridkanal wurde schon vor Jahren postuliert (Sehested *et al.*, 1999b), und ist, wie bereits oben erläutert, wichtig für den Ausgleich der mit Natrium austretenden Ladungsmenge. Entsprechende Kanäle konnten zunächst in Patch-Clamp Messungen an isolierten Zellen nachgewiesen werden, wobei gleichzeitig ablaufende transportphysiologische Untersuchungen mit Messung von Natrium und Chloridfluxen eine basolaterale Lokalisation vermuten ließen (Abdoun *et al.*, 2005). Untersuchungen mit Mikroelektroden am Pansenepithel von Schafen folgten; es konnte eine Depolarisation der Membran nach Erhöhung der luminalen Chloridkonzentration gezeigt werden. Diese Messungen erhärteten die Hypothese einer basolateralen Lokalisation des Chloridkanals (Leonhard-Marek *et al.*, 2006).

Insgesamt kann kaum bezweifelt werden, dass die elektroneutrale Resorption von Natriumchlorid am Pansen dem klassischen Modell des resorbierenden Epithels folgt. Dieses bedeutet, dass Natrium apikal elektroneutral über den Na^+/H^+ -Austauscher (NHE) aufgenommen wird. Basolateral wird es über die Ladung gekoppelt mittels der Na^+/K^+ -ATPase und eines Chloridkanals ausgeschleust.

2.11 Transportmechanismen für die Aufnahme kurzkettiger Fettsäuren am Vormagenepithel

Das Pansenepithel war das erste Gewebe, an dem der transepitheliale Transport der kurzkettigen Fettsäuren nachgewiesen wurde (Phillipson, AT und McAnnally, 1942; Phillipson, A. T., 1949; Masson und Phillipson, 1951; Sellin, 1999). Trotz der enormen Bedeutung eines effektiven Absorptionsmechanismus für die Resorption kurzkettiger Fettsäuren aus dem Pansen und dem Colon ist das Wissen über die zugrundeliegenden Transportmechanismen erstaunlicherweise unvollständig. Insbesondere die basolaterale Ausschleusung wurde bislang wenig untersucht (Sellin, 1999; Binder, 2010) und es besteht bisher weder am Colon noch am Pansen ein wirklich etabliertes Modell.

2.11.1 Parazelluläre Resorption

Die parazelluläre Resorption spielt für den Transport der kurzkettigen Fettsäuren nur eine untergeordnete Rolle. Durch Veränderung des elektrischen Gradienten müsste eine Veränderung beim Transport kurzkettiger Fettsäuren erkennbar sein; dieses war jedoch nicht der Fall (Stevens und Stettler, 1966a; Sehested *et al.*, 1999a).

Auch der solvent drag (mitreißen gelöster Stoffe beim Wassertransport) spielt beim Pansenepithel keine große Rolle (Gäbel *et al.*, 1987b). Am Colonepithel verschiedener

Spezies konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Erhöhung des elektrischen Gradienten die Resorption der kurzkettigen Fettsäuren nicht beeinflusst (Jackson, 1974; von Engelhardt und Rechkemmer, 1992). Diese Ergebnisse sprechen gegen einen parazellulären Resorptionsweg.

Hingegen gibt es Hinweise auf eine gewisse aktive transzelluläre Transportkomponente. So konnten Stevens und Stettler (Stevens und Stettler, 1966a) sowie Sehested (Sehested et al., 199a) trotz Ausschaltung des transepithelialen elektrochemischen Gradienten einen Transport kurzkettiger Fettsäuren am Pansenepithel von Kühen beobachten. Am Psalter des Schafes fand man bisher keine aktive Transportkomponente für die Aufnahme von Azetat (Ali et al., 2006).

2.11.2 Transzelluläre Resorption

2.11.2.1 Apikale Aufnahme der protonierten, undissoziierten Form der kurzkettigen Fettsäuren (HSCFA)

Die protonierte, undissoziierte Form der kurzkettigen Fettsäuren (HSCFA) ist stark lipophil und kann deshalb einfach durch die Lipiddoppelschicht der Zellmembran diffundieren (Leo et al., 1971; Walter et al., 1982; Walter und Gutknecht, 1986). Als Triebkraft fungiert der chemische Gradient. Die Konzentration der kurzkettigen Fettsäuren im Pansen liegt normalerweise zwischen 60 - 150 mmol · l⁻¹ (Gäbel, 1988; Bergman, 1990). Im portalen Blut werden Konzentrationen von ca. einem 1/20 – 1/100 der luminalen Konzentrationen gemessen (Masson und Phillipson, 1951; Annison et al., 1957; Reynolds, P. J. und Huntington, 1988). Somit richtet sich der chemische Gradient in vivo in Richtung Blutseite.

Die Permeabilität für kurzkettige Fettsäuren über Lipiddoppelschichten ist groß (> 10⁻³ cm · s⁻¹). Als limitierender Faktor für den Diffusionsprozess durch die Zellmembran gilt die anliegende, unverrührte Wasserschicht (Walter et al., 1982). Da die für Transportprozesse zur Verfügung stehende Epitheloberfläche sehr groß ist, sind nur kleinste Mengen protonierter, undissoziierter kurzkettiger Fettsäuren (HSCFA) nötig um den Transport aufrechtzuerhalten. Für einen unspezifischen Aufnahmemechanismus für kurzkettige Fettsäuren durch Lipiddiffusion spricht nicht nur die hohe Permeabilität synthetischer Lipidmembranen, sondern auch die Tatsache, dass verschiedenste Zellspezies über eine ausgeprägte Fähigkeit verfügen, kurzkettige Fettsäuren zu resorbieren. So werden neben Zellen des Gastrointestinaltraktes wie z.B. isolierten Pansenepithelzellen (Bilk, 2008) auch Schneckenneurone (Szatkowski und Thomas, 1989), ziliare Epithelzellen des Auges (Helbig et al., 1989) und Zellen des proximalen Tubulus der Niere (Nakhoul et al., 1988)

bereits durch geringste Mengen kurzkettiger Fettsäuren angesäuert, obschon eine spezifische Expression fettsäuretransportierender Proteine hier nicht zu erwarten wäre.

Klassisch wurde die lipophile Diffusion nach dem Ausschluss des parazellulären Weges als einziger Aufnahmemechanismus für die kurzkettigen Fettsäuren gesehen (Masson und Phillipson, 1951; Annison *et al.*, 1957; Stevens und Stettler, 1966a; Stevens und Stettler, 1966b; Bugaut, 1987; Reynolds, P. J. und Huntington, 1988; Kolb, 1989; Bergman, 1990). Wie weiter oben diskutiert, gibt es jedoch deutliche Hinweise dafür, dass insbesondere für Azetat weitere Aufnahmemechanismen vorliegen müssen. Generell kommen verschiedene Transportproteine in Frage, die im Folgenden besprochen werden.

2.11.2.2 Apikale Aufnahme der kurzkettigen Fettsäureanionen (SCFA)

2.11.2.2.1 Monocarboxylat-Transporter (MCT)

Monocarboxylat-Transporter haben eine große Transportkapazität für große Anionen, und gelten allgemein als verantwortlich für den Transport von Laktat am Myokard. Ein Vertreter der Gruppe, MCT4, scheint von Zellen des *stratum corneum* und des *stratum granulosum* der Ziege exprimiert zu werden (Kirat *et al.*, 2007). Allerdings gibt es keine funktionellen Daten, die diese These beim Schaf unterstützen (Aschenbach *et al.*, 2009). Gegen eine funktionelle Expression am Pansen *in vivo* spricht auch die Tatsache, dass *in vivo* und *in vitro* am Vormagenepithel nur sehr geringe Laktattransportraten gemessen werden, wodurch es klinisch zur Laktatakkumulation bei der Laktatazidose des Pansens kommen kann. Somit dürfte ein apikaler MCT nur eine sehr untergeordnete Rolle beim Transport kurzkettiger Fettsäuren spielen. Die MCT-Inhibitoren pCMB (Parachloromercuribenzoat), pHMB (Parahydroxymercuribenzoat) und Phloretin hatten keinen Effekt auf den apikalen Azetattransport am Pansenepithel von Schafen (Aschenbach *et al.*, 2009). Insgesamt erscheint es wenig wahrscheinlich, dass Transporter dieser Gruppe eine Rolle bei der Resorption von Fettsäuren aus den Vormägen spielen.

2.11.2.2.2 Der Chlorid-Bikarbonat Austauscher ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Anionexchanger)

Der apikale Anionenaustauscher wurde bereits im Rahmen der elektroneutralen Resorption von Natrium und Chlorid weiter oben besprochen. *In vitro* belegen zahlreiche Daten die Aufnahme von Chlorid im Austausch für Bikarbonat durch diesen Transporter und entsprechende Proteine wurden molekularbiologisch nachgewiesen (Aschenbach *et al.*, 2009). Allerdings ist die apikale Konzentration von Chlorid *in vivo* gering und die Resorption von Chlorid dürfte funktionell keine wesentliche Rolle an den Epithelien der Vormägen spielen; ähnliches gilt für das Colon. Es stellt sich die Frage nach der physiologischen Bedeutung dieses Transporters am Pansen.

Es gibt zahlreiche Hinweise dafür, dass der apikale Anionenaustauscher – so wie Anionentransportproteine im allgemein (Wright und Diamond, 1977) – recht wenig selektiv ist. So kann bei Vorliegen eines geeigneten Gradienten die Transportrichtung umgekehrt werden, wobei Chlorid aus dem Epithel herausgepumpt und Bikarbonat aufgenommen wird. Die apikale Bindungsstelle akzeptiert als Substrat offenbar auch HCO_3^- anstelle von Cl^- , trotz des sehr unterschiedlichen Ionenradius der beiden Anionenspezies (Ali *et al.*, 2006; Aschenbach *et al.*, 2009). Es erscheint daher plausibel, dass insbesondere die kurzkettige Fettsäure Azetat und in geringerem Umfang auch Propionat als Substrat für den Anionenaustauscher in Frage kommen.

Ein direkter Zusammenhang zwischen ruminaler Bikarbonatsekretion und Absorption kurzkettiger Fettsäuren wurde schon lange vermutet (Ash und Dobson, 1963), konnte aber erstmals von Gäbel 1991 *in vivo* am gewaschenen Pansen von Schafen nachgewiesen werden (Gäbel *et al.*, 1991a). Mittlerweile gilt eine Beteiligung des apikalen Anionenaustauschers an der Aufnahme von Fettsäuren sowohl am Colon (Binder, 2010) als auch am Pansen (Gäbel *et al.*, 1991a; Kramer *et al.*, 1996; Gäbel *et al.*, 2002; Aschenbach *et al.*, 2009) als etabliert.

Dementsprechend scheint die Resorption kurzkettiger Fettsäuren durch Variation der Chloridkonzentration beeinflusst zu werden (Kramer *et al.*, 1996). In Ussingkammer-Versuchen kam es bei steigender mukosaler Chloridkonzentration zu einem signifikanten Abfall des ms-Flux (muko-serosaler Flux) von Propionat. Dies deutete darauf hin, dass kurzkettige Fettsäureanionen und Chloridionen entweder um Bindungsstellen an einem Anionenaustauscher oder um das intrazellulär vorhandene Bikarbonat konkurrieren. Ebenfalls nachweisbar ist die Hemmung der Resorption kurzkettiger Fettsäuren durch Nitrat und in geringem Umfang durch DIDS am Pansen (Würmli *et al.*, 1987; Kramer *et al.*, 1996). Nitrat erzeugte auch an anderen Epithelien eine kompetitive Hemmung von $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschern (Seifter und Aronson, 1984; Meier *et al.*, 1985). Gleichfalls konnte gezeigt werden, dass die steigernde Wirkung einer pH-Wert-Senkung auf den Azetattransport nur teilweise direkt auf den pH-Wert zurückzuführen ist, sondern auch wesentlich von der damit zusammenhängenden Senkung der luminalen Bikarbonatkonzentration herrührt (Aschenbach *et al.*, 2009). Diese Ergebnisse erhärten die mögliche Existenz eines $\text{SCFA}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers.

Insgesamt zeigt sich, dass für die apikale Aufnahme der kurzkettigen Fettsäuren am Pansen zwar die Diffusion der undissoziierten Säure eine große Rolle spielt, dass aber auch der

apikale Anionenaustauscher kurzkettige Fettsäureanionen akzeptiert. Dabei kommt es in beiden Fällen zu einer Ansäuerung des Epithels. Bei Aufnahme durch Diffusion der protonierten kurzkettigen Fettsäure ins Epithel kommt es zur sofortigen Dissoziation in Fettsäureanion und H^+ , da der pK-Wert der kurzkettigen Fettsäuren nur bei $\sim 4,8$ und somit weit niedriger als der neutrale zytosolische pH-Wert liegt. Der Anionenaustauscher entzieht dem Zytosol HCO_3^- , welches durch Zerfall von CO_2 nachgebildet wird, wobei ebenfalls ein Proton freigesetzt wird.

2.11.2.2.3 Der Natrium-Protonen-Austauscher (Na^+/H^+ -Exchanger, NHE)

Wie nach der bereits besprochenen zytosolischen Ansäuerung durch CO_2 verlassen die durch die Aufnahme von Fettsäuren freigesetzten Protonen die Zelle wieder über den apikalen Natrium-Protonen-Austauscher (Na^+/H^+ -Exchanger, NHE) (Gäbel *et al.*, 1991a; Martens *et al.*, 1991; Sehested *et al.*, 1996). So konnte in zahlreichen Versuchen eine starke Zunahme des Natriumtransportes nach Fettsäureexposition beobachtet werden. Weniger gut belegt ist hingegen die Beteiligung von vH^+ -ATPasen zur Protonenausschleusung (Schweigel und Martens, 2003; Etschmann *et al.*, 2006), die jedoch beim Zusammenbruch des NHE als regulatorische Mechanismen des pH-Wertes eine Rolle spielen dürften. Es kommt zu einem solchen Zusammenbruch, wenn der Pansen übersäuert wird oder wenn zu wenig Natrium im Pansenlumen vorhanden ist.

Die funktionelle, über den zytosolischen pH-Wert vermittelte Kopplung von Natrium und Fettsäuretransport konnte an zahlreichen Epithelien nachgewiesen werden, so z.B. am Pansenepithel von Rindern, Schafen und Rentieren (Danielli *et al.*, 1945; Gäbel *et al.*, 1991b; Sehested *et al.*, 1993; Storeheier *et al.*, 2003). Bei einer Netto-Betrachtung kommt es zum Einstrom von kurzkettigen Fettsäureanionen und Natrium ins Epithel; die Protonen werden dabei apikal rezirkuliert (Gäbel *et al.*, 1991a; Martens *et al.*, 1991; Sehested *et al.*, 1996) und müssen durch die im Speichel enthaltenen Anionen abgepuffert werden. Das elektroneutral über den NHE in die Pansenepithelzelle aufgenommene Natrium verlässt diese basolateral (blutwärts/in den Blutkreislauf) elektrogen über die Na^+/K^+ -ATPase unter Rezirkulation von Kalium (Harrison *et al.*, 1975; Leonhard-Marek *et al.*, 2006).

2.12 Zusammenfassung der apikalen Aufnahmemechanismen für kurzkettige Fettsäuren

Die apikale Aufnahme von kurzkettigen Fettsäuren erfolgt sowohl in undissoziiertem Zustand durch Diffusion, oder im Austausch mit Bikarbonat. Beide erläuterten Aufnahmemechanismen werden durch einen niedrigen pH-Wert im Pansenlumen stimuliert und führen zu einer intrazellulären Ansäuerung. Dies konnte sowohl an isolierten Pansenepithelzellen

(Bilk, 2008) als auch am intakten Epithel mittels pH-sensitiver Mikroelektroden gezeigt werden (Abdoun *et al.*, 2009). Die intrazelluläre Ansäuerung wird hauptsächlich durch die Ausschleusung von Protonen durch den NHE limitiert. Voraussetzung hierfür ist die reichliche Bereitstellung von Natrium und puffernden Anionen (HCO_3^- und HPO_4^{2-}) durch den Speichel. Andernfalls müssen die Protonen das Epithel überqueren und basolateral ausgeschleust werden. Die schweren Epithelschäden, die bei der Pansenazidose zu sehen sind, zeigen, dass die Aufnahmekapazität der Pansenepithelzellen für Protonen limitiert ist.

2.13 Intrazellulärer Metabolismus der kurzkettigen Fettsäuren in den Vormagenepithelzellen

Nach der Resorption der kurzkettigen Fettsäuren wird ein Teil von ihnen von den Pansenepithelzellen selbst metabolisiert und sie versorgen so das Epithel mit Energie (Masson und Phillipson, 1951; Weigand *et al.*, 1975; Goosen, 1976; Kristensen *et al.*, 1998). Dieses gilt insbesondere für Butyrat. Der größte Teil der apikal aufgenommenen kurzkettigen Fettsäuren Azetat und Propionat passiert jedoch das Pansenepithel, ohne dabei metabolisiert zu werden (Kiddle *et al.*, 1951; Gäbel *et al.*, 2002; Kristensen und Harmon, 2004), und wird auf der basolateralen Seite des Epithels wieder ausgeschleust. Von dort gelangen die kurzkettigen Fettsäuren über die *V. portae* in die Leber bzw. in periphere Gewebe und werden dort zur Energiegewinnung für den Gesamtorganismus verwandt (Britton und Krehbiel, 1993; Seal und Parker, 1994; Remond *et al.*, 1995; Kristensen *et al.*, 1998; Kristensen *et al.*, 2000b; Kristensen *et al.*, 2000c). Die Pansenepithelzellen selbst bevorzugen Butyrat als Energielieferant, selbst in Anwesenheit von Glukose (Baldwin und Jesse, 1992; Britton und Krehbiel, 1993; Remond *et al.*, 1995; Kristensen *et al.*, 2000b).

Der Umfang der Metabolisierung in den Pansenzellen ist je nach Autor unterschiedlich. Bergman und Wolf 1971 zeigten in ihren Versuchen, dass 30 % des resorbierten Azetats, 50 % des Propionats und 90 % des Butyrats in den Pansenepithelzellen verstoffwechselt werden. Hiermit lagen diese Autoren weit unterhalb der Werte von über 90 %, die zum damaligen Zeitpunkt für die Epithelien des Colons angegeben wurden. Peters gibt 1990 für Propionat eine Resorptionsrate von ca. 70 % an (Peters *et al.*, 1990). Bei visceral-portal-Versuchen gab Kristensen 2000 sogar eine Resorptionsrate von 85 – 90 % für Propionat an, während Azetat vollständig resorbiert wurde (Kristensen *et al.*, 2000b; Kristensen *et al.*, 2000c). *In vitro* Versuche hingegen ergaben eine Metabolisierungsrate von Buttersäure zu Ketonkörpern und Laktat von über 96 % (Weigand *et al.*, 1975); wiederum werden in neueren Arbeiten weit niedrigere Metabolisierungsraten angegeben (Sehested *et al.*, 1999a; Kristensen und Harmon, 2004). Alle Autoren konnten zeigen, dass Propionat und Butyrat in viel höherem Umfang metabolisiert werden als Azetat; obwohl dies die mengenmäßig

bedeutendere Fettsäure ist. (Masson und Phillipson, 1951; Weigand *et al.*, 1975; Goosen, 1976; Britton und Krehbiel, 1993; Remond *et al.*, 1995; Kristensen *et al.*, 1998; Sehested *et al.*, 1999a). Butyrat wird also hauptsächlich in den Pansenepithelzellen selbst verstoffwechselt und könnte somit den aktiven Transport anderer Elektrolyte unterstützen (Weigand *et al.*, 1975; Sehested *et al.*, 1999b; Kristensen *et al.*, 2000a; Gäbel und Aschenbach, 2006).

Kurzkettige Fettsäuren werden entweder durch oxidative oder anaerobe Wege abgebaut (Lehninger *et al.*, 2001), wobei zu betonen ist, dass es hierdurch offenbar nicht zu einer Reduktion der zusammen mit den Fettsäuren aufgenommenen Protonen kommt. Diese müssen vielmehr apikal über den NHE ausgeschleust werden. Zwar profitiert der gesamte Organismus von der intrazellulären Metabolisierung der kurzkettigen Fettsäuren, jedoch muss die Pansenepithelzelle mit den produzierten Metaboliten, hauptsächlich Azetat, Ketonkörpern (Acetoazetat und D-3-hydroxybutyrat), CO₂ und Laktat fertig werden. Die Ketonkörper müssen wieder aus der Zelle ausgeschleust werden, um die intrazelluläre Homeostase nicht zu gefährden. Dieses dürfte im Allgemeinen schwieriger sein, als der Export der kleineren Primärsubstrate. Die Ketonkörper können von Gehirnzellen, Kardiomyozyten, Nierenzellen und mukosalen Darmzellen als Energielieferanten genutzt werden (Robinson und Williamson, 1980; Heitmann *et al.*, 1987; Lehninger *et al.*, 2001; Morris, 2005).

Daten neuester Untersuchungen bestätigen die ursprünglich aufgestellte Hypothese, wonach die Metabolisierungsrate mit zunehmender Kettenlänge der kurzkettigen Fettsäuren zunimmt (Kiddle *et al.*, 1951; Kristensen und Harmon, 2004) und vom Umfang her gering gegenüber der ins Portalblut übertretenden Menge ist. Diese Erkenntnis dürfte auch nicht verwundern, da die Fettsäuren die Hauptenergiequelle des Wiederkäuers darstellen und somit nicht überwiegend vom Epithel selbst verstoffwechselt werden können. Aber auch am Colon des Monogastriers werden heute wesentlich höhere Passageraten für kurzkettige Fettsäuren postuliert (Neves Jde *et al.*, 2006; Uchida *et al.*, 2007).

Historisch betrachtet dürfte die sich zeitweise zeigende Präferenz für sehr hohe Metabolisierungsraten darin begründet sein, dass es an passenden Modellen für den basolateralen Transport dieser Substrate aus den Epithelien fehlte. Vermutlich war schon früh klar, dass ein simples Zellmodell, bei dem der Transport kurzkettiger Fettsäuren allein durch Lipiddiffusion vonstatten geht, zu einer sehr hohen Akkumulation größerer Mengen von kurzkettigen Fettsäureanionen im Zytosol der Epithelzellen führen dürfte (Roos, 1975; Stumpff *et al.*, 2009). Ein basolateraler Efflux der kurzkettigen Fettsäureanionen durch entsprechende Transportproteine wird hingegen erst seit wenigen Jahren diskutiert (Müller *et*

al., 2002; Stumpff *et al.*, 2009).

2.14 Mechanismen für die basolaterale Ausschleusung der kurzkettigen Fettsäuren

Da nur ein Teil der kurzkettigen Fettsäuren durch die Pansenepithelzellen selbst metabolisiert wird, muss der größte Teil auf der basolateralen Seite wieder ausgeschleust werden. Er wird zur Deckung des Energiebedarfs des Wiederkäuers benötigt. Die Frage, wie die kurzkettigen Fettsäureanionen basolateral das Zytosol verlassen, ist noch nicht abschließend geklärt. Für den Pansen gibt es bisher wenige Untersuchungen, die sich auf die basolaterale Seite des Pansenepithels konzentrieren; auch hier wird mittlerweile ein proteinvermittelter Transport vermutet.

2.14.1 Basolaterale Ausschleusung der protonierten, undissoziierten kurzkettigen Fettsäuren (HSCFA)

In einem klassischen Zellmodell wäre es denkbar, dass die kurzkettigen Fettsäuren in der protonierten, undissoziierten Form (HSCFA) zusammen mit einem Proton über einfache Lipiddiffusion die basolaterale Membran des Pansenepithels verlassen. Die Zellhomeostase kann jedoch nur dann aufrecht erhalten werden, wenn bei dem transzellulären Transport der kurzkettigen Fettsäuren der intrazelluläre pH-Wert und das Zellvolumen konstant bleiben. Nur so kann eine Zerstörung des Pansenepithels verhindert werden. Ein simples Zellmodell, bei dem der Transport kurzkettiger Fettsäuren allein durch Lipiddiffusion vonstatten geht, würde zu einer Akkumulation größerer Mengen Protonen und kurzkettiger Fettsäureanionen im Zytosol der Pansenepithelzellen und somit zu deren Zerstörung führen (Roos, 1975; Stumpff *et al.*, 2009).

2.14.2 Basolaterale Ausschleusung der kurzkettigen Fettsäureanionen

2.14.2.1 Basolateraler Anionenaustausch

Denkbar wäre, dass die kurzkettigen Fettsäureanionen auch basolateral wie in der apikalen Membran über einen SCFA⁻/HCO₃⁻-Anionenaustauscher ausgeschleust werden. Dieses wird für das Colon postuliert; die Datenlage darf jedoch als eher dürftig bezeichnet werden (Sellin, 1999; Binder, 2010). Die hohe intrazelluläre Konzentration kurzkettiger Fettsäuren hält hierbei den Konzentrationsgradienten zur serosalen Seite aufrecht. Allerdings dürften auch die intrazelluläre Bikarbonatkonzentration wegen der hohen mukosalen CO₂-Konzentration höher als die des Plasmas von 25 mmol·l⁻¹ sein. Eine sehr hohe Akkumulation kurzkettiger Fettsäuren wäre also nötig, um deren Efflux durch diesen Mechanismus zu ermöglichen. Auch fehlt bei Annahme dieses Modells ein Konteranion für den basolateralen Efflux von dem mit den kurzkettigen Fettsäuren aufgenommenen Natrium.

2.14.2.2 Der Monocarboxylat-Transporter 1

Ein Protein welches den basolateralen Efflux großer Anionen und deren Abbauprodukte ermöglichen könnte, ist der Monocarboxylat-Transporter 1 (MCT1). Immunhistochemische Färbungen der Plasmamembran von Zellen des *stratum basale* des intakten Epithels sind positiv für den MCT 1 (Müller *et al.*, 2002; Kirat *et al.*, 2006; Graham *et al.*, 2007).

Der MCT1 ist zwar in der Lage, Ketonkörper und Protonen basolateral auszuschleusen, allerdings handelt es sich beim Efflux durch den MCT um einen passiven Transportweg. Die Energie für den Efflux muss also aus der Anreicherung von Fettsäureanionen und Protonen im Epithel stammen; beides dürfte für die Zellen des Epithels schädlich sein. Zudem ist der Mechanismus sättigbar. Weiterhin und wie bereits weiter oben dargestellt, belegen zahlreiche Untersuchungen, dass die mit den kurzkettigen Fettsäuren aufgenommenen Protonen apikal unter Aufnahme von Natrium durch den NHE ausgeschleust werden (Gäbel *et al.*, 1991a; Martens *et al.*, 1991; Sehested *et al.*, 1996). Somit fehlen im Zytosol Protonen für den Efflux über den MCT; und es steht stattdessen Natrium bereit, welches für den Efflux ein begleitendes Anion benötigt.

2.14.2.3 Der basolaterale Anionenkanal

In zahlreichen *in vitro* Versuchen zur Untersuchung des Natrium- und Chloridtransports durch das Pansenepithel wurden parallel die Fluxe für Natrium und Chlorid gemessen (Gäbel *et al.*, 1991b; Diernaes *et al.*, 1994; Sehested *et al.*, 1996; Abdoun *et al.*, 2005). Es zeigte

sich, dass es beim Anstieg der mukosalen Konzentration kurzkettiger Fettsäuren zum Anstieg der Fluxraten beider Ionensorten kam. Allerdings war der Anstieg der Natriumresorptionsraten stets deutlich höher als der Anstieg der Chloridresorptionsrate; auch durch eine Berücksichtigung des Anteils von Natrium, das über elektrogene Mechanismen aufgenommen wird und somit einen Strom über das Epithel erzeugt, kann dieser Unterschied nicht erklärt werden (Diernaes *et al.*, 1994). Eine mögliche Erklärung für diesen „Residualflux“ (Diernaes *et al.*, 1994) wäre, dass die kurzkettigen Fettsäureanionen als Coanionen den basolateralen Natriumefflux ermöglichen, indem sie durch einen basolateralen Anionenkanal das Epithel elektrogen verlassen (Stumpff *et al.*, 2009).

Wie bereits diskutiert, ist der an isolierten Pansenepithelzellen identifizierte Anionenkanal basolateral lokalisiert und notwendig, um die elektroneutrale Resorption von Natrium und Chlorid zu ermöglichen. Da beide Ionen durch entsprechende elektroneutrale Mechanismen aufgenommen werden (NHE und Anionenaustauscher), Natrium das Epithel jedoch elektrogen verlässt (durch die Na^+/K^+ -ATPase unter Rezirkulation von Kalium), erfordert der Ladungsausgleich einen ebenfalls elektrogenen Efflux von Chlorid durch einen entsprechenden Anionenkanal (Sehested *et al.*, 1996; Abdoun *et al.*, 2005; Leonhard-Marek *et al.*, 2006). Dieses Model ist an sämtlichen absorbierenden Epithelien des Gastrointestinaltraktes gut etabliert und kann kaum bezweifelt werden (Schmidt *et al.*, 2004). Ebenfalls unumstritten ist die Tatsache, dass kurzkettige Fettsäuren die apikale elektroneutrale Aufnahme von Natrium durch den NHE der Vormägen fördern. Der basolaterale Efflux der kurzkettigen Fettsäuren muss also in Analogie zur elektroneutralen Resorption von Chlorid zwingend in einem elektrogenen Prozess erfolgen.

Am einfachsten ist die Hypothese, dass die kurzkettigen Fettsäuren den gleichen basolateralen, hochleitenden Anionenkanal permeieren, wie Chlorid. Die Permeabilität dieses Kanals für Azetat konnte bereits gezeigt werden (Stumpff *et al.*, 2009). Da dieser Kanal auch gut durch pCMB blockiert werden kann, das bei basolateraler Gabe die Fettsäureresorption durch den Pansen *in vivo* blockieren soll (Kirat *et al.*, 2006), spricht insgesamt einiges für den basolateralen Efflux von Azetat durch diesen Kanal. Insgesamt gleicht das vorgeschlagene Transportmodel für Azetat (Aschenbach *et al.*, 2009; Stumpff *et al.*, 2009) eng dem bereits für die Resorption von Natriumchlorid etablierten Modell am Pansen (siehe Abbildung 6). Allerdings treten die Anionen der kurzkettigen Fettsäure an die Stelle des im Pansen nur in geringen Mengen vorhandenen Chlorids. Apikal werden Natrium und kurzkettige Fettsäureanionen über elektroneutrale Mechanismen funktionell über den pH_i gekoppelt aufgenommen.

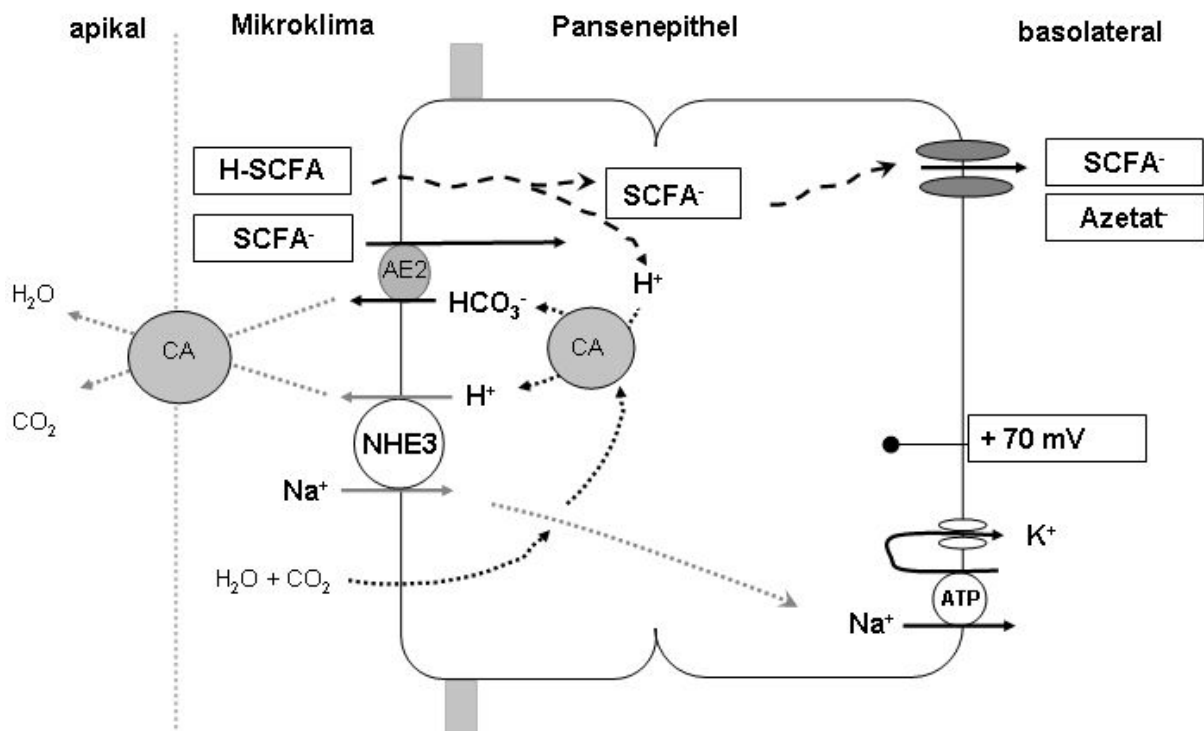


Abbildung 6

Modell des Transportmechanismus der kurzkettigen Fettsäuren (HSCFA) und deren Anionen (SCFA⁻) am Pansenepithel. AE: Anion-Exchanger, NHE: Na⁺/H⁺-Exchanger, CA: Carboanhydrase

Der basolaterale positive elektrische Gradient von ca. +70 mV, aufrechterhalten durch den Efflux von Natrium durch die Na⁺/K⁺-ATPase, wird genutzt, um die kurzkettigen Fettsäureanionen aus der Pansenepithelzelle herauszuschleusen. Der Transport kurzkettiger Fettsäuren durch die Pansenepithelzelle hindurch würde so deutlich vereinfacht werden ohne dabei den intrazellulären pH-Wert und die Zellvolumenregulation zu gefährden. Sekundär aktiv an den aktiven Efflux von Natrium durch die basolaterale Pumpe gekoppelt, erklärt das Modell die parallele Aufnahme von Natrium und Fettsäureanionen; die Protonen verbleiben überwiegend im Lumen und müssen dort durch die im Speichel enthaltenen Puffer neutralisiert werden. Bei unzureichendem Influx von Speichel kommt jedoch auch eine Kopplung des Anionenkanals an basolaterale pH-Wert regulierende Transporter wie den NHE1 oder den NaHCO₃⁻-Cotransporter in Frage.

Vor Kurzem konnte an isolierten Zellen des Pansenepithels die Expression von Kanälen, die für das Anion des Azetats permeabel sind, nachgewiesen werden (Stumpff *et al.*, 2009). Da neben Azetat auch Propionat in großen Mengen die basolaterale Membran des Pansens permeiert und ins Blut aufgenommen wird, stellte sich zu Beginn dieser Untersuchung die

Frage nach der Permeabilität des Anionenkanals für die Anionen des Propionats. Der Klärung dieser Fragestellung galt diese Untersuchung.

2.15 Zusammenfassung für die eigene Fragestellung

Die mikrobielle Zersetzung von mit der Nahrung aufgenommenen Kohlenhydraten führt zur Ansammlung kurzkettiger Fettsäuren im Pansen der Wiederkäuer. Der ungestörte Stoffwechsel kurzkettiger Fettsäuren ist für die Gesundheit der Wiederkäuer und Leistungen wie der Milchproduktion von erheblicher Bedeutung. Die kurzkettigen Fettsäuren werden hauptsächlich im Pansen gebildet und vom Pansenepithel direkt resorbiert (Thorlacius und Lodge, 1973; Hauffe und Engelhardt, 1975; Peters *et al.*, 1992). Zur Versorgung des Wiederkäuers mit Energie besitzt das Pansenepithel eine außerordentlich hohe Aufnahmekapazität für kurzkettige Fettsäuren (Siciliano-Jones und Murphy, 1989; Bergman, 1990; Gäbel *et al.*, 2002).

Neben der klassischen Lipiddiffusion der protonierten, undissoziierten Form der kurzkettigen Fettsäuren, gibt es auch den proteinvermittelten Transport. Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* Studien zeigen, dass der $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher, der *in vitro* die Aufnahme von Chlorid vermittelt, *in vivo* vor Allem an der Aufnahme von kurzkettigen Fettsäureanionen beteiligt sein dürfte. Beide Aufnahmemechanismen finden elektroneutral statt und führen zur Protonenaufnahme in die Pansenepithelzelle. Diese Protonen werden über den NHE apikal im Austausch mit Na^+ wieder in das Pansenlumen ausgeschleust.

Große kurzkettige Fettsäureanionen wie z. B. Butyrat werden intrazellulär zu Ketonkörpern metabolisiert. Diese verlassen die Zelle basolateral vermutlich über den MCT1. Kurzkettige Fettsäureanionen kürzerer Kettenlänge werden hingegen kaum metabolisiert (Masson und Phillipson, 1951; Kristensen und Harmon, 2004) und verlassen das Epithel zusammen mit dem apikal aufgenommenen Natrium (Gäbel *et al.*, 1991a; Sehested *et al.*, 1996). Es spricht einiges dafür, dass dieser Efflux über den gleichen Anionenkanal erfolgt, der für den Efflux von Chlorid *in vivo* verantwortlich ist (Sehested *et al.*, 1996; Abdoun *et al.*, 2005; Leonhard-Marek *et al.*, 2006; Stumpff *et al.*, 2009).

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik an isolierten Pansen- und Pslterepithelzellen zu untersuchen, ob dieser Kanal ebenfalls für Propionat und möglicherweise auch für Butyrat permeabel ist. Da die Isolierung und Kultivierung von Pslterepithelzellen noch nicht etabliert war, wurde eine neue Methode zur Isolierung von Pslterepithelzellen entwickelt. Die in vorangegangenen Studien bereits gut etablierte Methode zur Isolierung von Pansenepithelzellen wurde verbessert. Die epitheliale Herkunft der aus beiden Geweben kultivierten Zellen wurde durch molekularbiologische Methoden gesichert

und es konnten dadurch gleichzeitig neue Erkenntnisse über die Expression von Tight Junction Proteinen an Pansen und Psalter gewonnen werden.

3 Material und Methoden

3.1 Überblick

Für die Charakterisierung des nicht selektiven Anionkanals wurden *in vitro* Versuche an Pansen- und Psalterepithelzellen durchgeführt. Hierfür wurden Epithelzellen aus dem Pansen und Psalter von frisch geschlachteten Schafen gewonnen und in Zellkulturen vermehrt. Um den epithelialen Ursprung der kultivierten Zellen nachzuweisen, wurden diese immunhistochemisch charakterisiert. Mit der Patch-Clamp-Technik wurden die Membranpotentiale und Ionenströme der Zellmembran und einzelner Kanalproteine gemessen.

3.2 Material

3.2.1 Verwendete Gewebe

Das Epithelgewebe für die Kultivierung von Pansen- und Psalterepithelzellen stammte von institutseigenen Schafen. Diese wurden für Versuchszwecke der Arbeitsgruppe Transportphysiologie erworben, wobei lediglich Versuche an nach dem Tode entnommenen Organen erfolgten. Die Tiere waren im Institutsstall untergebracht. Rasse, Geschlecht, Alter, Gewicht und Fütterung waren unterschiedlich.

3.3 Methoden

3.3.1 Gewinnung und Kultivierung der Panseneithelzellen

Die primären Panseneithelzellkulturen wurden modifiziert nach der Methode von Galfi (Galfi *et al.*) angelegt. (Für eine detaillierte Beschreibung siehe Anhang). Die Gewebestücke wurden von frisch geschlachteten Schafen gewonnen und gekühlt in das Labor transportiert.

Durch warme, fraktionierte Trypsinierung wurden die Primärzellen zur Kultivierung gewonnen. Die gewonnenen Zellen wurden mit dem Zellkulturmedium M1 (genaue Zusammensetzung siehe Anhang Tabelle 15) suspendiert und in kollagenisierte Zellkulturschalen ausgesät. Anschließend wurden die Zellen für 24 Stunden im Brutschrank bei 100 % Wasserdampfsättigung in einem Luft-CO₂ (5 %)-Gemisch bei 38 °C inkubiert. Nach 24 Stunden hatten sich bereits Panseneithelzellen am Boden der Zellkulturschalen angeheftet, wobei zu bemerken ist, dass nur Zellen aus dem *stratum basale* proliferieren. Das Zellkulturmedium M1 wurde nach 24 Stunden gegen das Zellkulturmedium M2 ausgetauscht. Die Zellen wurden alle 48 Stunden mit frischem Medium (M2) versorgt. Nach ca. 6 Tagen hatte sich ein Zellrasen ausgebildet und die Zellen wurden trypsiniert und auf Deckgläser ausgesät.

Die Deckgläser mit den darauf angewachsenen Zellen wurden ca. 20 Stunden nach dem Aussähen für die Patch-Clamp-Experimente entnommen. Nur Zellen ohne Verbindung zu anderen Zellen wurden im Patch-Clamp Experiment benutzt.

Die übrigen Zellkulturschalen wurden regelmäßig alle zwei bis drei Tage mit Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freier DPBS-Lösung gewaschen und trypsiniert, um eine wachsende Konzentration an ausgeschiedenen Stoffwechselprodukten und einem Mangel an Nährstoffen zu vermeiden. Außerdem wurden die Zellen so vom Untergrund gelöst und eine Überwucherung verhindert. Nach maximal drei Wochen in Kultur wurde die Isolierung verworfen.

3.4 Etablierung einer neuen Methode zur Isolierung von Psalterepithelzellen

Bisher gab es keine etablierte Methode für die Gewinnung von isolierten Psalterepithelzellen. Dies ist einer der Gründe, warum bislang wenig über die Transportproteine am Psalter bekannt ist. Anatomisch bedingt, sind die Psalterblätter nur mit winzigen Zotten bedeckt. Diese sind nicht mit einer Schere abpräparierbar. Um ebenfalls Patch-Clamp-Experimente an isolierten Psalterepithelzellen durchzuführen zu können, musste eine neue Methode etabliert werden, um Psalterepithelzellen zu kultivieren. In dieser Studie wurde eine neue Isolierungsmethode für Psalterepithelzellen etabliert. Hierfür wurde eine Zellisolationskammer entwickelt (sh. Abbildung 7).

Der Psalter wurde ebenfalls nach der Schlachtung der o. a. Schafe entnommen und entlang der kleinen Krümmung aufgeschnitten. Die Ingesta wurde grob entfernt. Ein großes Psalterblatt wurde entlang der Basis abgeschnitten und mehrmals mit kalter Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freier DPBS-Lösung (mit 4 % Penicillin/Streptomycin) abgespült. In dieser Lösung wurde es gekühlt zum Labor transportiert.

Anschließend wurde das Psalterblatt vorsichtig manuell von serosal beginnend, aufgespalten und in die Zellisolationskammer eingespannt (sh. Abbildung 7).

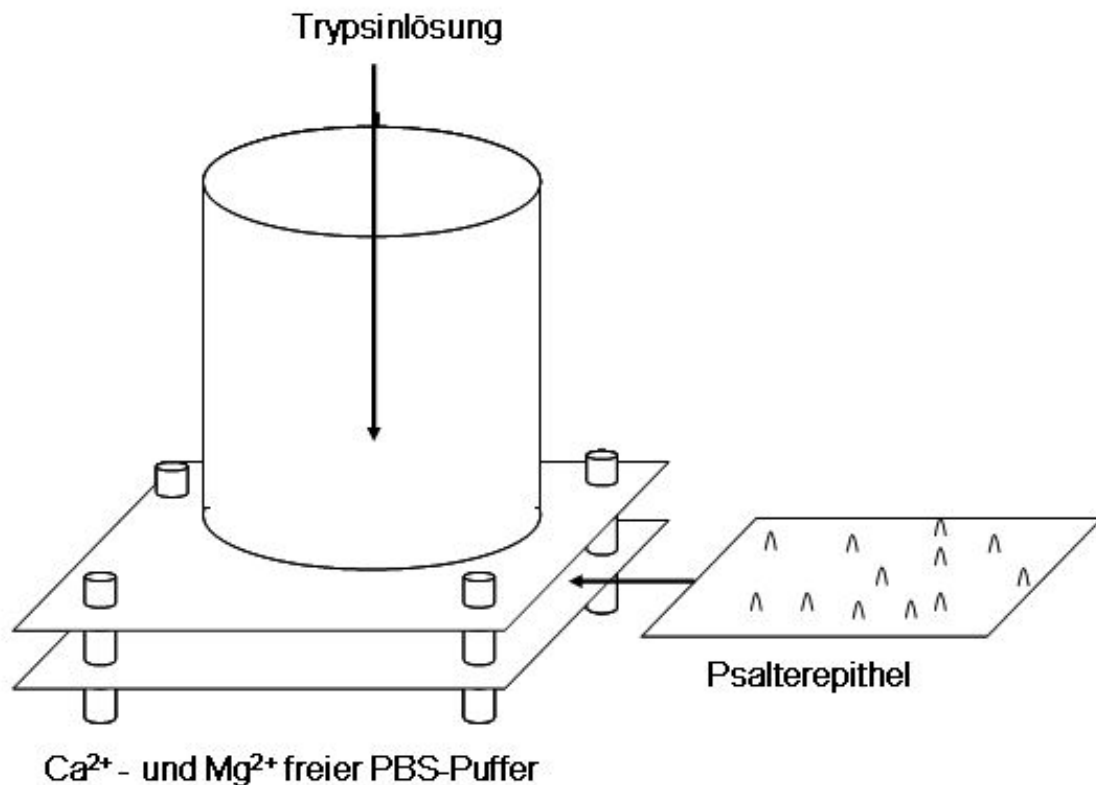


Abbildung 7

Schematische Darstellung der Zellisolationenkammer. Modell der Zellisolationenkammer für die Isolierung von Psalterepithelzellen. Die Zellisolationenkammer ähnelt einer Ussingkammer. Das Epithel wird stramm mit Hilfe von vier Schrauben zwischen die untere und obere Plexiglasplatte eingespannt. Die apikale Seite des Epithels wird mit Trypsin-EDTA-Lösung bedeckt. Die serosale Seite wird mit Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freien DPBS mit 4 % Penicillin-Streptomycin umspült.

Die Zellisolationenkammer bestand aus zwei 10 cm x 10 cm x 0,5 cm großen Plexiglasplatten. In beiden Plexiglasplatten befand sich ein Loch mit einem Durchmesser von ca. 2,5 cm. Das Psalterepithel wurde zwischen beide Platten gelegt (sh. Abbildung 7). Anschließend wurden die Plexiglasplatten zusammengeschraubt. Auf die luminale Seite des Psalterepithels wurde ein Plexiglasrohr von ca. 8 cm Höhe und 5 cm Durchmesser geschraubt. Das Rohr wurde mit ca. 30 ml 0,25 %iger-Trypsin-EDTA-Lösung befüllt. Die Zellisolationenkammer wurde in ein großes Becherglas gestellt. Das Becherglas wurde mit ca. 200 ml Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freier DPBS-Lösung (mit 4 % Penicillin/Streptomycin) gefüllt, sodass die serosale Seite des Psalterepithels komplett in Lösung getaucht war. Das Becherglas wurde für 30 Minuten in ein 37 °C warmes Wärmebad mit Rüttelfunktion gestellt.

Anschließend wurde das Trypsin-Zellgemisch (erste Fraktion) abgesaugt und mikroskopisch kontrolliert. Da sich nach 30 Minuten Inkubation hauptsächlich Hornzellen aus dem *stratum*

corneum im Trypsin-Zellgemisch befanden, scheiterten anfangs durchgeführte Versuche, diese Zellen zu kultivieren und so wurde diese 1. Fraktion nachfolgend routinemäßig verworfen. Die apikale Seite des Epithels wurde erneut für 30 Minuten im Wärmebad trypsiniert. Bei mikroskopischer Untersuchung der zweiten Fraktion befanden sich hauptsächlich Zellen aus dem *stratum basale* im Trypsin-Zellgemisch. Das nun gewonnene Trypsin-Zellgemisch wurde bei 1000 RpM für 10 Minuten bei 4 °C kühlzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit ca. 5 ml M1-Medium gelöst. Die weitere Kultivierung verlief wie bereits bei der Isolierung der Pansenzellen beschrieben.

Da das Psalterblatt im Vergleich zum Pansenepithel sehr dünn ist, beträgt die maximale Trypsineinwirkzeit zwischen 90 und 120 Minuten. Mit dieser Methode können ca. zwei bis drei kultivierbare Zellfraktionen aus einem Psalterblatt gewonnen werden.

Es ist ebenfalls möglich, mit dem Isolierungstopf Pansenepithelzellen zu isolieren. Bei der klassischen Methode, werden die Pansenzotten abgeschnitten. Das Trypsin wirkt auch am bindegewebigen basolateralen Teil der Pansenzotte. Es besteht die Gefahr, eine inhomogene Zellkultur zu erhalten. Der wesentliche Vorteil der neuen Isolierungsmethode ist, dass das Trypsin nur von apikal wirkt. Es befinden sich hauptsächlich Zellen aus dem *stratum basale* im Trypsin-Zellgemisch.

3.5 Immunhistochemie

Um den epithelialen Ursprung der gewonnenen Zellen nachzuweisen, wurden diese immunhistochemisch gefärbt. Es wurde eine Zytokeratinfärbung und eine Vimentinfärbung durchgeführt. Die mikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit einem Olympus Bx41 - Mikroskop bei einer Wellenlänge von 495 nm (genaues Protokoll siehe Anhang).

Es wurden ebenfalls fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mit einem Konfokalen Mikroskop durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen auf Mikrofilter (Porengröße 0,4 µm, Fläche 0,6 cm², Millicell-PCF, Millipore) ausgesät. Anschließend wurden sie mit DPBS gewaschen, mit Methanol fixiert und mit 0,5 %iger Triton X-100 Lösung permeabilisiert. Als primäre Antikörper wurde mouse-anti-occludin, rabbit-anti-occludin, mouse-anti-claudin-4 sowie rabbit anti-claudin-1, -2, -5, -7 und -8 (Zymed Laboratories, Invitrogen Immuno-detection, South San Francisco, CA, USA) verwendet. Die primäre Antikörperkonzentration lag bei 10 mg/ml. Als sekundäre Antikörper wurden Alexa Fluor 488 goat anti-mouse and Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit (beide mit 2 mg/ml, Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR, USA) verwendet. Für die Zellkernfärbung wurde DAPI (4*,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, 1 mmol·l⁻¹, Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet. Die Fluoreszenzmikroskopischen

Aufnahmen erfolgten mit einem Konfokalen Mikroskop (Zeiss LSM510, Carl Zeiss, Jena, Germany) bei den Wellenlängen 594 nm, 488 nm und 405 nm.

3.6 Elektrophysiologische Messungen: Patch-Clamp-Technik

3.6.1 Überblick

Mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik wurden an isolierten Pansen- und Psalterepithelzellen Membranpotentiale und Ionenströme gemessen. Die Patch-Clamp-Technik ist eine etablierte Messmethode in der Elektrophysiologie, mit der sich der Strom sowohl durch die Zellmembran insgesamt, als auch durch einzelne Ionenkanäle in der Zellmembran einer Zelle darstellen lässt.

3.6.2 Prinzip der Patch-Clamp-Technik

Eine mit Elektrolytlösung gefüllte Mikropipette, in der sich eine Messelektrode befindet, wird mit Hilfe eines Mikromanipulators auf die Zellmembran einer isolierten Zelle gedrückt. Als Patch (Engl.: Flicker) wird der Bereich der Zellmembran unter der Patch-Pipette (Durchmesser an der Spitze ca. 1 μm) bezeichnet. Die Befestigung der Zelle an der Patch-Pipette wird als Clamp (Engl.: festklemmen) bezeichnet (siehe Abbildung 8).

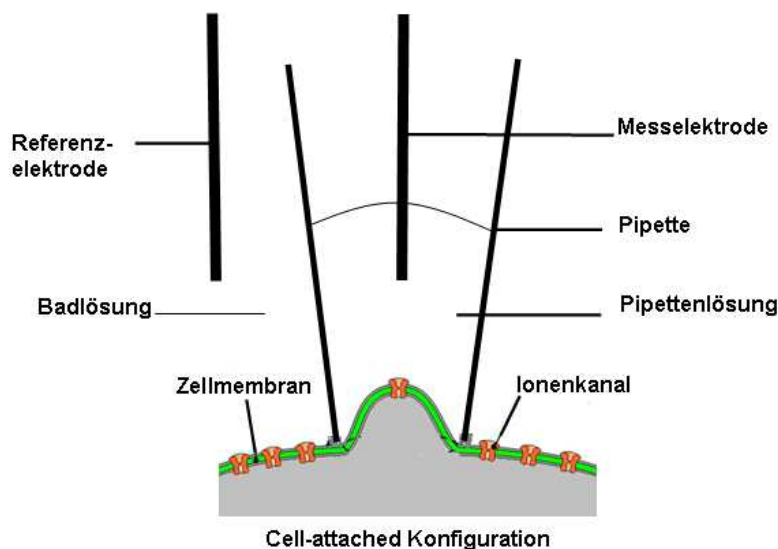


Abbildung 8

Schematische Darstellung der Patch-Clamp-Technik

Die Elektrode in der Patch-Pipette und die Referenzelektrode im Bad sind an einen Patch-Clamp-Verstärker angeschlossen. Mit Hilfe des Patch-Clamp Verstärkers kann ein Potential zwischen diesen beiden Elektroden angelegt werden und die dazugehörige Stromantwort gemessen werden.

Als Elektrode dient eine dünn ausgezogene und mit einer leitfähigen Lösung (hier Natriumgluconat) gefüllte Glaskapillare. In diese taucht ein mit Kaliumchlorid beschichteter Silberdraht ein und wird zusammen mit einer weiteren, in der Badlösung liegenden, Silberdrahtelektrode an den empfindlichen Patch-Clamp-Verstärker angeschlossen. Dadurch ist es möglich, selbst die Aktivität eines einzelnen Ionenkanals in der Membran des Patches nachzuweisen. Sowohl die Zellmembran, deren Bestandteil der Patch ist, als auch das Innere der Zelle bleiben in dieser Konfiguration intakt.

Neher entdeckte 1980, dass sich die Verbindung zwischen Pipette und Zellmembran deutlich besser abdichten lässt, wenn man an der Patch-Pipette einen leichten Unterdruck anlegt (Hamill *et al.*, 1981). Diese Maßnahme führte zu einer sehr engen Anheftung der Zellmembran an der Glasoberfläche (Zwischenraum $< 1\text{nm}$) und damit zu einem starken Anstieg des Abdichtungswiderstandes in den Gigaohm-Bereich. Man spricht von einem „Gigaseal“ (Engl.: Versiegelung). Die bessere Isolierung des Membranflecks von der Badlösung führt zu einer deutlichen Abnahme des Hintergrundrauschens und erlaubt so die Messung von Einzelkanalströmen in hoher zeitlicher Auflösung. Im Vergleich zu anderen Voltage-Clamp-Verfahren zeichnet sich die Patch-Clamp-Methode durch die hohe Auflösung der gemessenen Stromstärken, die im Pico-Ampere (10^{-12} Ampere) Bereich liegen, aus.

3.6.3 Patch-Clamp Konfigurationen

Abhängig davon, ob nach dem Aufsetzen der Patch-Pipette auf die Zelle der entsprechende Membranbereich aus der Zelle herausgelöst wird, oder ob an der intakten Zelle gemessen wird, lassen sich verschiedene Patch-Clamp-Konfigurationen definieren. Mit dem Erreichen des Gigaseals spricht man von der Cell-Attached-Konfiguration (sh. Abbildung 8).

Nach weiterem Anlegen von Unterdruck (entweder an der Pipette durch Saugen oder durch kurze Pulse elektrischer Spannung an der Elektrode) wird eine Öffnung der Zellmembran erzeugt, während der Gigaseal intakt bleibt. Zwischen dem Inneren der Patch-Pipette und dem Inneren der Zelle besteht nun eine Kontinuität, während beide gegen die Außenlösung durch den hohen Widerstand des Gigaseals isoliert sind. Dieser Zustand wird als Whole-Cell-Konfiguration (Ganzzelleableitung) definiert (sh. Abbildung 9). In dieser Konfiguration wird von der gesamten Zellmembran abgeleitet. Da die Pipettenlösung das Innere der Zelle füllt, muss sie in ihrer Zusammensetzung dem Cytosol ähnlich sein. Gleichzeitig bietet diese Konfiguration die Möglichkeit, über die Pipettenlösung die Zelle von innen her zu manipulieren.

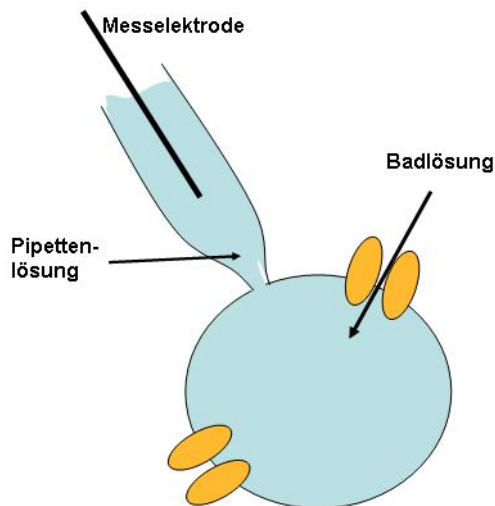


Abbildung 9

Schematische Darstellung der Ganzzellkonfiguration

Wenn man ausgehend von der Cell-Attached-Konfiguration keine Öffnung der Zellmembran herbeiführt, sondern die Pipette vorsichtig von der Zelle abzieht, löst sich der unter der Pipettenspitze befindliche Teil der Zellmembran von der Zelle ab und haftet an der Patch-Pipette (sh. Abbildung 10). Somit ist die ursprünglich innere Seite dieses Membranstücks nunmehr nach außen der Badlösung ausgesetzt. Die ursprünglich äußere Seite des Membranstücks ist der Pipettenlösung ausgesetzt. Dies ist als Inside-Out-Konfiguration definiert. Diese Konfiguration ermöglicht die Messung einzelner Ionenkanäle im Membranstück an der Pipettenspitze (Engl.: Single channel configuration).

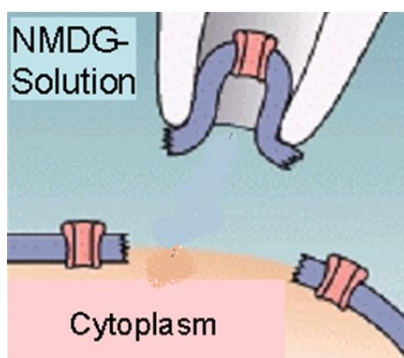


Abbildung 10

Schematische Darstellung der Inside-out Konfiguration.

Bei der Einzelkanalmessung wird nur der Strom auf dem herausgelösten Membranpatch gemessen. Da die Zusammensetzung der Lösungen auf beiden Seiten der Zellmembran genau definiert ist, kann man die Stromantwort einzelner Kanalproteine messen.

3.6.4 Detaillierter Versuchsaufbau

Es werden bei der Patch-Clamp-Technik sehr kleine elektrische Ströme im pA-Bereich (10^{-12} A) gemessen. Dies ist nur mit aufwendigen Maßnahmen zum Ausschluss von Störströmen möglich. Der Versuchsaufbau erfolgte deshalb in einem Faradayschen Käfig. Sämtliche leitende Teile wurden gemeinsam geerdet. Um den Einfluss mechanischer Umgebungsstörungen zu minimieren, wurde auf einem schwingungsgedämpften Tisch gearbeitet. Eine ca. 20 cm dicke Basisplatte aus Stein war auf einem luftgefederten vierbeinigen Gestell (Luigs & Neumann, Ratingen) montiert. Auf dem Tisch befand sich ein inverses Mikroskop (Axiowert 25, Carl Zeiss AG, Oberkochen). Das Objektiv befindet sich bei einem inversen Mikroskop unter dem Objektisch – man sieht also von unten auf das Zellpräparat. So gewinnt man oberhalb des Präparates den Arbeitsbereich für die Patchpipette, Badperfusion und Beleuchtung. Außerhalb des Faradayschen Käfigs befanden sich die Steuereinheit für den Mikromanipulator (Eppendorf PatchMan, Brinkmann Instruments, Inc., New York, USA), der Messverstärker mit integriertem Analog-Digital-Wandler (EPC9, HEKA Elektronik, Lamprecht) und der Computer.

3.6.5 Arbeitskammer und Badperfusion

Die Badperfusion bestand aus einer runden Acrylglasplatte von 35 mm Durchmesser und 5 mm Stärke. Mittig war eine achtförmige Vertiefung mit einer Bohrung von 5 mm eingearbeitet. Unter diese Bohrung wurde mit Hilfe einer Silikonpaste ein Deckglas (Durchmesser 13 mm, Menzel, Braunschweig) geklebt. Auf diesem befanden sich oberseitig die zu untersuchenden Zellen.

3.6.6 Zulauf und Ablauf

In die Arbeitskammer mündete ein Zulauf für die verschiedenen Untersuchungsflüssigkeiten. Die bis zu acht verschiedenen Untersuchungsflüssigkeiten wurden in 50 ml Einzelspritzen (HEILAND Vet GmbH, Hamburg) bereitgestellt. Von den Spritzen führten Polyamidschläuche (Tygon Standardschläuche, ISMATEC, Wertheim-Mondfeld) über zwei Schlauchpumpen (ISMATEC, Wertheim-Mondfeld) zum Manifold (8-channel Millimanifold, ALA Scientific Instruments, Westbury, NY, USA). Am spritzenseitigen Ende waren die Schläuche über Dreiwegehähne an die Spritzen angeschlossen, um eine Entleerung und Spülung der Spritzen nach jedem Versuchstag zu ermöglichen. Je vier Schläuche wurden gemeinsam durch eine Pumpe betrieben. Zwischen der Pumpe und dem Manifold hatte jeder Schlauch einen Dreiwegehahn um jede Versuchsflüssigkeit einzeln in die Arbeitskammer einleiten zu können. Von der Funktion her bündelt das Manifold die acht Zuleitungsschläuche in einen Schlauch. Der Gesamtzuleitungsschlauch mündete in die Vertiefung der Arbeitskammer. Auf der gegenüberliegenden Seite befand sich die Absaugkanüle. Über einen Schlauchan-

schluss und eine Pumpe erfolgte die Absaugung der Flüssigkeit in der Arbeitskammer. So konnte der Flüssigkeitspegel in der Arbeitskammer konstant bei 0,2 ml gehalten werden.

3.6.7 Patchpipette

Die Patchpipette wurde aus einer Borosilikatglaskapillare (Durchmesser außen = 1,5 mm, Durchmesser innen = 1,17 mm; Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) hergestellt. Diese wurde in dem Puller (automatisches Pipettenziehgerät – DMZ-Universal, Zeitz, Augsburg) vor jeder Messung frisch ausgezogen. Um ein Durchstechen der Zellmembran mit der Pipette zu vermeiden, muss die Spitze der Pipette stumpf zulaufen. Die Kapillaren wurden in drei Erhitzungs- und Zugintervallen gezogen. Unmittelbar danach wurden die Pipetten in einem vierten Erhitzungsintervall poliert. Der optimale Pipettenwiderstand lag im Bereich von 3 – 4 M Ω .

Die Patchpipette wurde zur Erzielung eines möglichst kurzen Signalweges an der Pipettenhalterung des Vorverstärkers befestigt. Dieser war über einen Mikromanipulator (Eppendorf PatchMan, Brinkmann Instruments, Inc., New York, USA) steuerbar. Ein luftdicht mit der Pipette verbundener Silikonschlauch ermöglichte die Erzeugung eines leichten Unterdrucks über eine am anderen Ende befestigte Einmalspritze.

3.6.8 Messelektroden

Für den Übergang zwischen metallischen Leitern und Elektrolytlösungen wurden in der Patchpipette und im Bad 0,4 mm starke Silberdrähte verwendet, die in einer 1molaren KCl-Lösung elektrolytisch chloriert wurden. Die Badelektrode war über eine Agarbrücke mit der Perfusionslösung verbunden.

3.7 Ablauf der Patch-Clamp-Experimente

An jedem Versuchstag wurden die auf Deckgläsern ausgesäten Zellen mit Silikonkleber unter die Arbeitskammer geklebt. Eine neue Pipette wurde gezogen, mit entsprechender Pipettenlösung gefüllt und in den Pipettenhalter eingespannt. Nun wurde mit Hilfe des Mikroskops eine geeignete Zelle ausgewählt. Langsam wurde die Pipette in Richtung Zelle gefahren. Beim Eintritt der Pipette in die Badlösung entsteht ein Messartefakt, der als Offsetpotential bezeichnet wird. Die Korrektur der Spannung erfolgte durch die Software TIDA in Form einer Einstellung des Membranpotentials (VMem) auf „Null“. Die eingestellte Sollspannung lag dadurch während der Messung auch tatsächlich an.

Nun wurde zur Berechnung des Pipettenwiderstandes eine definierte Spannung in Form eines 10 mV- Rechteckimpulses appliziert. Aus dem daraus resultierenden Strom wurde nach dem Ohmschen Gesetz ($R = U / I$) automatisch durch die Software der Widerstand berechnet. Entsprechend der Pipettenwiderstand Werten von 3 – 4 MOhm, wurde die Pipette unter optischer Kontrolle mit Hilfe des Mikromanipulators an die Zelloberfläche herangeführt. Bei Berühren der Zellmembran stieg der Widerstand auf ca. 9 MOhm an.

Nach Erzeugung eines geringen Unterdrucks an der Pipette wurde die haltbare Verbindung zwischen Zellmembran und Pipette hergestellt. Dabei erhöhte sich der Widerstand in den Gigaohm-Bereich und die Stromantwort auf den Sollspannungsimpuls war nur noch gering. Die Isolierung des Membranbereiches in der Pipettenöffnung war nun fast vollständig und somit der Gigaseal hergestellt.

Die angezeigten Ströme stellten eine fast durchgehend flache Linie dar mit zwei kapazitiven Artefakten am Anfang und am Ende des Spannungspulses. Diese entstehen durch Umladeprozesse an der Pipette und der Zellmembran und wurden vor Beginn der Messung mit Hilfe der Software kompensiert.

Durch ruckartiges Anlegen eines Unterdrucks wurde die Membran durchbrochen und ein elektrischer Zugang (Whole-Cell-Configuration) durch die Pipettenöffnung hergestellt.

3.8 Vorzeichenkonvention

Die Stromrichtung wird definitionsgemäß aus Perspektive der Zelle bezeichnet. Einwärtsstrom ist das Einströmen positiv geladener Ionen in die Zelle hinein. Er wird als negativer Strom dargestellt. Auswärtsstrom ist ein Ausströmen positiv geladener Ionen aus der Zelle hinaus. Er wird als positiver Strom dargestellt. Für negativ geladene Ionen gilt das Umgekehrte.

Für die einzelnen Messkonfigurationen bedeutet das:

Ganzzelleableitung (Whole-Cell-Configuration)

Da die Pipettenlösung ein Kontinuum mit dem Zytosol bildet bzw. die Innenseite der Membran überspült, bedeutet ein positiver Strom, dass Kationen aus der Pipette über die Zellmembran in das Bad oder Anionen aus dem Bad in die Pipette fließen. Die Potentialdifferenz über der Membran entspricht der an der Pipette anliegenden Kommandospannung. Somit bedeutet ein positiveres Kommandopotential eine Depolarisation der Zelle.

Inside-Out-Konfiguration

Wenn die Pipette mit der Außenseite der Membran verbunden ist, bedeutet ein positiver Strom, dass Anionen aus der Zelle bzw. aus dem Bad über die Membran in die Pipette fließen. Der Membranfleck ist mit seiner Innenseite dem Bad zugewandt. Deshalb entspricht das Membranpotential dem negativen Kommandopotential. Bei der Ableitung an der intakten Zelle (Cell-attached) wird das Potential über der Membran nicht nur von der Klemmspannung, sondern auch durch das Ruhemembranpotential bestimmt. Ein positiveres Kommandopotential bewirkt eine Hyperpolarisation der Zelle.

3.9 Ruhemembranpotential

3.9.1 Nernst-Gleichung in der Biologie

In biologischen Systemen trennen Zellmembranen Bereiche unterschiedlicher Ionenkonzentrationen ab. Ist die Membran für ein bestimmtes Ion selektiv permeabel, wird es entlang des Konzentrationsgradienten diffundieren, gleichzeitig entsteht aber, da das Ion geladen ist, eine Spannung (Ruhemembranpotential). Mit der Nernst-Gleichung lässt sich die Gleichgewichtslage dieses Vorgangs beschreiben.

Die Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung ist eine Möglichkeit für die Berechnung des Membranpotentials unter Berücksichtigung mehrerer permeierender Ionen. Sie erlaubt die Berechnung eines Membranpotentials für eine Membran, die für verschiedene Ionen, wie z.B. Natrium-, Kalium- und Chlorid-Ionen durchlässig ist.

Unter Gleichgewichtsbedingungen, wenn die elektrochemische Triebkraft null ist, wird die zufällige Ionenbewegung (Brownsche Molekularbewegung), die zur Angleichung der Ionenkonzentrationen auf beiden Seiten der Zellmembran führen würde, durch eine elektrische Potentialdifferenz ausgeglichen: die Summe aller Ionenströme ist null. Damit hängt die Gleichgewichts-Potentialdifferenz (Ruhemembranpotential) über einer Zellmembran von den Ionenströmen aller permeierender Ionen ab.

Ionenstromamplituden hängen in komplizierter Weise von der Membranspannung und der Ionenkonzentration ab und sind daher nur annäherungsweise zu berechnen. In der Goldman-Gleichung wird der Ionenstrom als Funktion der Ionenkonzentration und eines Koeffizienten, der sogenannten Permeabilität P angenähert. Die Permeabilität leitet sich vom Fickschen Diffusionsgesetz ab: sie ist der Quotient aus Diffusionskonstante und Membrandicke.

$$E = \frac{RT}{zF} \cdot \ln \frac{[K]_e \cdot P_K + [Na]_e \cdot P_{Na} + [Cl]_i \cdot P_{Cl}}{[K]_i \cdot P_K + [Na]_i \cdot P_{Na} + [Cl]_e \cdot P_{Cl}}$$

Goldmann-Hodgkin-Katz-Gleichung

E = Potentialdifferenz, R = Gaskonstante, T = absolute Temperatur, z = Wertigkeit des betrachteten Ions, F = Faraday-Konstante, ln = natürlicher Logarithmus, e = extrazellulär, i = intrazellulär, P = Permeabilität.

3.10 Pulsprotokolle

Zur Charakterisierung des Membranstroms wurden drei Pulsprotokolle erstellt.

Pulsprotokoll 1 (kontinuierliches Pulsprotokoll, sh. Abbildung 11):

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

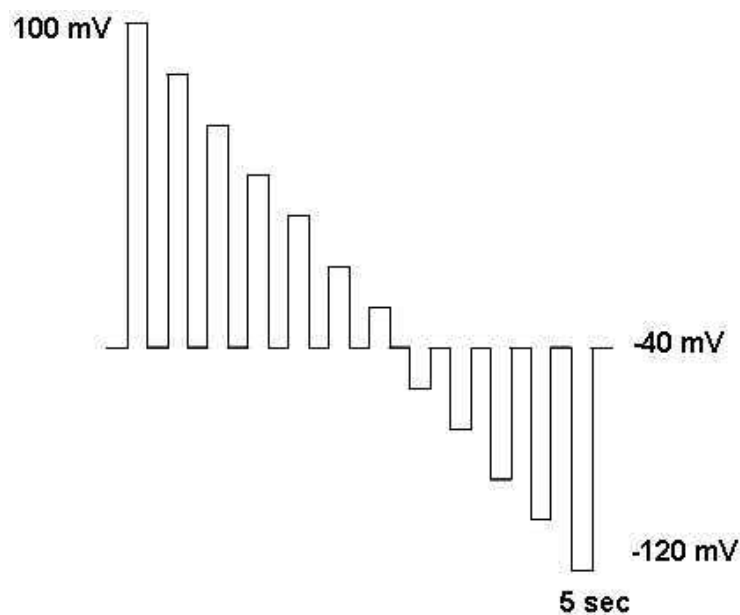


Abbildung 11

Schematische Darstellung von Pulsprotokoll 1 zur Charakterisierung des Membranstroms. Dieses Pulsprotokoll wurde in der Ganzzelleableitung (whole-cell-configuration) verwendet.

Pulsprotokoll 2 (konventionelles Pulsprotokoll, sh. Abbildung 12)

Zusätzlich zu dem o.a. kontinuierlichen Protokoll wurden konventionelle Pulsprotokolle mit 10 mV-Abständen erzeugt. Auch hier jeweils ausgehend von einem Ruhemembranpotential von -40 mV. Aufgezeichnet wurde dieses Protokoll mit einer Frequenz von 5 kHz.

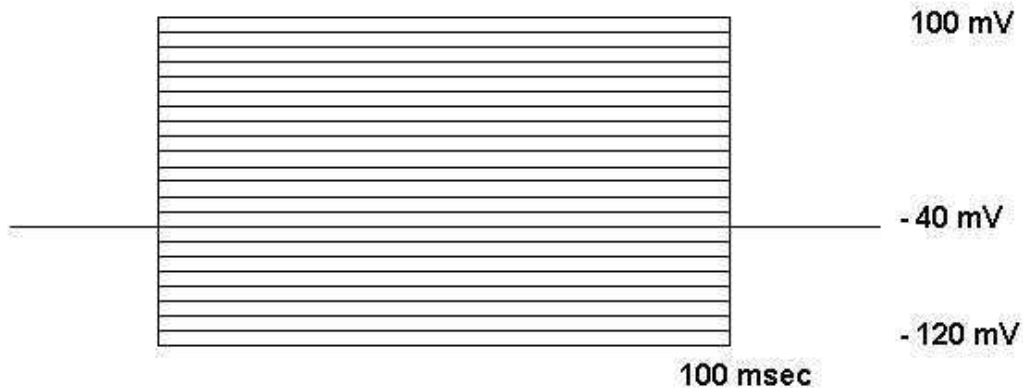


Abbildung 12

Schematische Darstellung von Pulsprotokoll 2.

Zur besseren Übersicht wurden zu unterschiedlichen Zeiten erhaltene Stromantworten auf Spannungen zwischen -120 mV und 100 mV übereinander dargestellt. Dieses Protokoll wurde ebenfalls in der Ganzzelleableitung (whole-cell-configuration) verwendet.

Pulsprotokoll 3 (sh. Abbildung 13)

Für die Einzelkanalableitungen wurde ebenfalls ein konventionelles Pulsprotokoll mit 10 mV-Abständen von -60 mV bis +60 mV erzeugt. Hier wurde von einem Ruhemembranpotential von 0 mV ausgegangen. Dieses Protokoll wurde mit einer Frequenz von 10 kHz aufgezeichnet.

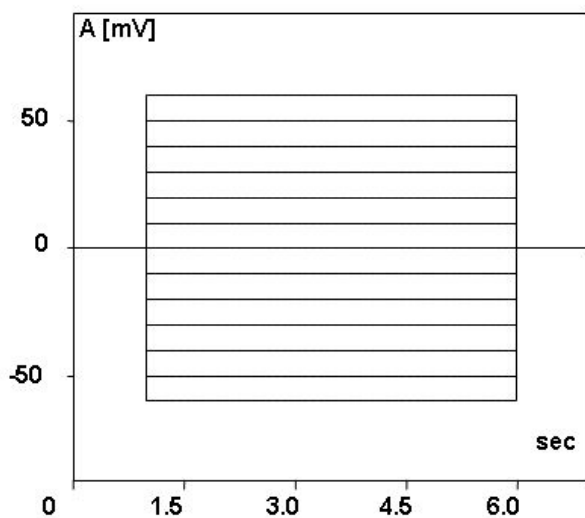


Abbildung 12

Schematische Darstellung des konventionellen Pulsprotokolls 3.

Es wurde für die Einzelkanalmessungen in der Inside-out-Konfiguration verwendet.

3.11 Analyse der Patch-Clamp Daten

3.11.1 Liquid Junction Potentials (LJP)

Wenn Flüssigkeiten unterschiedlicher Zusammensetzung aufeinandertreffen, entstehen an den Grenzen Potentialdifferenzen, sogenannte Liquid Junction Potentials (LJP). Sie entstehen durch Ladungstrennung, wenn Anionen und Kationen unterschiedlicher Mobilität an Flüssigkeitsgrenzen aufeinander treffen oder wenn sie durch Membranen diffundieren. Beim Einsatz eines großen Anions in der Pipettenlösung (z. B. Gluconat) und eines kleineren Anions in der Perfusionslösung (z.B. Chlorid) können Potentialdifferenzen von über 10 mV entstehen. Aus diesem Grund wurden für alle verwendeten Versuchslösungen entsprechend ihrer Ionenzusammensetzung, die Liquid Junction Potentials mit Hilfe der Henderson-Gleichung vor der Datenanalyse berechnet (Barry und Lynch, 1991) und in die Auswertung einbezogen.

3.11.2 Auswärtsstrom in Prozent

Zur statistischen Bewertung der Membranströme wurden die Stromwerte bei einem Pipettenpotential von -120 mV (= Einwärtsstrom) und +100 mV (= Auswärtsstrom) benutzt. Da die untersuchten Panseneepithelzellen unterschiedlich groß waren, schwankten die absoluten Stromwerte von Zelle zu Zelle trotz gleicher Bedingungen sehr. Um die Ströme der verschiedenen Zellen miteinander vergleichen zu können, wurde zu Beginn jeder Messung der Strom in NaCl-Lösung bei einem Pipettenpotential von +100 mV (bzw. -120 mV) mit 100 % gleichgesetzt. Die Ströme der weiteren Badlösungen wurden prozentual zum Strom zu Beginn der Messung angegeben.

3.11.3 Umkehrpotential

Bei den Patch-Clamp Experimenten wurde das Potential über der Zellmembran auf ein definiertes Potential geklemmt und die entsprechende Stromantwort gemessen. Die Ströme zu jedem beliebigen Potentialwert können so ermittelt werden. In der Auswertung wurde auch die Spannung betrachtet, bei welcher der gemessene Strom gleich null ist. Dieses Potential, bei dem kein Nettostrom fließt, wird als Umkehrpotential der Zelle bezeichnet. Die Umkehrpotentiale wurden ermittelt, mittels einer linearen Regression zwischen den Stromwerten im Bereich um Null. Das Umkehrpotential ist abhängig von den verschiedenen Ionen, deren Konzentration, und der Permeabilität der Membran für die verschiedenen Ionen. Durch die unterschiedliche Mobilität von Ionen ergibt sich bei der Berechnung der Umkehrpotentiale (E_{rev}) ein Spannungsfehler. Dieser wurde nach Barry und Lynch (Barry und Lynch) korrigiert.

3.11.4 Relative Permeabilität

Mit Hilfe des Umkehrpotentials und der Nernstgleichung (siehe Kap. Nernst-Gleichung in der Biologie) kann die relative Permeabilität der Zellmembran für verschiedene Ionen berechnet werden (Hille, 2001).

$$E_{\text{rev, B}} - E_{\text{rev, A}} = RT/zF \cdot \ln (P[B_o])/(P_A [A_o])$$

Ea: Umkehrpotential von a (z.B. NaCl)

Eb: Umkehrpotential von b (z. B. Naglu, NaPro, etc.)

PA: Permeabilitätskonstante für Ion A

PB: Permeabilitätskonstante für Ion B

PB/PA = Relative Permeabilität = Permeabilitätsverhältnis

3.11.5 Identifizierung der Ionenströme über die Membran

In der Ganzzellkonfiguration wurden die Umkehrpotentiale während der Messung kontinuierlich und bei jedem Lösungswechsel bestimmt. Dies erfolgte automatisch mit der Tida Software. In den Strom–Spannungs-Kurven (sh. Abbildung 14) konnte das Umkehrpotential ebenfalls manuell verifiziert werden.

Leckströme lassen sich von spezifischen Ionenströmen durch die Analyse der Umkehrpotentiale unterscheiden. Bei Verlust des Seals geht das Umkehrpotential gegen Null – der Strom fließt nicht mehr über die Zellmembran und die Spannung wird nicht mehr durch selektive oder spannungsabhängige Ionenkanäle beeinflusst. Gegen Leckströme sprachen zum Beispiel die negativen Umkehrpotentiale der Zellen in NaCl-Lösung. Nur solche Zellen, die einen „stabilen“ Seal während der Messung aufwiesen wurden in die Auswertung einbezogen.

3.11.6 Strom-Spannungs-Kurven

Die Ströme wurden bei verschiedenen Spannungen gemessen und gegen das angelegte Potential aufgetragen. So erhielt man eine Strom-Spannungs-Kurve (sh. Abbildung 14) aus der das Umkehrpotential direkt abgelesen werden konnte.

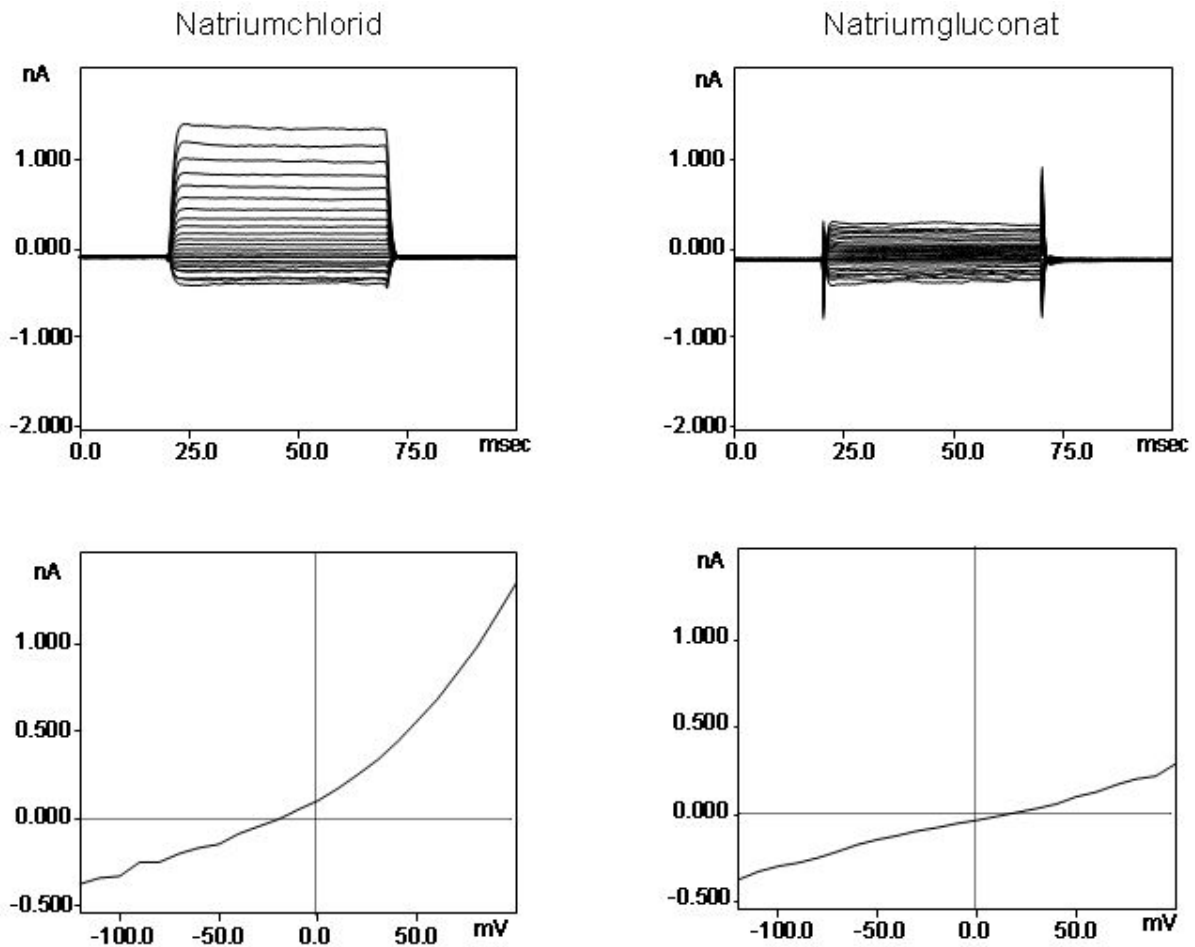


Abbildung 14

Oben: Konventionelles Pulsprotokoll für Natriumchlorid- und Natriumgluconat in der Perfusionslösung. Unten: Strom-Spannungs-Kurve für NaCl-Lösung mit einem Umkehrpotential von ca. -20 mV und für Natriumgluconatlösung mit einem Umkehrpotential von ca. +12 mV. Die o. a. Werte müssen für die Auswertung noch um den Wert der Liquid Junction Potentials korrigiert werden.

3.11.6.1 Rektifizierend

Ein Kanal wird als rektifizierend bezeichnet wenn er in einem bestimmten Potentialbereich besser leitet als in einem anderen. Ionen können in beide Richtungen durch den jeweiligen Kanal strömen, wobei die Richtung vom angelegten Potential abhängt. Eine gekrümmte Strom-Spannungs-Kennlinie kann auf die Tatsache hinweisen, dass der Kanal einen Spannungssensor hat (z.B. voltage dependent potassium channels, Kv), dass zytosolische Ionen spannungsabhängig blockieren (z.B. inward rectifying K⁺ channel, Kir) oder dass sich nach der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung aufgrund einer Ungleichverteilung der Ionen bei spannungsunabhängiger Leitfähigkeit eine gekrümmte Kennlinie ergibt.

3.11.6.2 Einwärtsrektifizierend

Ein einwärtsrektifizierender Kanal ist ein Kanal welcher sich nach Hyperpolarisation öffnet. Bei negativen Potentialen strömen positive Ionen in die Zelle hinein, oder negative Ionen hinaus. Die Zelle wird also automatisch wieder zum Ausgangspotential zurückgeführt.

3.11.6.3 Auswärtsrektifizierend

Auswärtsrektifizierend bedeutet, dass sich der Kanal bei Depolarisation öffnet. Hierbei kann es sich wieder um ein Ausströmen von Kationen aus der Zelle bzw. die Pipette in das Bad, oder um einen Einstrom von Anionen aus dem Bad in die Zelle bzw. Pipette. In der vorliegenden Arbeit konnte so gezeigt werden, dass der Einstrom von Anionen mit zunehmender Depolarisation zunahm.

3.11.6.4 Einzelkanalleitfähigkeit

Die Bestimmung der Einzelkanalleitfähigkeit errechnete sich aus der Steigung der Regressionsgraden der Strom-Spannungs-Kennlinien aus den Einzelkanalmessungen.

3.12 Statistische Analyse

Für die Auswertung wurden Daten aus 186 Einzelexperimenten herangezogen und im Text mit „n“ angegeben. Die quantitativen Angaben erfolgten als Mittelwerte mit Standardfehler (SEM, standard error of the mean).

Die graphische Darstellung und die Prüfung auf signifikante Unterschiede erfolgten mit dem Programm SigmaPlot 2002 for Windows Version 8.0 (SPSS Inc.). In den Abbildungen wurden bei unterschiedlichen Gruppengrößen der Mittelwert und der Standardfehler abgebildet.

Die Statistische Auswertung erfolgt mit dem Programm SigmaStat for Windows Version 3.0. Stammen die Daten aus einer normalverteilten Datenmenge, wurde der beim Vergleich zweier unabhängiger Stichproben der ungepaarte t-Test nach Student verwendet, zum Vergleich zweier abhängiger Stichproben der gepaarte t-Test nach Student. Lag keine Normalverteilung vor, wurde der Friedman Test eingesetzt und anschließend durch den Holm-Sidak Test (normalverteilte Daten) oder dem Dunn's Test (nicht normalverteilte Daten) paarweise auf signifikante Unterschiede getestet. Das gewählte Signifikanzniveau betrug 5% ($p < 0,05$).

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung einer neuen Methode zur Isolierung von Pansen- und Psalterepithelzellen

Die Zotten des Psalters sind im Vergleich zu denen des Pansens sehr klein und daher aufgrund ihrer Größe nicht mit einer Schere abpräparierbar. Die Methode nach Galfi kann am Psalter also nicht angewendet werden und bisher existierte keine etablierte Methode für die Gewinnung von Psalterepithelzellen. Dies mag einer der Gründe für die bislang noch unzureichende Aufklärung der Transportprozesse am Psalterepithel sein. Um ebenfalls Patch-Clamp-Experimente an isolierten Psalterepithelzellen durchzuführen zu können, musste in dieser Studie eine neue Methode etabliert werden, um Psalterepithelzellen zu kultivieren.

Zu diesem Zweck wurde eine Zellisolationskammer entwickelt, die es in Anlehnung an die Ussingkammer ermöglichte, das Epithel einzuspannen (Sh. Abbildung 15). Wie im Material und Methodenteil detailliert beschrieben, konnte in dieser Kammer die apikale Seite des Epithels gezielt mit Trypsin behandelt werden, während an der basolateralen Seite ein trypsin-freier Puffer zum Einsatz kam. Durch diese Anordnung wird die Ablösung von Zellen der basolateralen Seite verhindert. Dies ist wünschenswert, um die Gefahr einer Kontamination durch Zellen nicht-epithelialen Ursprungs zu verhindern.

Die Methode ist auch am Pansen einsetzbar und dürfte insbesondere an Organen mit geringem Zottenbesatz (z.B. nach Heufütterung) eine Erleichterung und Verbesserung des bisherigen Verfahrens darstellen.

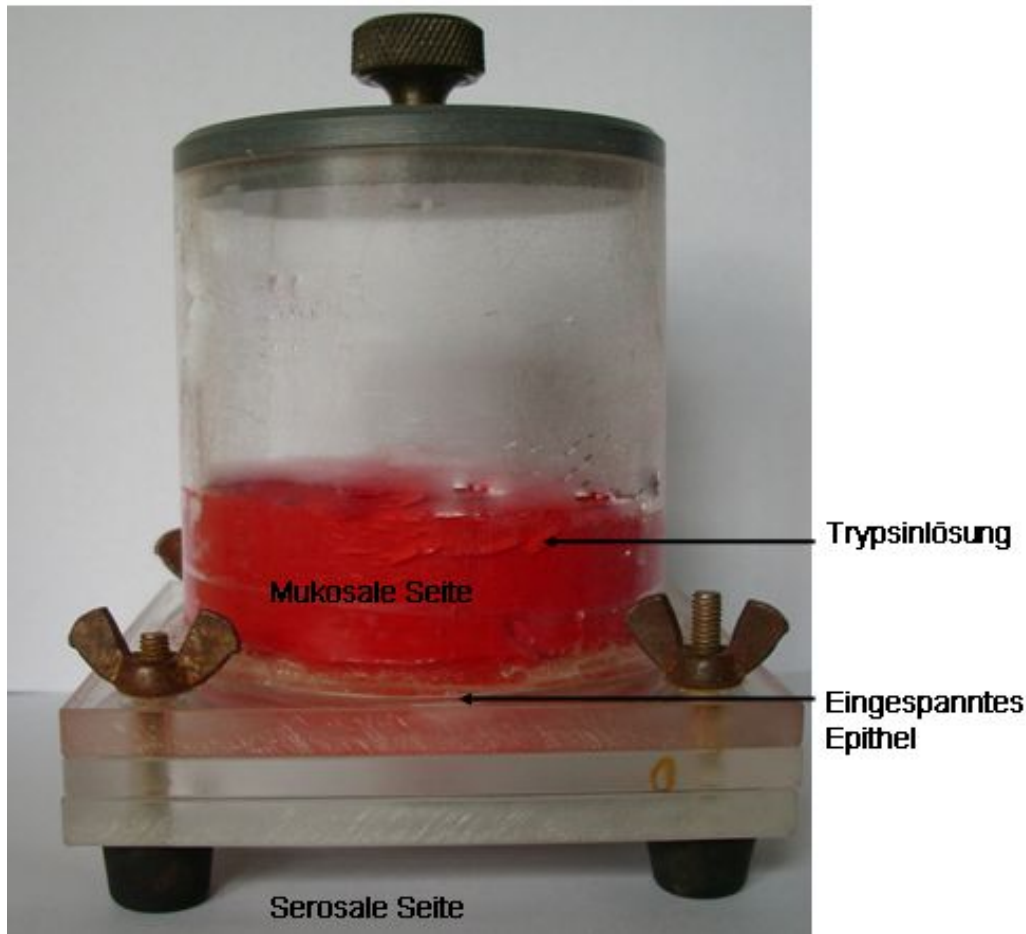
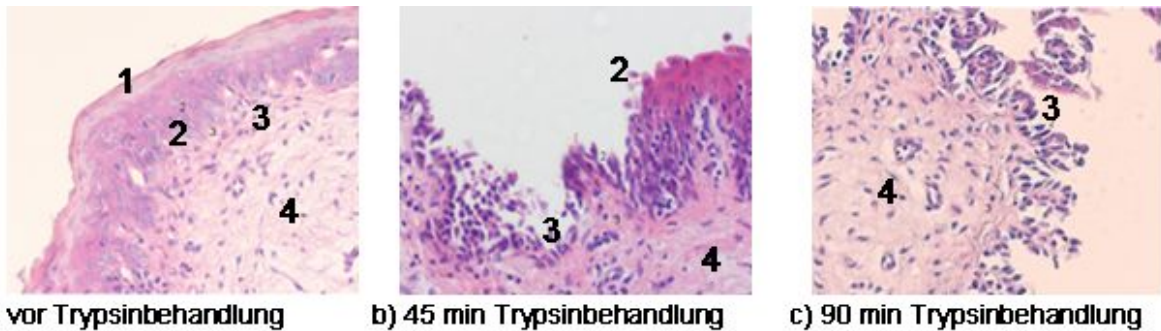


Abbildung 15

In dieser Studie neu entwickelte Zellisolationskammer mit eingespanntem Psalterepithel, während Trypsinbehandlung

4.2 Fraktionierte Trypsinierung zur Bestimmung der optimalen Trypsineinwirkzeit

Bei der Etablierung der neuen Isolierungsmethode für Psalterepithelzellen mit der Zellisolationskammer (sh. Abbildung 15) lagen keine Angaben für die optimale Einwirkzeit von Trypsin vor. Bei zu langer Einwirkzeit löst Trypsin das komplette Epithel auf. Da das Psalterepithel viel dünner ist als das Pansenepithel, konnten nicht die gleichen Trypsineinwirkzeiten wie bei der Isolierungsmethode für Pansenepithelzellen verwendet werden. Um die Effekte des Trypsins auf das Epithel und die Zellen zu überprüfen wurde das Psalterepithel nach verschiedenen Einwirkzeiten Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt (sh. Abbildung 16).



In Zusammenarbeit mit Dr. L. Mundhenk, Institut für Tierpathologie, FU Berlin

Abbildung 16

HE-Färbung des Psalterepithels nach verschiedenen Inkubationszeiten mit warmer Trypsinlösung in der Zellisolationskammer. Vor Trypsinbehandlung ist das *stratum corneum* (1) noch vorhängen. Nach ca. 45 Minuten Inkubation in warmer Trypsinlösung befinden sich Zellen aus dem *stratum granulosum* (2) und *stratum basale* (3) im Trypsin-Zellgemisch. Bei längerer Inkubation in Trypsinlösung befinden sich viele Zellen aus dem *stratum basale* (3) in der Suspension, die *lamina propria* (4) wurde in diesem Präparat noch nicht angedaut, jedoch hing dies mit der Dicke des Psalterblattes zusammen.

Bei diesen Versuchen zeigte sich eine hohe Variabilität der Präparate, wobei die Zeit bis zur Ablösung des *stratum corneum* mit der Dicke des Psalterblattes zunahm. In der Praxis wurde die Zellsuspension von der apikalen Seite alle 30 Minuten abgesaugt, wobei durch mehrfaches hin- und her pipettieren eine mechanische Lösung der Zellen vom Epithel und von einander herbeigeführt wurde. Die Suspension wurde anschließend im Mikroskop betrachtet; Zellen des *stratum basale* sind durch ihre homogene, kugelförmige Gestalt deutlich von den eher amorph imponierenden Zellen der oberen Schichten abgrenzbar. In der Regel waren nach 45 Minuten Inkubation des Psalterepithels mit 0,25 %iger Trypsin-EDTA-Lösung die Zellen des *stratum corneum* abgelöst. Nach 90 Minuten Inkubation befanden sich großen Mengen von Zellen des *stratum basale* in der Trypsinsuspension.

Wichtig war es, das Trypsin lange genug einwirken zu lassen, bis sich Zellen aus dem *stratum basale* ablösten, da nur diese Zellen in der Zellkultur proliferieren und Proteine der apikalen und basolateralen Zellmembran exprimieren, während Zellen der höheren Schichten in Kultur absterben. Somit ähnelt das Verhalten der Zellen in Kultur durchaus dem des intakten Epithels. Bekanntlich wird Plattenepithel durch Teilung der Zellen des *stratum basale* regeneriert, die nach Ablösung von der Basalmembran im Epithel aufwärts wandern und dabei zu den Zellen der verschiedenen Epithelschichten ausdifferenzieren (Langbein *et al.*, 2002; Radoja *et al.*, 2006). Dabei verlieren diese die Fähigkeit, sich zu teilen.

4.3 Immunhistochemische Charakterisierung der isolierten Pansen und Psalterepithelzellen

Um den epithelialen Ursprung der Primärkulturzellen zu überprüfen, wurden Zytokeratine und Tight Junction Proteine immunhistochemisch nachgewiesen. Der Nachweis von Zytokeratinen darf als gut etablierte Methode zum Nachweis eines epithelialen Ursprungs von Zellen betrachtet werden.

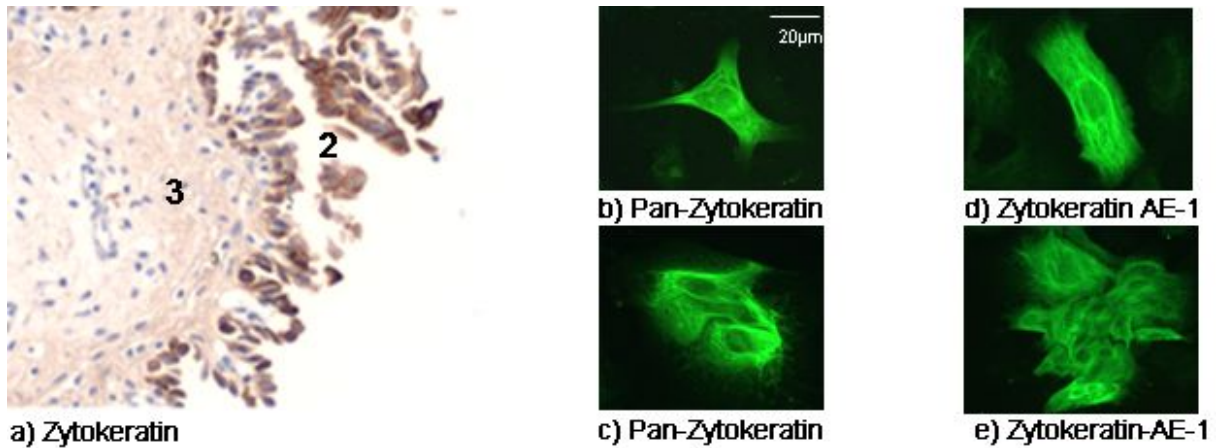
Ebenfalls für Epithelzellen hochcharakteristisch sind Tight Junction Proteine. Diese membranständigen Proteine verbinden benachbarte Zellen von Epithelien und Endothelien miteinander und verschließen somit den Zellzwischenraum gegen den unkontrollierten Fluss von Ionen und Molekülen über das Epithel. Andere Gewebsformen wie z.B. die Zellen des Bindegewebes exprimieren hingegen keine Epithelschlussleisten.

Die Tight Junctions haben somit eine außerordentliche Bedeutung für die Barrierefunktion der Vormägen, deren Aufhebung eine Rolle bei den systemischen Manifestationen der Pansenazidose spielen dürfte (Plaizier *et al.*, 2008). Die Charakterisierung der Tight Junction Proteinen der Vormägen dürfte daher nicht nur zum Nachweis eines epithelialen Ursprungs der von uns verwandten Zellen tauglich, sondern auch von allgemeinem Interesse sein.

4.3.1 Färbung der Zytokeratine

Zunächst wurden die aus dem Psalter isolierten und kultivierten Zellen durch Zytokeratinfärbung auf ihren epithelialen Ursprung hin überprüft. Zytokeratine sind spezifische Intermediärfilamente der Epithelzellen und werden für die Zellcharakterisierung als Markerproteine verwandt.

Die kultivierten Primärkulturzellen wurden mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gegen diese epithelialen Marker immunhistochemisch gefärbt. Abbildung 17 zeigt verschiedene Zytokeratinfärbungen des Psalterepithelgewebes (sh. Abbildung 17a) und der kultivierten Psalterepithelzellen (sh. Abbildungen 17b – e). Die Primärkulturzellen wurden nach frühestens sieben Tagen in Kultur und nach Erreichen der Konfluenz gefärbt. Die Zytokeratine stellen sich als fadenartige Filamente im Zytoplasma dar. Die Intensität der Färbung stieg mit zunehmender Zelldichte im Rasen an, aber auch in vereinzelt Zellen ließen sich Zytokeratin Filamente nachweisen.



In Zusammenarbeit mit Dr. L. Mundhenk, Institut für Tierpathologie, FU Berlin

Abbildung 17

Färbung des Zytokeratins des Psalterepithels nach 70 Minuten Inkubation mit Trypsinlösung in der Zellisolationskammer. Die oberen Schichten des Epithels wurden in diesem Präparat fast vollständig abgelöst. (2 *Stratum basale*, 3 *Lamina propria*).

b + c) Nach einer Woche wurden die Primärkulturzellen mit Pan-Zytokeratin gefärbt. Die Zytokeratine stellen sich als fadenartige Filamente im Zytoplasma dar. Sowohl einzelne Zellen als auch proliferierende Zellgruppen exprimieren dieses Zytokeratin.

d + e) Auch das Zytokeratin-AE-1 wurde sowohl von einzelnen Zellen als auch von in Gruppen wachsenden Zellen nach einer Woche in Kultur exprimiert. Die feinen intrazellulären Filamente sind deutlich zu sehen.

4.3.2 Immunhistochemische Färbung der Tight Junction Proteine

Um eine Kontamination der Kulturen mit Zellen nicht-epithelialen Ursprungs auszuschließen, wurden nachfolgend die Kulturen auf Expression von Tight Junction Proteinen untersucht. Sowohl im intakten Gewebe des Pansens und des Psalters, als auch in den daraus isolierten Kulturen ließen sich die Tight Junction Proteine Occludin, Claudin 1, 4 und 7 durch entsprechende mit immunfluoreszentem Farbstoff markierte Antikörper in einem konfokalem Laserscanning Fluoreszenzmikroskop (CLSM, Zeiss) nachweisen (sh. Abbildungen 18 - 23).

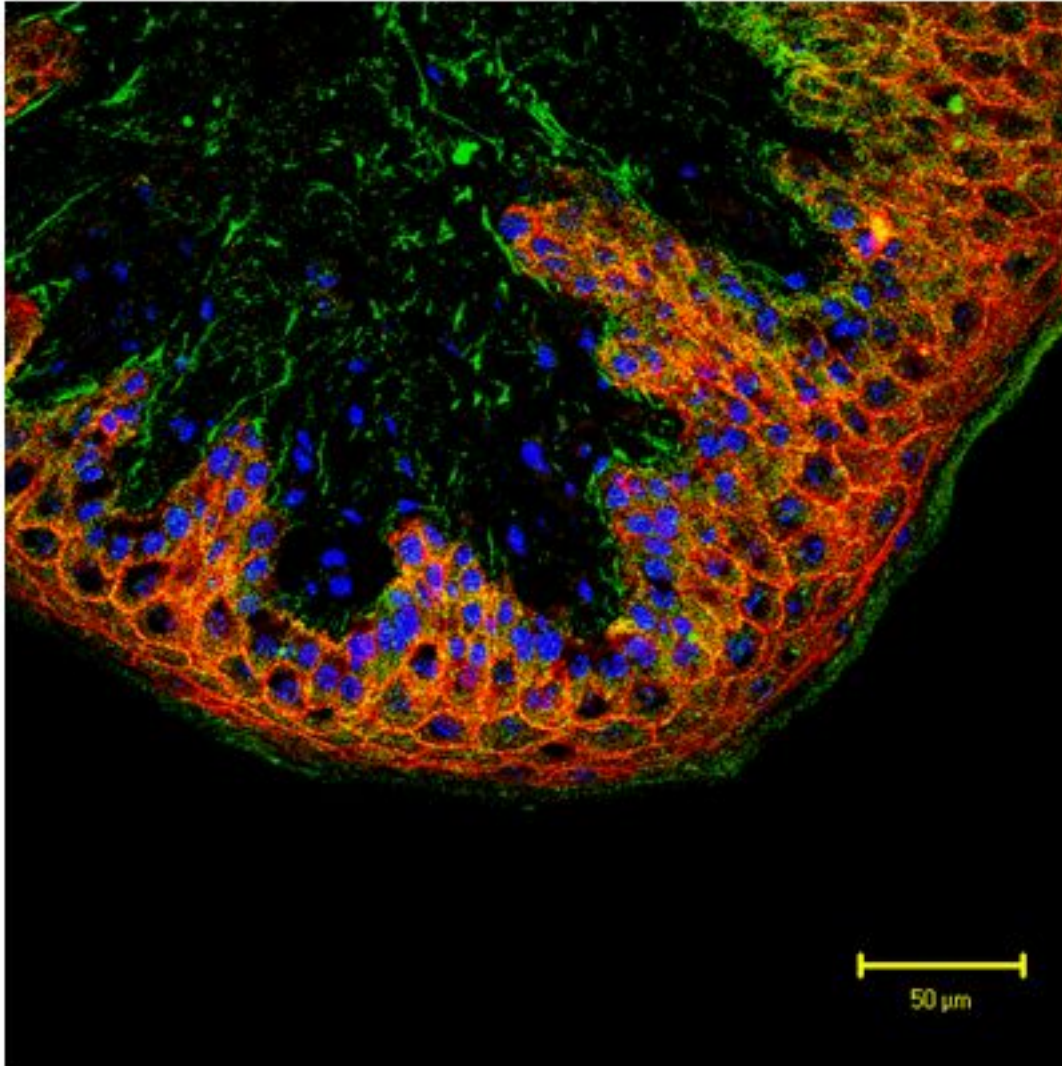


Abbildung 18

Konfokale Laserscanning-Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des mehrschichtigen Plattenepithels des Pansens im Querschnitt. Immunhistochemische Färbung der Tight Junction Proteine Occludin (grün) und Claudin 1 (rot); die Coexpression beider Proteine durch die Epithelzellen des *stratum granulosum* und *stratum basale* sind gelb gefärbt; die Zellkerne sind blau (DAPI). Während Occludin auch in den subepithelialen Endothelien der Gefäße nachweisbar ist, erscheint Claudin 1 auf die epitheliale Schicht begrenzt zu sein. Die immunhistochemischen Färbungen und Lasermikroskopischen Aufnahmen wurden in Zusammenarbeit mit Frau PD Dr. Dorothee Günzel (Institut für klinische Physiologie, Charité Campus Benjamin Franklin, FU und HU Berlin) angefertigt.

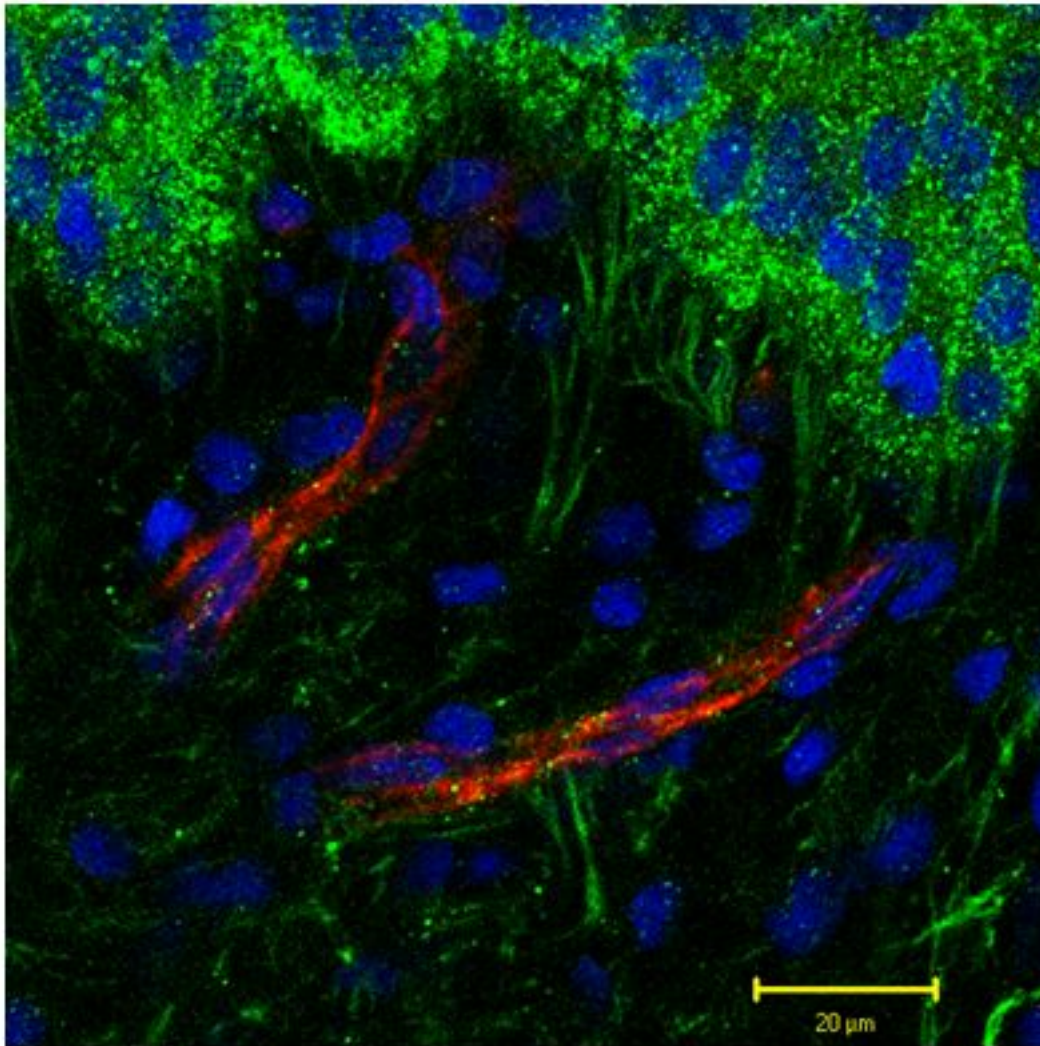


Abbildung 19

Darstellung des epithelialen und subepithelialen Gewebes des Pansens mit Nachweis von Occludin (grün) und Claudin 5 (rot). Darstellung der Zellkerne erfolgte in blau. Claudin 5 wird nur von den Endothelzellen der Gefäße exprimiert.

Nachdem die mit der Zellisolationskammer gewonnen Pansenzellen nach ca. einer Woche in Kultur einen konfluenten Zellkulturrasen ausgebildet hatten, wurden diese ebenfalls immunhistochemisch gefärbt. In den Abbildungen 20 und 21 sind die Tight Junction Proteine Occludin und die Mitglieder der Claudinfamilie: Claudin 1, 4 und 7 und die Zellkerne (blau) dargestellt. Hingegen konnte Claudin 5 lediglich im subepithelialen Gewebe längs der Gefäße nachgewiesen werden. Bei Färbungen mit gegen Claudin 2 gerichteten Antikörpern konnte vereinzelt auch eine Colokalisation mit Occludin in der Zellmembran beobachtet werden; allerdings dominierte die teilweise starke Färbung des Zytoplasms. Dieses könnte auf eine intrazelluläre Bildung des Proteins hinweisen mit nur unvollständigem „Trafficking“ in die Membran; insgesamt konnte eine unspezifische Färbung jedoch nicht ausgeschlossen werden (keine Abbildung).

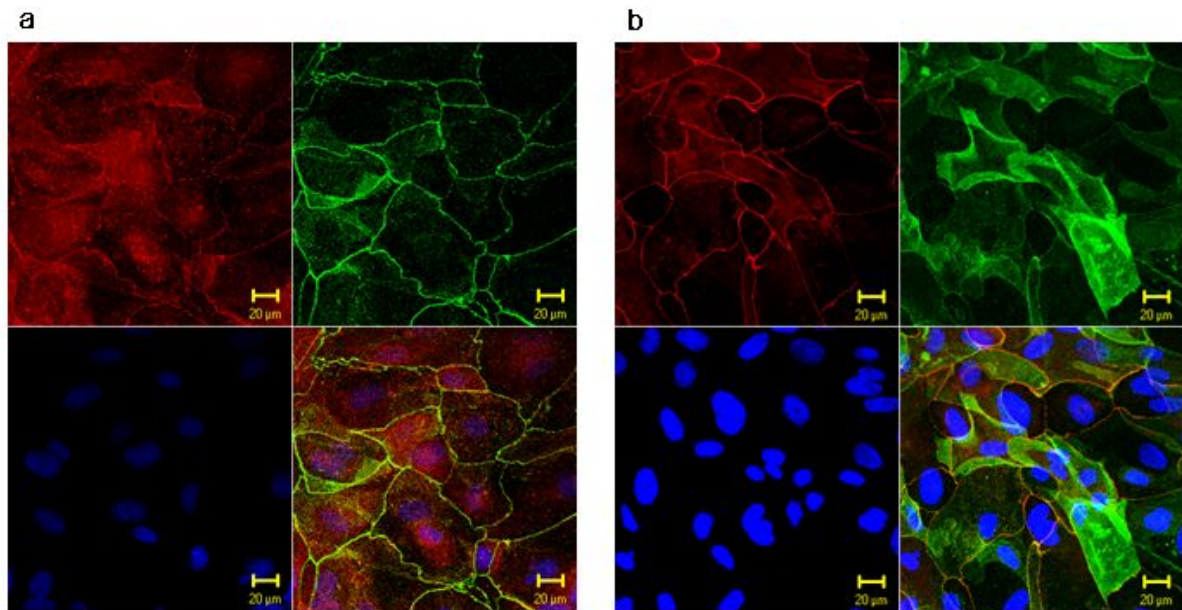


Abbildung 20

Dargestellt ist jeweils ein Schnitt durch die Kultur von Pansenepithelzellen.

a) Tight Junction Proteine: Claudin 1 rot, Occludin grün, Zellkerne blau

b) Tight Junction Proteine: Claudin 4 grün, Occludin rot, Zellkerne blau

Die Überlagerung aller drei Färbungen ist in der rechten unteren Ecke beider Abbildungen (a und b) dargestellt. Colokalisation von Claudinen und Occludin imponiert gelb.

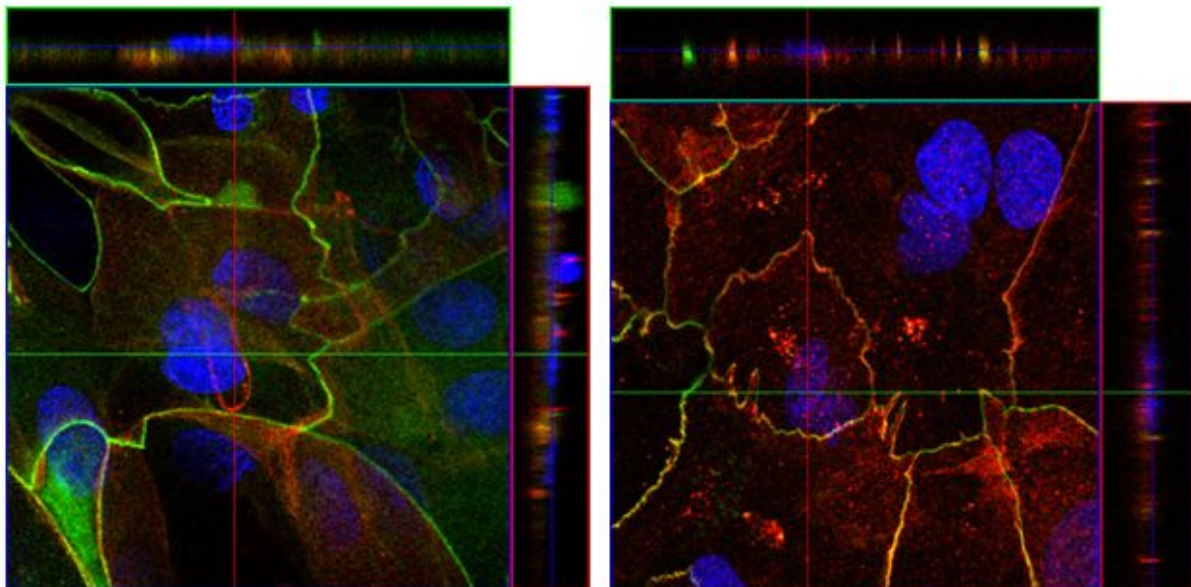


Abbildung 21

Hier wurden mehrschichtige Aufnahmen (stack) durch die Pansen-Primärkulturzellen angefertigt, um Tight Junction Proteine immunhistochemisch nachzuweisen. Dargestellt ist neben der Draufsicht (großes Quadrat) auch der Schnitt durch das Präparat in x Richtung (grüne Linie, Streifen oben) und y Richtung (rote Linie, rechter Streifen). Dargestellt sind die Tight Junction Proteine Occludin (grün, beide Abbildungen), Claudin 4 (links, rot) und Claudin 7 (rechts, rot); Colokalisation von Occludin und Claudin (gelb), Zellkerne (blau).

Zeitgleich wurden immunhistochemische Färbungen der Tight Junction Proteine Occludin und den Mitgliedern der Familie der Claudine: Claudin 1, 4 und 7 am intakten Psalterepithel vor Trypsinbehandlung (sh. Abbildung 22) und an den aus dem Psalter gewonnenen konfluenten, einschichtigen Primärkulturzellen durchgeführt (sh. Abbildung 23). Dabei war die Homogenität der Expression insbesondere von Occludin beeindruckend; eine Co-Kultur mit Fibroblasten erscheint nach diesen Ergebnissen wenig wahrscheinlich.

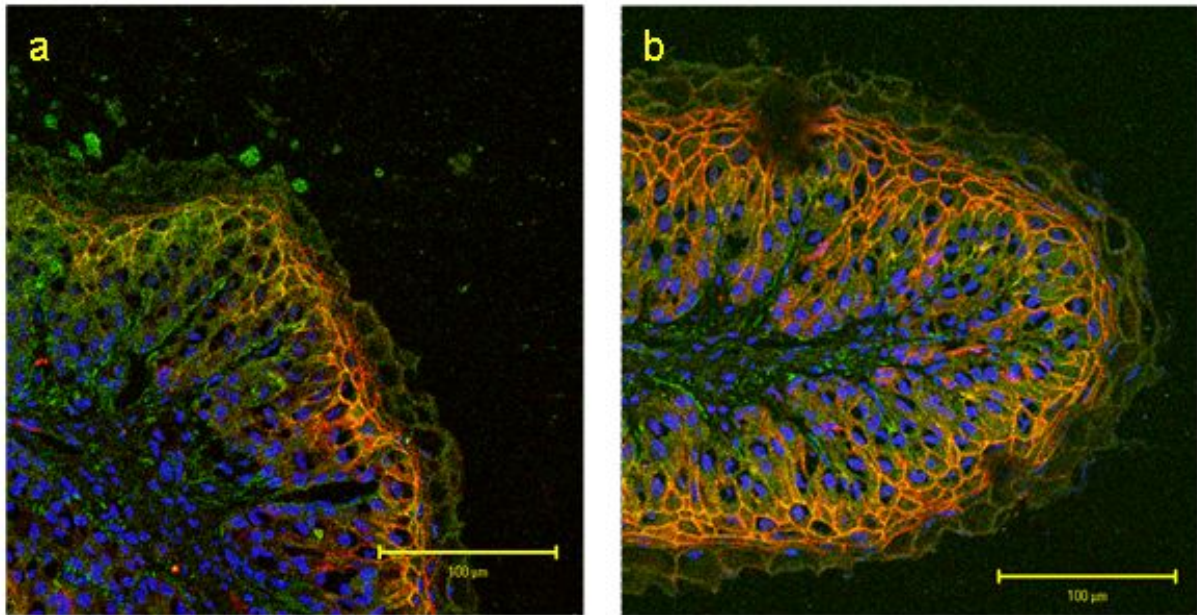


Abbildung 22

Querschnitt durch das Psalterepithelgewebe vor Trypsinbehandlung. Occludin grün, Claudin 1 (a) und Claudin 4 (b) rot, Coexpression beider Proteine gelb, Zellkerne blau.

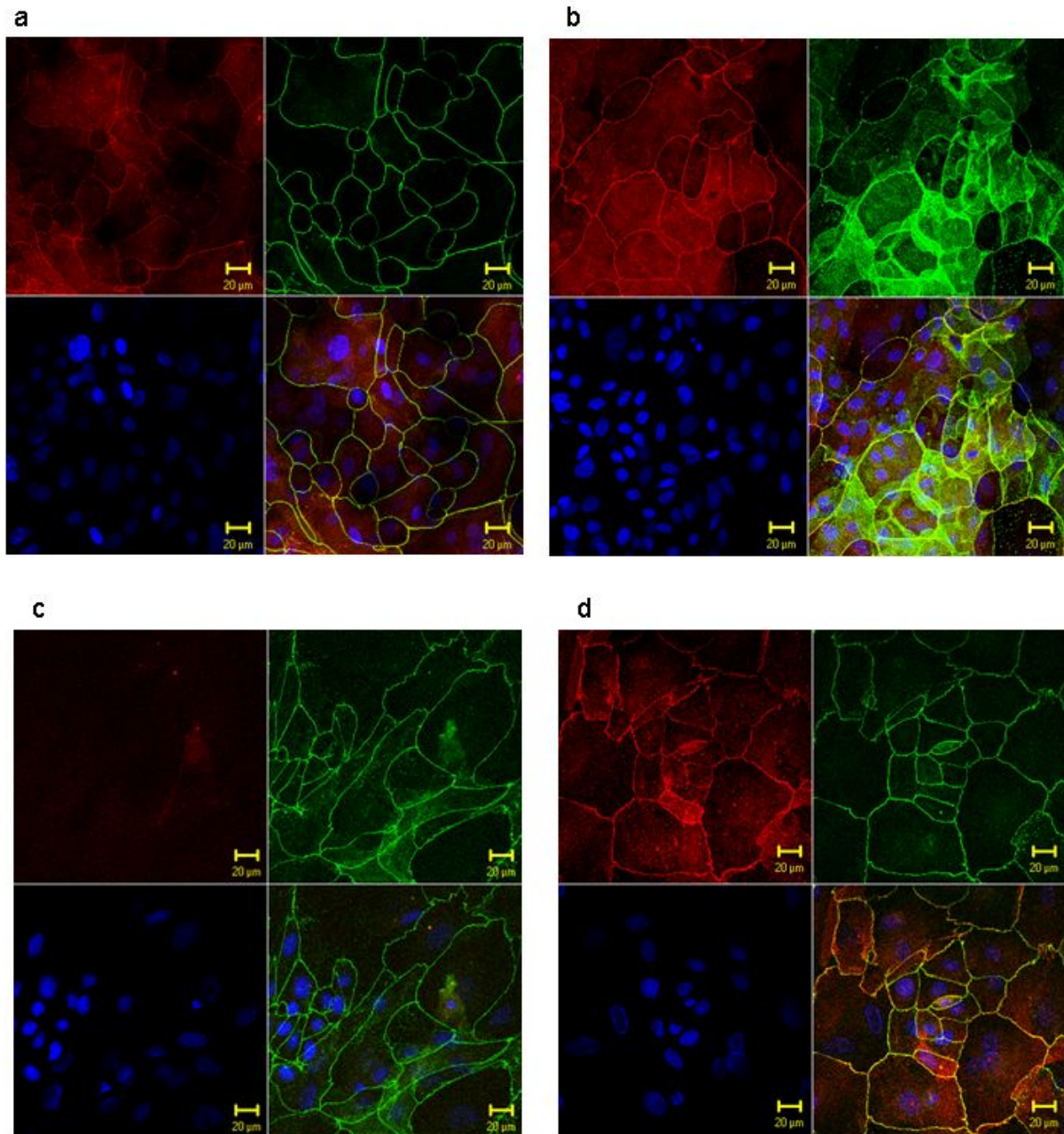


Abbildung 23

Immunhistochemische Färbung der Tight Junction Proteine Occludin, Claudin 1, 4, 5 und 7 der Psalter-Primärzellen.

a) Claudin 1 rot, Occludin grün

b) Claudin 4 grün, Occludin rot

c) Claudin 5 rot, Occludin grün

d) Claudin 7 rot, Occludin grün

Die Coexpression von Occludin und Claudin ist gelb dargestellt, die Zellkerne sind blau gefärbt. Claudin 1 (a), Claudin 4 (b), und Claudin 7 (d) sind deutlich nachweisbar. Eine spezifische, mit der Zellmembran colokalisierte Darstellung von Claudin 5 kann trotz Übersteuerung nicht dargestellt werden.

4.4 Ergebnisse der Patch-Clamp-Experimente

Ziel dieser Studie war es, die Anionenleitfähigkeit an isolierten Pansen- und Psalterepithelzellen zu untersuchen. Die Patch-Clamp-Technik ist das einzige Verfahren, mit dem Ströme, die durch Kanäle in der Zellmembran fließen, direkt gemessen werden können. Hierbei ist es sogar möglich, die Ströme von wenigen Piko-Ampere, die durch einzelne Kanalproteine geleitet werden, direkt nachzuweisen. Im Material und Methodenteil findet sich eine detaillierte Beschreibung des Versuchsaufbaus, des Meßverfahrens und der Identifizierung der gemessenen Ströme.

4.4.1 Ganzzellmessungen an isolierten Pansenepithelzellen

4.4.1.1 Chloridleitfähigkeit

Zur Bestimmung der Chloridleitfähigkeit wurden die Zellen mit Hilfe der Pipette mit einer Natriumgluconat Lösung gefüllt und mit einer physiologischen NaCl-Ringer Lösung überspült (genaue Zusammensetzung der Lösungen sh. Anhang). Mit Ausnahme der Calciumkonzentration und der Chloridkonzentration entsprach die Zusammensetzung der Pipettenlösung der Badlösung; insbesondere waren die Konzentrationen von Natrium ($138 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) und Kalium ($5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) in Bad und Pipette identisch.

Nach einer Äquilibrierungsphase mit Einstrom der Pipettenlösung in die Zelle wurde diese mit Hilfe eines automatisierten Protokolls auf verschiedene Potentiale geklemmt; die induzierten Ströme wurden gemessen (sh. Material und Methoden). Hierbei konnte beobachtet werden, dass die Ströme bei positivem Potential deutlich höher waren als bei negativem Potential. Theoretisch kann dieser Strom bei Depolarisation der Zelle auf einem Ausstrom von Kationen aus der Pipette durch die Zellemembran ins Bad beruhen, oder aber auf einem Einstrom von Chlorid aus dem Bad in die Zelle.

Um zwischen diesen Möglichkeiten zu differenzieren, wurden $128 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Chlorid (von insgesamt $147,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) im Bad durch $128 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Gluconat ersetzt, bei sonst identischer Zusammensetzung der Lösungen. Beim Gluconat handelt es sich um ein Anion, welches aufgrund seines großen Durchmessers schlecht von Anionenkanälen geleitet wird. Der Ersatz von Chlorid durch Gluconat im Bad verringerte deutlich die Stromantwort auf einen positiven Spannungspuls (sh. Abbildung 24), der im Mittel nur noch $32,04 \pm 1,36 \%$ des Stroms zu Beginn der Messung betrug ($n = 142$, $p < 0,001$, sh. Abbildung 28 und Tabelle 2). Nach erneuter Zugabe von Chlorid in die Perfusionslösung stiegen die Ströme wieder an.

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Chlorid, und nicht Natrium oder ein anderes Kation für den Strom bei Depolarisation verantwortlich ist. Bei positivem Pipettenpotential werden negativ geladene Ionen aus der Badlösung durch die Zellmembran hindurch zur Pipettenelektrode hingezogen. Somit stellen die bei Depolarisation gemessenen Ströme den Chloridioneneinstrom von der Badlösung durch die Zellmembran zur Pipettenelektrode dar.

Die Ströme im negativen Bereich, die einem Natriumeinstrom in die Zelle hinein entsprechen dürften, änderten sich bei den Lösungswechseln nicht signifikant, wie zu erwarten, da die Natriumionenkonzentration in den Perfusions- und Pipettenlösungen immer konstant blieb. Die Ursache für die leichten Schwankungen könnte unter Umständen auf Aktivierung von Ionenkanälen durch Schwellungseffekte beruhen (sh. Abschnitt Hypoosmolare Lösungen).

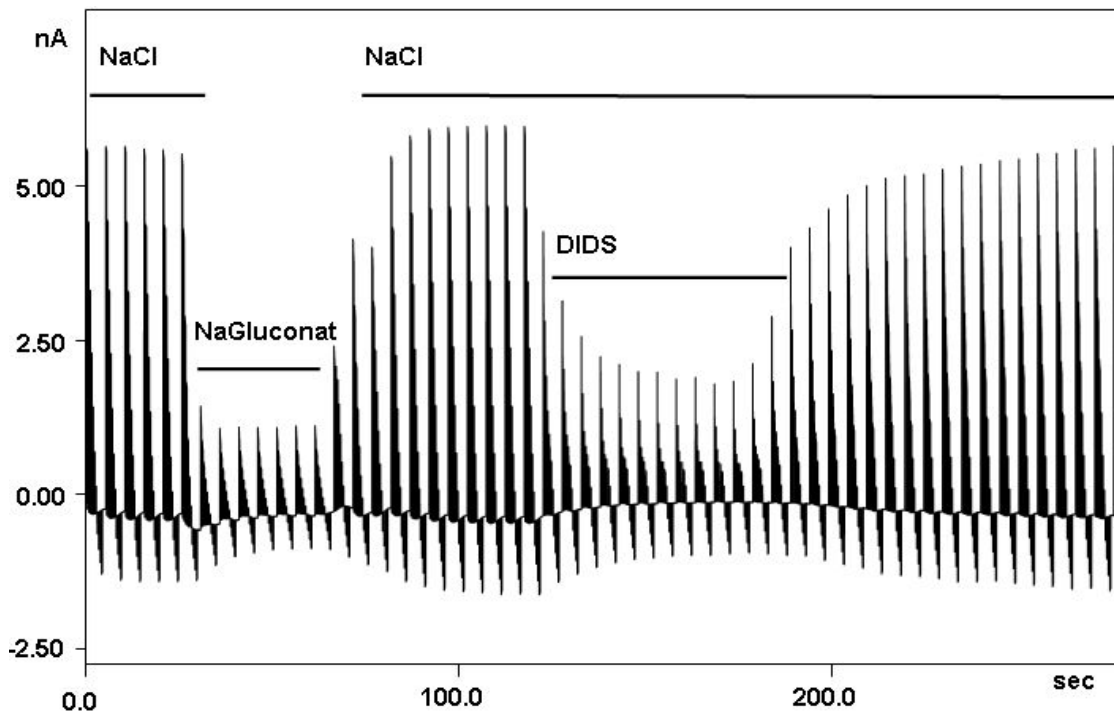


Abbildung 24

Darstellung einer Original-Ganzzellmessung einer Pansenepithelzelle, welche mit einer Natriumgluconatlösung gefüllt war. Zu Beginn der Messung befand sich eine NaCl-Lösung im Bad. Anschließend wurden $128 \text{ mM} \cdot \text{l}^{-1}$ Chlorid im Bad durch $128 \text{ mM} \cdot \text{l}^{-1}$ Gluconat ersetzt, wobei sich die sonstigen Ionenkonzentrationen nicht änderten.

Zeitgleich mit dem Lösungswechsel sanken die bei positivem Potential gemessenen Ströme. Bei erneutem Wechsel zur NaCl-Lösung stiegen die Ströme wieder an. Diese Ergebnisse lassen sich dadurch deuten, dass Chlorid anders als Gluconat durch eine selektive Leitfähigkeit die Zellmembran passieren kann. Bei Zugabe des selektiven Anionenkanalblockers DIDS, der die Leitfähigkeit von Anionen, besonders von Chlorid blockiert (Hille, 2001; Jentsch *et al.*, 2002), wurde der Chlorideinstrom ebenfalls signifikant gehemmt. Nach Auswaschen von DIDS aus der Perfusionslösung wurde der Effekt auf den Chloridstrom aufgehoben, der DIDS-Effekt war demnach reversibel. Die hier untersuchte Pansenepithelzelle zeigt also eindeutig eine durch DIDS reversibel blockierbare Chloridleitfähigkeit.

Das Umkehrpotential änderte sich nach dem Wechsel zur Natriumgluconatlösung im Mittel von $-28,76 \pm 0,71$ mV in NaCl-Lösung ($n = 186$) auf $9,57 \pm 0,84$ mV ($n = 142$, $p < 0,001$, sh. Tabelle 1). Die Zellen werden somit durch den Ersatz von Chlorid durch Gluconat signifikant depolarisiert. Bei der gewählten Zusammensetzung der Lösungen mit äquimolaren Mengen an Natrium intra- und extrazellulär kommt für das negative Membranpotential in Gegenwart von Chlorid nur das Anion als ursächlich in Frage; dieses Ergebnis ist also beweisend für eine Anionenleitfähigkeit.

Zusätzlich zu dem kontinuierlichen Pulsprotokoll wurde ebenfalls ein konventionelles Pulsprotokoll in der Ganzzellkonfiguration durchgeführt. Durch diese Art der Darstellung wird der zeitliche Verlauf der gemessenen Ströme nach dem depolarisierenden Puls erkennbar (sh. Abbildung 25).

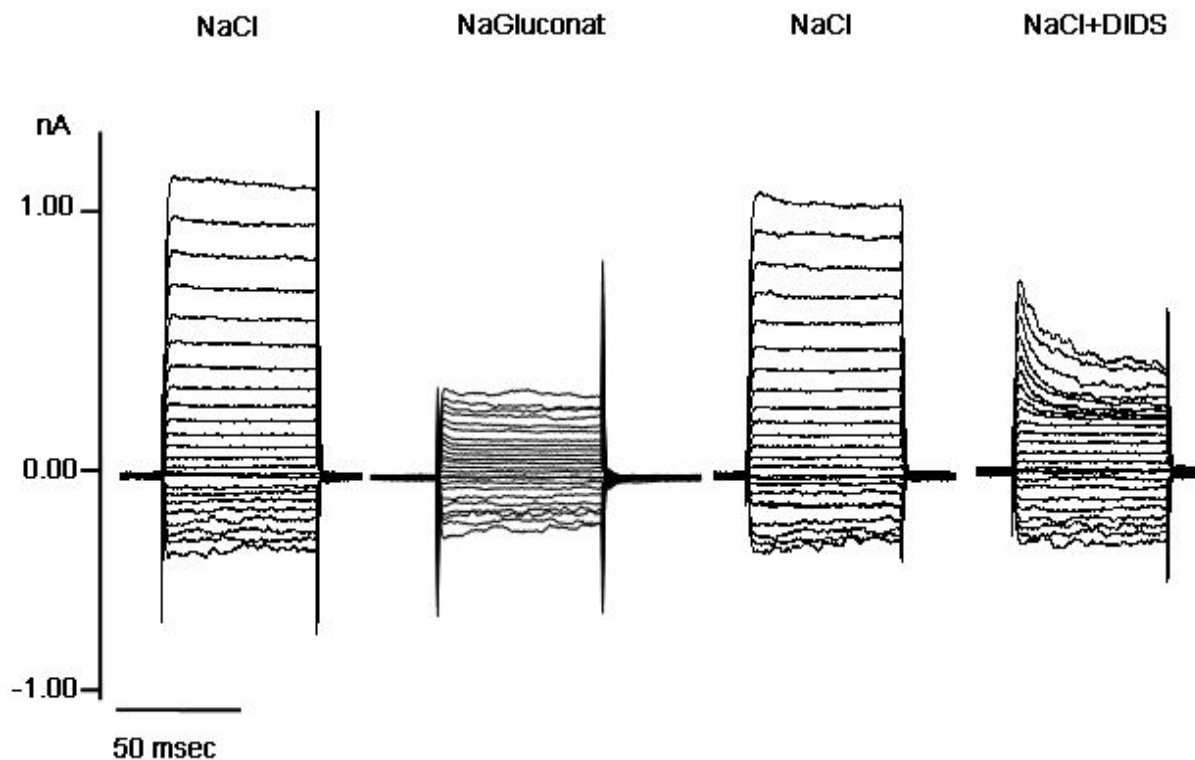


Abbildung 25

Konventionelles Pulsprotokoll einer Pansenepithelzelle in der Ganzzellkonfiguration, die nacheinander mit verschiedenen Badlösungen überspült wurde. Nachdem Chlorid aus der Badlösung durch Gluconat ersetzt wurde, sank der Chlorideinstrom, da Gluconat ein großes Molekül ist und nicht die Ionenkanäle der Zellmembran permeieren kann. Bei erneuter Zugabe von Chlorid in die Perfusionslösung stieg der Chlorideinstrom wieder an.

Bei Zugabe des Anionenkanalblockers DIDS in die NaCl-Perfusionslösung ist in dieser Form der Aufzeichnung der zeit- und spannungsabhängige Block besonders gut dargestellt. Mit

zunehmender Depolarisationsdauer nimmt die Blockade der Ströme durch DIDS zu (sh. Diskussion).

4.4.1.2 Kanalblocker

4.4.1.2.1 DIDS

Bei Applikation des spezifischen Anionenkanalblockers DIDS (4,4'-Diisothiocyanostilben-2,2'-Disulfonsäure) bei einer Konzentration von $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ wurde der Strom bei Depolarisation signifikant gehemmt (sh. Abbildungen 24, 25 und 28). Dieser Strom betrug im Mittel $33 \pm 4 \%$ des Stromes ohne DIDS ($p < 0,001$, $n = 13$, sh. Abbildungen 24, 25, 28 und Tabelle 2); somit wurde durch DIDS der Chlorideinstrom in die Zellen signifikant gehemmt. Dieser Effekt war reversibel und auch mehrmals hintereinander an derselben Zelle wiederholbar. Bei Zugabe von DIDS war die Änderung des Umkehrpotentials von im Mittel $-28,76 \pm 0,71 \text{ mV}$ in NaCl-Lösung auf $-34,33 \pm 2,99 \text{ mV}$ allerdings nicht signifikant ($p = 0,715$, $n = 13$, sh. Tabelle 1); dieser Befund wird im Diskussionsteil erläutert werden.

4.4.1.2.2 NPPB

Bei Applikation von $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ des Chloridkanalblockers NPPB (5-nitro-2-3-phenylpropylamino-benzoat gelöst in DMSO) wurde der Chlorideinstrom signifikant gehemmt, wobei der Strom im Mittel auf $34 \pm 5 \%$ des Ausgangswertes abfiel ($p < 0,001$, $n = 7$ sh. Abbildung 28 und Tabelle 2). Dieser Effekt war ebenfalls reversibel und auch mehrmals hintereinander an derselben Zelle wiederholbar. Der Chlorideinstrom war somit reversibel NPPB-sensitiv. Bei Zugabe von NPPB war die Änderung des Umkehrpotentials von im Mittel $-28,76 \pm 0,71 \text{ mV}$ in NaCl-Lösung auf $-22,56 \pm 3,92 \text{ mV}$ wiederum nicht signifikant ($p = 0,080$, $n = 7$, sh. Tabelle 1).

4.4.1.2.3 Gadolinium

Bei Applikation von $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ des Blockers Gadolinium nahm der Auswärtsstrom kontinuierlich ab ($n = 3$). Dieser Effekt war nicht reversibel. Im Mittel betrug der Auswärtsstrom unter Zugabe von Gadolinium $32,61 \pm 23,17 \%$ des Auswärtsstroms zu Beginn der Messung ($p = 0,101$, sh. Abbildung 28 und Tabelle 2). Das Umkehrpotential änderte sich im Mittel von $-28,76 \pm 0,71 \text{ mV}$ in NaCl-Lösung auf $-22,83 \pm 3,92 \text{ mV}$ ($p = 0,125$, sh. Tabelle 1).

4.4.1.2.4 Arachidonsäure

Arachidonsäure wird in der Literatur als sogenannter „Enhancer“ (Aktivator) von Chloridkanälen beschrieben (Sabirov *et al.*, 2006). Um den Effekt von Arachidonsäure auf Pansenepithelzellen zu untersuchen, wurden $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Arachidonsäure in die NaCl-

Perfusionslösung appliziert. Dies führte zu einer stetigen Abnahme der durch Depolarisation aktivierten Ströme ($n = 3$). Nach Auswaschen des Blockers aus der Badlösung stieg der Strom nicht wieder an (sh. Abbildung 26), und betrug im Mittel nur $76,45 \pm 25,11$ % des Ausgangswertes ($p = 0,447$, sh. Abbildung 28 und Tabelle 2). Das Umkehrpotential änderte sich im Mittel von $-28,76 \pm 0,71$ mV in NaCl-Lösung auf $-17,74 \pm 4,59$ mV ($p = 0,125$, sh. Tabelle 1). Vermutlich handelt es sich um eine irreversible Bindung an den Kanal. Unspezifische Effekte können nicht ausgeschlossen werden.

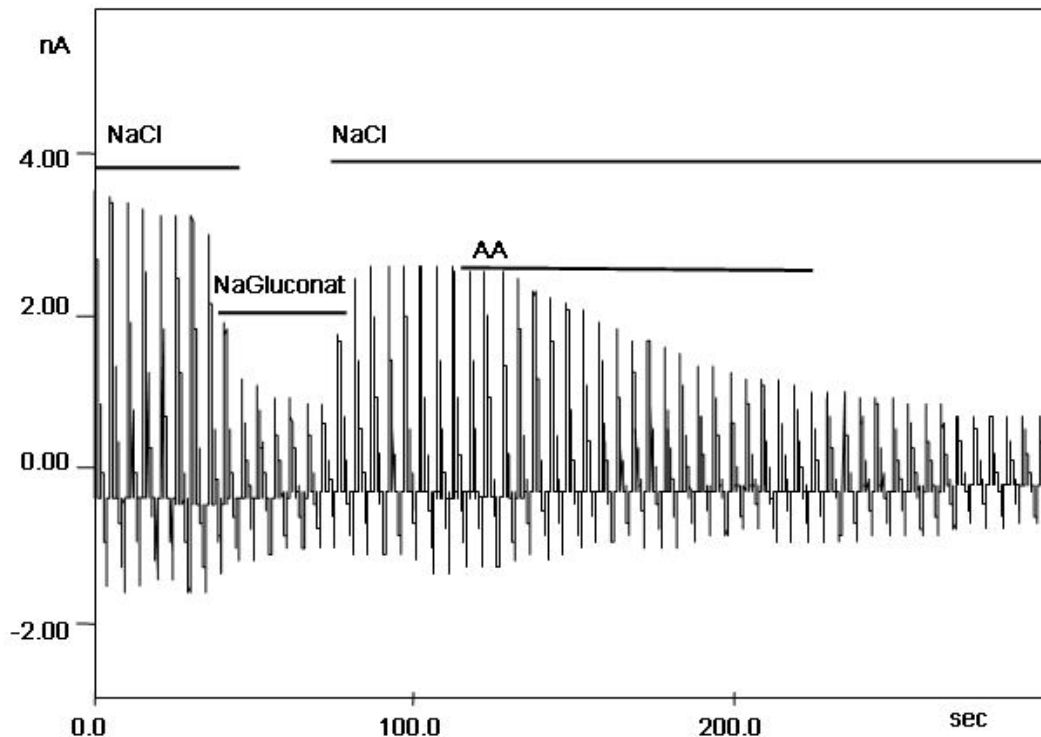


Abbildung 26

Ganzzellmessung einer mit Natriumgluconat gefüllten Pansenepithelzelle. Bei Zugabe von Arachidonsäure (AA) in die NaCl-Perfusionslösung kommt es zu einem deutlichen Stromabfall. Nach dem Auswaschen der Arachidonsäure aus der Perfusionslösung stiegen die Ströme nicht wieder an.

4.4.1.2.5 Ionomycin

Ionomycin ist ein Calciumionophor, das Poren in der Zellmembran bildet, durch die Calcium hineinströmen kann. Hierdurch können calciumaktivierte Chloridkanäle aktiviert und nachgewiesen werden (Gandhi *et al.*, 1998; Gruber *et al.*, 1998). Bei Applikation von $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Ionomycin auf Pansenepithelzellen in NaCl-Perfusionslösung wurde hingegen kein Anstieg der Stromantwort beobachtet, der unter Zugabe von Ionomycin im Mittel $80,83 \pm 11,33$ % des Wertes zu Beginn der Messung betrug ($n = 3$, $p = 0,233$, sh. Abbildung 28 und Tabelle 2). Das Umkehrpotential änderte sich bei Zugabe von Ionomycin in die

Badlösung nicht signifikant (von im Mittel $-28,76 \pm 0,71$ mV in NaCl-Lösung auf $-23,19 \pm 4,10$ mV ($p = 0,25$, sh. Tabelle 1)).

4.4.1.2.6 Glibenclamid

Glibenclamid ist ein Kaliumkanalblocker; es blockt aber auch spezifisch den CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), während andere Anionenkanäle nicht beeinflusst werden (Vandorpe *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2004). Glibenclamid zeigte bei einer Konzentration von $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ keine signifikanten Effekte auf den Chlorideinstrom. Im Mittel betrug der Strom bei Zugabe von Glibenclamid $95 \pm 2,39$ % des Stroms bei +100 mV zu Beginn der Messung ($n = 13$, $p = 0,424$, sh. Abbildungen 27, 28 und Tabelle 2). Das Umkehrpotential änderte sich nicht (sh. Tabelle 1). Dies spricht gegen die Beteiligung eines CFTR an der Chloridleitfähigkeit des Pansenepithels.

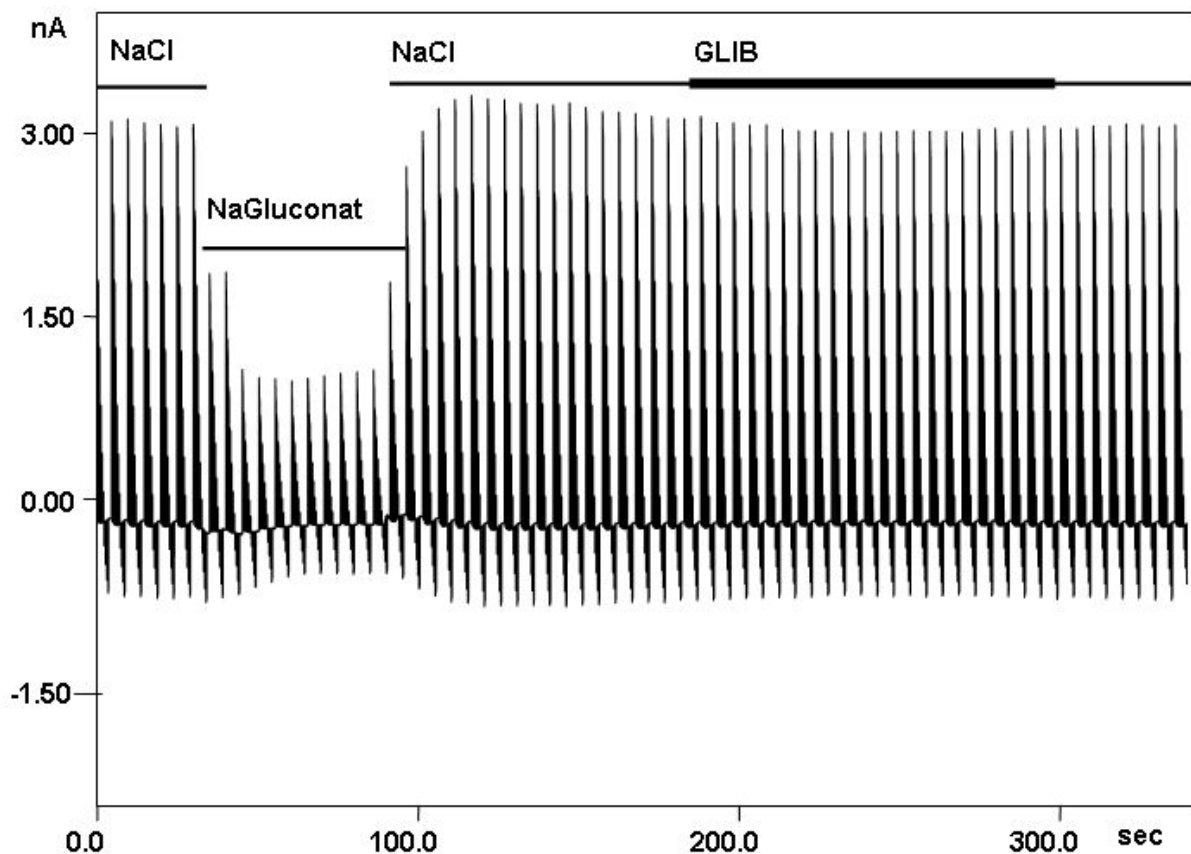


Abbildung 27

Ganzzelleableitung einer mit Natriumgluconat gefüllten Pansenepithelzelle. Die Chloridlösung im Bad wurde zunächst durch Gluconat ersetzt. Zu sehen ist eine sofortige Abnahme des Stroms bei depolarisiertem Pipettenpotential; bei erneuter Zugabe von Chlorid in die Perfusionslösung steigt der Chlorideinstrom sofort wieder an. Somit ist an dieser Pansenepithelzelle die Chloridleitfähigkeit eindeutig vorhanden. Bei Zugabe des Blockers des CFTR Glibenclamid (GLIB) in die NaCl-Perfusionslösung ist kein Effekt auf den Chlorideinstrom zu sehen. Daher ist eine Beteiligung des CFTR an der beobachteten Chloridleitfähigkeit unwahrscheinlich.

Tabelle 1

Umkehrpotential (mV)	n	Mittel	Std. Fehler	Median	25 %	75 %	p vs NaCl0
NaCl 0	186	-28.76	0.71	-29.54	-35.02	-23.89	
NaGlu	142	9.57	0.84	8.34	4.06	15.19	<0,001
NaCl + DIDS	13	-34.33	2.99	-37.65	-42.33	-23.66	0,715
NaCl + NPPB	7	-22.56	3.92	-20.58	-30.83	-14.04	0,080
NaCl + Gd	3	-22.83	4.47	-25.03	-29.07	-16.58	0,125
NaCl + AA	3	-17.74	4.59	-17.28	-23.57	-11.90	0,125
NaCl + IONO	3	-23.19	4.13	-23.69	-28.49	-17.89	0,250
NaCl + GLIB	9	-33.50	2.56	-32.47	-40.53	-25.09	0,542
NaCl 1	181	-26.72	0.79	-28.88	-33.52	-19.29	0,076

Auswärtsstrom

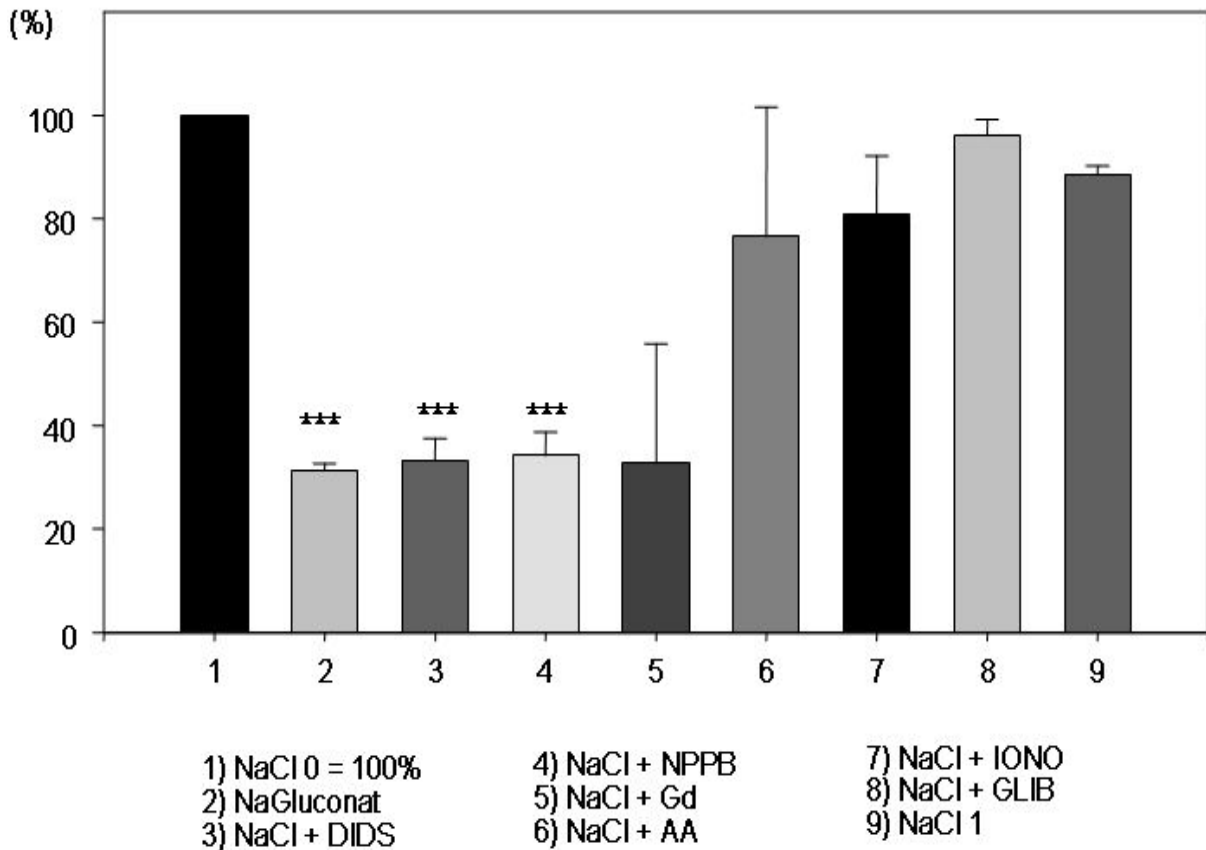


Abbildung 28

Effekte verschiedener Blocker auf den Strom bei +100 mV (Mittelwert + SEM angegeben in Prozent vom Strom zu Beginn der Messung in NaCl-Lösung, * = p < 0.05; **=p < 0.01; *** = p < 0.001).

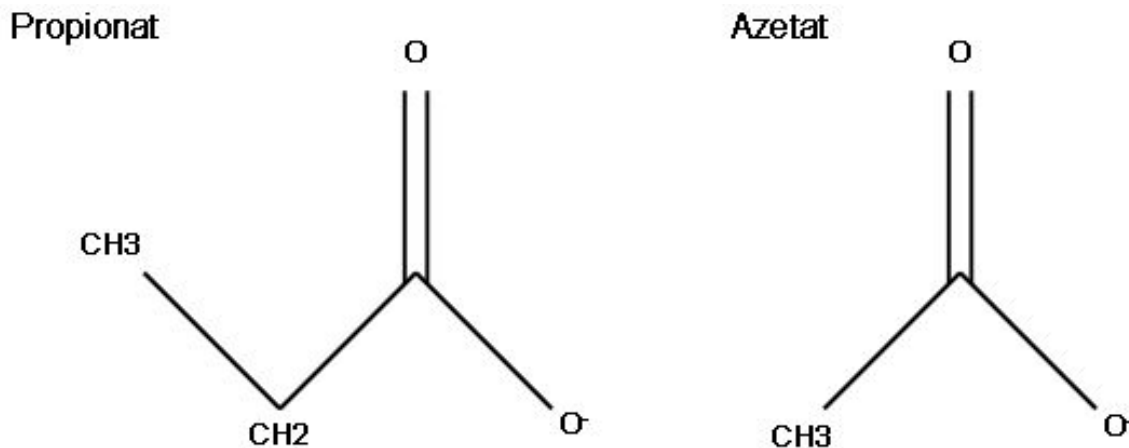
Tabelle 2

Strom bei	n	Mittel	Std. Fehler	Median	25 %	75 %	p vs. NaCl0
NaCl 0	186	100	0	100	100	100	
NaGlu	142	32.04	1.36	26.83	22.19	38.84	<0,001
NaCl + DIDS	13	32.79	3.95	26.98	24.01	43.54	<0,001
NaCl + NPPB	7	34.13	4.56	39.15	23.85	40.36	<0.001
NaCl + Gd	3	32.61	23.17	9.82	9.24	61.67	0,101
NaCl + AA	3	76.45	25.11	97.60	44.21	103.41	0,447
NaCl + IONO	4	80.83	11.33	80.55	66.14	95.58	0.233
NaCl + GLIB	9	95.76	2.39	98.96	86.08	102.26	0,424
NaCl 1	178	111.61	5.58	97.59	87.85	116.27	0,906

4.4.2 Propionatleitfähigkeit

Im Pansen der Wiederkäuer ist Chlorid nur in geringen Mengen vorhanden. In Abhängigkeit von der Speichelproduktion liegt die Chloridkonzentration im Pansenumen zwischen 10 – 40 mmol·l⁻¹. Durch die im Pansen lebenden Mikroorganismen werden die mit dem Futter aufgenommenen Kohlenhydrate zu großen Mengen kurzkettige Fettsäuren (55 – 100 mol·d⁻¹) fermentiert, die quantitativ die bedeutsamsten Anionen im Pansensaft darstellen. Propionat (C₃H₆O₂) ist im Pansen der Wiederkäuer nach Azetat (C₂H₃O₂) mengenmäßig das zweitwichtigste kurzkettige Fettsäureanion (Strukturformel sh. Abbildung 29).

Gängigen Modellen zufolge werden Fettsäuren apikal sowohl durch Diffusionsprozesse als auch durch spezifische Proteine (Aschenbach *et al.*, 2009) aufgenommen, jedoch ist der basolaterale Effluxweg unklar. In Patch-Clamp-Studien an isolierten Pansenepithelzellen (Stumpff *et al.*, 2009) konnte gezeigt werden, dass die basolaterale Chloridleitfähigkeit des Pansens (Diernaes *et al.*, 1994; Leonhard-Marek *et al.*, 2006) einem großen Kanal entspricht, der auch für das Anion des Azetats permeabel ist. Es stellt sich die Frage, in wieweit der Kanal auch für das Anion Propionat durchlässig ist und somit als Effluxweg aus dem Epithel in Frage kommt.

**Abbildung 29**

Strukturformel von Propionat und Azetat

Die Messungen zur Untersuchung der Propionatleitfähigkeit wurden in Analogie zu denen für den Nachweis der Leitfähigkeit für Chlorid und Azetat durchgeführt (Stumpff *et al.*, 2009). In der Pipettenlösung befand sich eine Natriumgluconatlösung und im Bad eine NaCl-Lösung. Wieder wurden die durch das Pulsprotokoll induzierten Ströme zunächst in der NaCl Lösung gemessen. Anschließend wurde Chlorid durch Gluconat in der Perfusionslösung ersetzt (sh. Abbildung 30). Wie bereits bei den Versuchen zur Untersuchung der Chloridleitfähigkeit sank die gemessene Stromantwort bei Depolarisation (Erläuterung sh. Kap. Chloridleitfähigkeit). Beim Austausch von Gluconat durch Propionat in der Perfusionslösung kam es zu einem signifikanten Anstieg der Stromantwort bei Depolarisation. Im Mittel betragen die Ströme in Natriumgluconatlösung $32,04 \pm 1,36 \%$ im Vergleich zu den Werten in NaCl-Lösung (= 100 %) und stiegen beim Wechsel zur Propionatlösung im Mittel auf $55,77 \pm 9,57 \%$ ($n = 89$, $p < 0,001$). Bei erneuter Gabe von Gluconat in die Badlösung sanken die Ströme wieder. Dieses Phänomen wurde von einer signifikanten Änderung des Umkehrpotentials begleitet (Details sh. Kap. Effekte auf das Umkehrpotential).

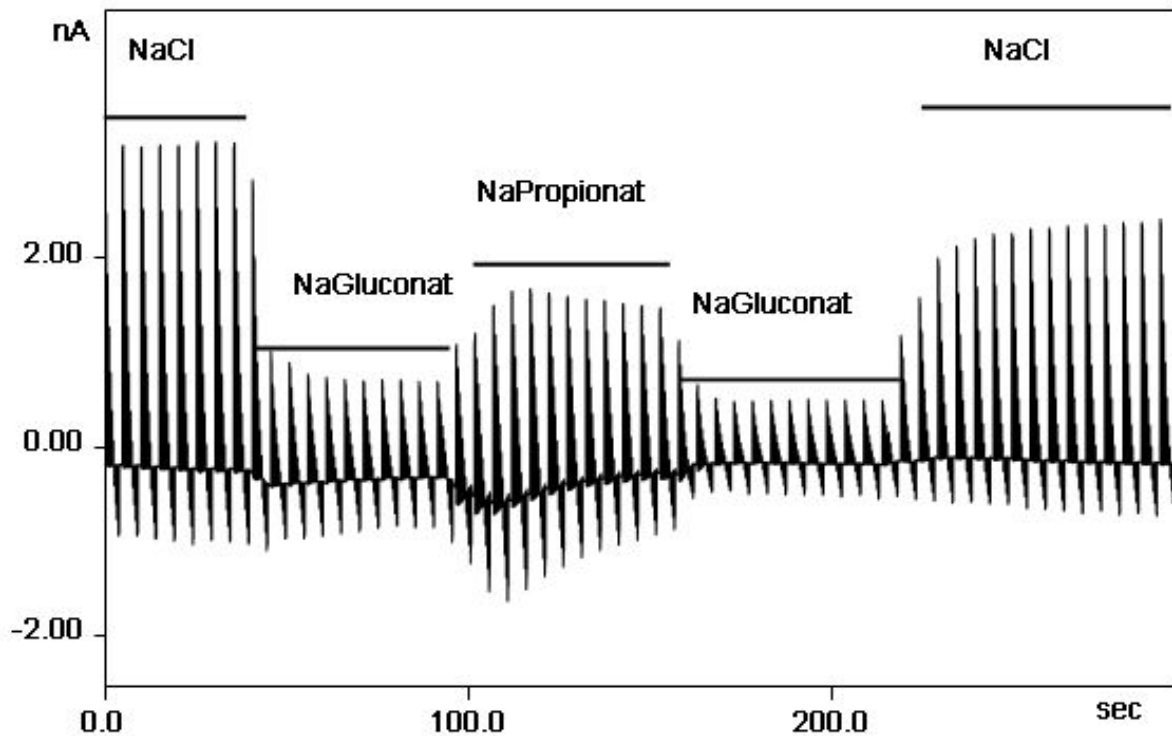


Abbildung 30

Ganzzellmessung einer mit Natriumgluconatlösung gefüllten Pansenepithelzelle. Beim Ersatz von Chlorid durch Gluconat in der Perfusionslösung kommt es zu einem signifikanten Stromabfall. Anschließend wurde Gluconat durch Propionat in der Perfusionslösung ersetzt. Die gemessene Stromantwort ist signifikant größer als in Gluconatlösung und wurde von einer signifikanten Änderung des Umkehrpotentials begleitet (sh. Abbildungen 38, 39 und Tabellen 3 und 4). Nach Auswaschen von Propionat auf der Badlösung durch Gluconat war wieder ein Absinken des Stromes zu sehen. Bei erneuter Gabe von NaCl in die Badlösung stiegen die Ströme wieder an.

Die NaCl-Lösung im Bad wurde dann durch eine Natriumpropionatlösung ersetzt (sh. Abbildung 31, genaue Zusammensetzung der Versuchslösungen sh. Anhang). Anschließend wurde der Anionenkanalblocker DIDS in die Natriumpropionatlösung hinzugegeben. Die gemessenen Ströme wurden fast vollständig blockiert. Die bei Hyperpolarisation gemessenen Natriumströme änderten sich nicht signifikant.

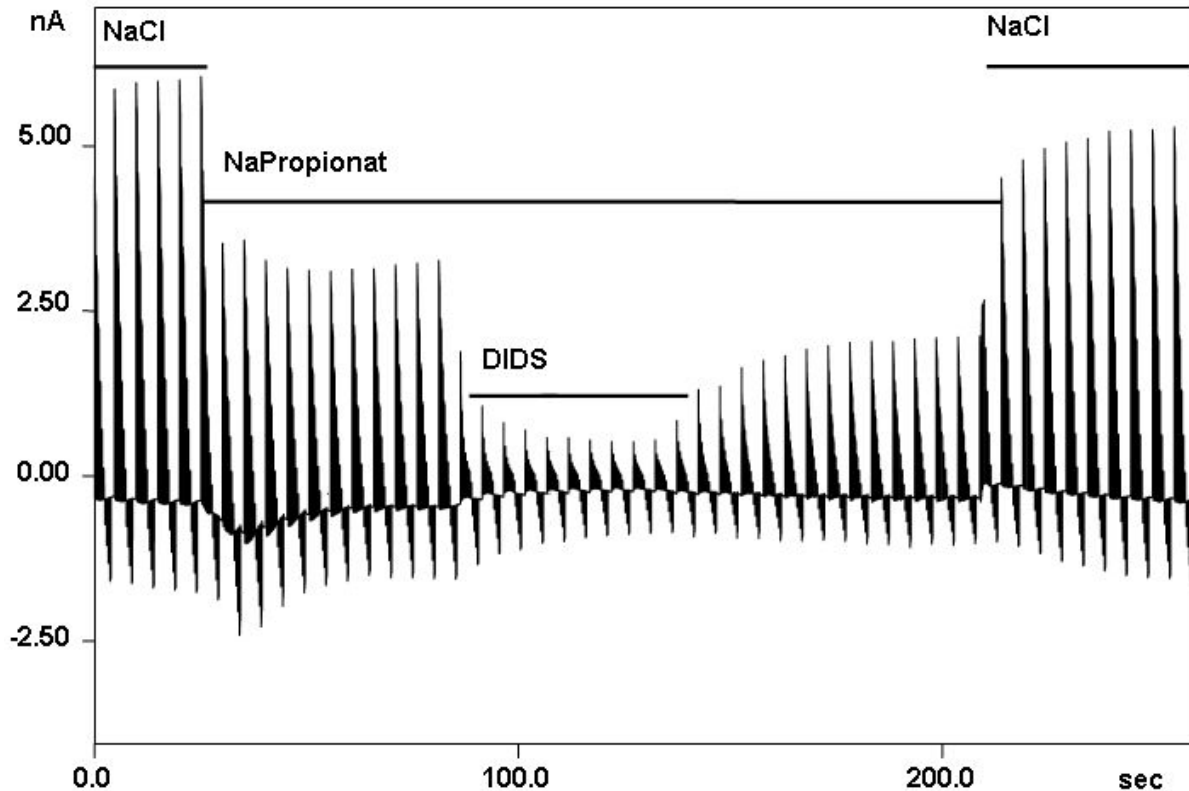


Abbildung 31

Ganzzellmessung einer mit Natriumgluconatlösung gefüllten Pansenepithelzelle. Die NaCl-Lösung im Bad wurde durch eine Natriumpropionatlösung ersetzt. Fast zeitgleich mit dem Lösungswechsel, war ein Absinken des Stromes bei +100 mV zu sehen. Bei Zugabe des Anionenkanalblockers DIDS erfolgte ein weiterer Abfall. Der DIDS-Effekt war reversibel; beim Auswaschen von DIDS mit Natriumpropionatlösung stieg der Strom wieder an. Bei erneuter Zugabe von NaCl-Lösung stieg der Strom wieder auf das Niveau zu Beginn der Messung. Pansenepithelzellen exprimieren also eine DIDS-sensitive Leitfähigkeit für Propionat.

Neben dem kontinuierlichen Pulsprotokoll wurde ebenfalls ein konventionelles Pulsprotokoll aufgezeichnet (sh. Abbildung 32).

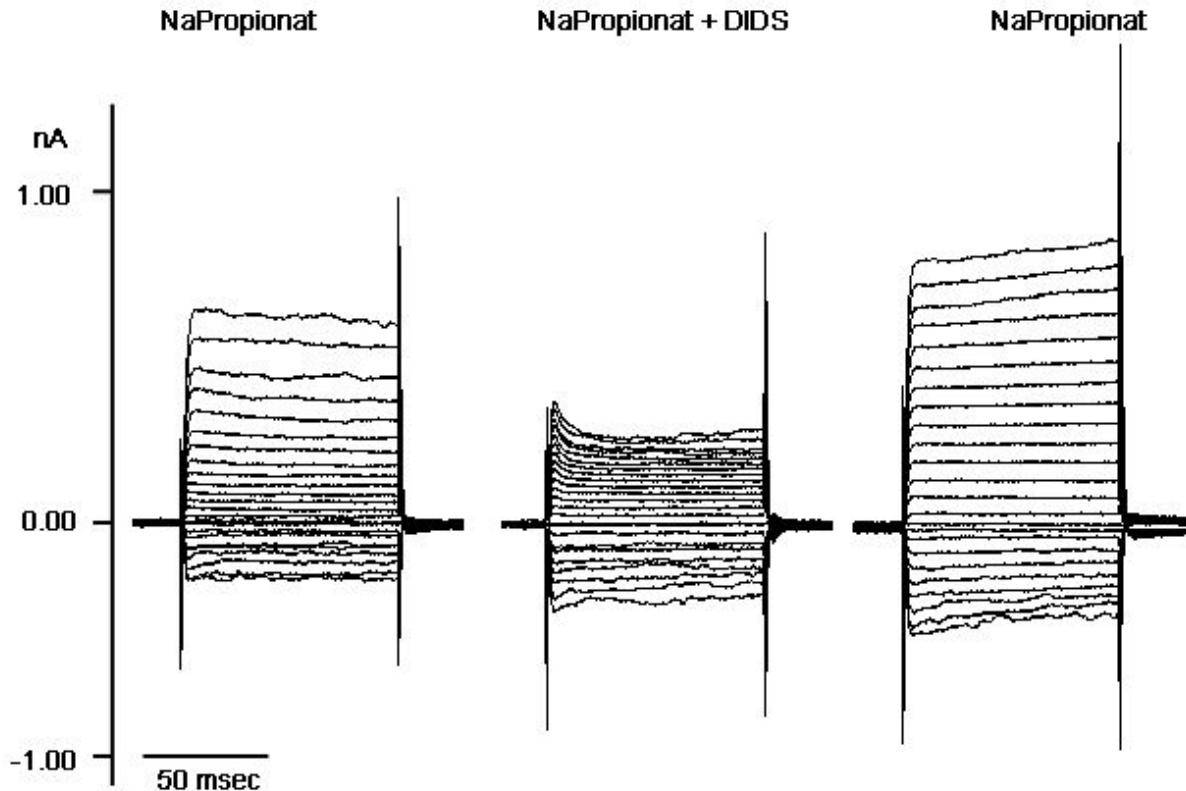


Abbildung 32

Konventionelles Pulsprotokoll: Ganzzelleableitung einer mit Natriumgluconatlösung gefüllten Pansenepithelzelle. Es wurde zunächst eine Natriumpropionatlösung appliziert, anschließend wurde der Anionenkanalblocker DIDS ($200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) appliziert. Die hemmende Wirkung von DIDS auf die Ströme bei positivem Pipettenpotential ist deutlich zu sehen, hingegen fehlte ein signifikanter Effekt auf die Ströme bei hyperpolarisiertem Potential. Dieses Ergebnis lässt sich als Hemmung des Einstroms des Propionat-Anions in die Zelle deuten. Wieder fällt die bereits vom Chloridstrom bekannte zeitliche Kinetik des DIDS-Blocks auf, mit Zunahme der blockierenden Wirkung mit der Dauer der Depolarisation.

4.4.2.1 Statistische Datenauswertung

Da die Pansenepithelzellen in der Größe recht stark variierten, schwankten die gemessenen Ströme von Zelle zu Zelle trotz gleicher Bedingungen stark. Hintergrund hierfür ist die unterschiedliche Anzahl vorhandener und offener Kanäle auf der Zellmembran. Um die Auswärtsströme der verschiedenen Zellen besser miteinander vergleichen zu können, kommen verschiedene Normierungsverfahren in Frage. Zunächst können natürlich die Absolutwerte der Ströme miteinander verglichen werden; hierbei besteht jedoch die Gefahr, dass wegen der großen Varianz der Einzelwerte Effekte nicht erkannt werden. Weiterhin können die gemessenen Auswärtströme (pA) durch die Kapazität der Zelle (pF) geteilt und somit auf die individuelle Zellgröße normiert werden (sh. Abbildungen 33 und 34). Wegen der Notwendigkeit, zusätzlich zum Strom auch die Kapazität zu ermitteln, besteht die Möglichkeit eines zusätzlichen, u. U. systematischen Fehlers. Schließlich können die Ströme auf den in

NaCl gemessenen Anfangswert normiert und in % dieses Wertes dargestellt werden (vgl. Stumpff, 2009); hierbei geht Information verloren (absolute Größe des Stromes in pA), aber die Antworten der Zellen auf verschiedene Lösungen / Blocker können sehr gut miteinander verglichen werden (sh. Abbildung 36). Um Normierungsfehler auszuschließen, sollen in exemplarischer Form die für die Propionatleitfähigkeit gewonnenen Daten im Folgenden mit allen drei Normierungsmethoden analysiert und statistisch verglichen werden.

4.4.2.2 Absolutwerte der bei Depolarisation gemessenen Ströme (pA)

Da die gemessene Stromantwort von der Größe der untersuchten Zelle abhängt, ist vor allem beim Ausgangswert des Stromes in NaCl-Lösung (NaCl 0) die Streuung groß. Das Absinken des Stromes bei Zugabe von Gluconat in die Perfusionslösung ist bei allen gemessenen Zellen zu erkennen. Bei Zugabe von Propionat in die Badlösung steigen die Stromwerte bei allen Zellen wieder an. Nach dem Auswaschen von Propionat mit NaCl wird der Ausgangswert zu Beginn der Messung annähernd erreicht.

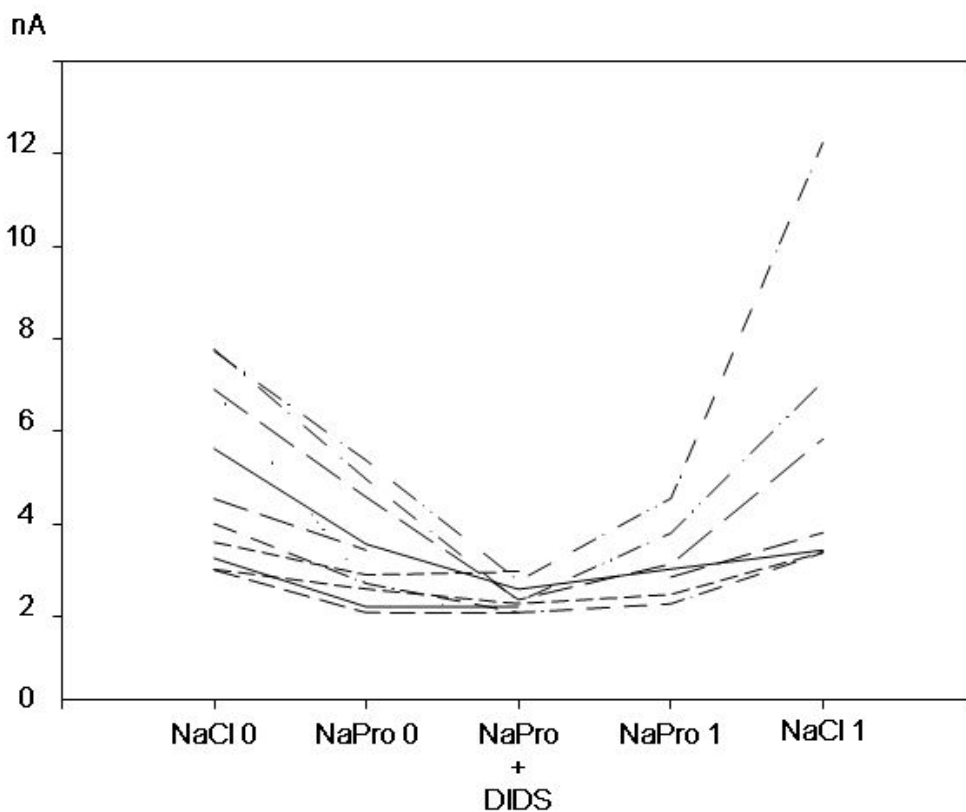


Abbildung 33

Linien diagramm der absoluten Werte des Stroms in nA bei Depolarisation (+100 mV). Eine Linie im Diagramm entspricht einer Zelle. Die in der Reihenfolge der applizierten Perfusionslösungen war: NaCl (NaCl0), Natriumpropionat (NaPro), Natriumpropionat + DIDS, (NaPro 1 und NaCl 1 zum Auswaschen).

4.4.2.3 Normierung des Auswärtsstroms auf die Kapazität (oc)

Die elektrische Kapazität ist eine physikalische Größe (Formelzeichen c , von lateinisch *capacitas* = Fassungsvermögen, SI-Einheit: Farad (F)), die die Fähigkeit, elektrische Ladung zu speichern definiert. Die Kapazität ist somit ein indirektes Maß für die Größe der Zelloberfläche. Die elektrische Kapazität wird als Verhältnis der Ladungsmenge Q zur angelegten Spannung U bestimmt:

$$C (F) = Q (As) / U (V).$$

Die Kapazität wird automatisch von der Software des Patch-Clamp-Verstärkers aus der Abklingkurve berechnet und ausgegeben.

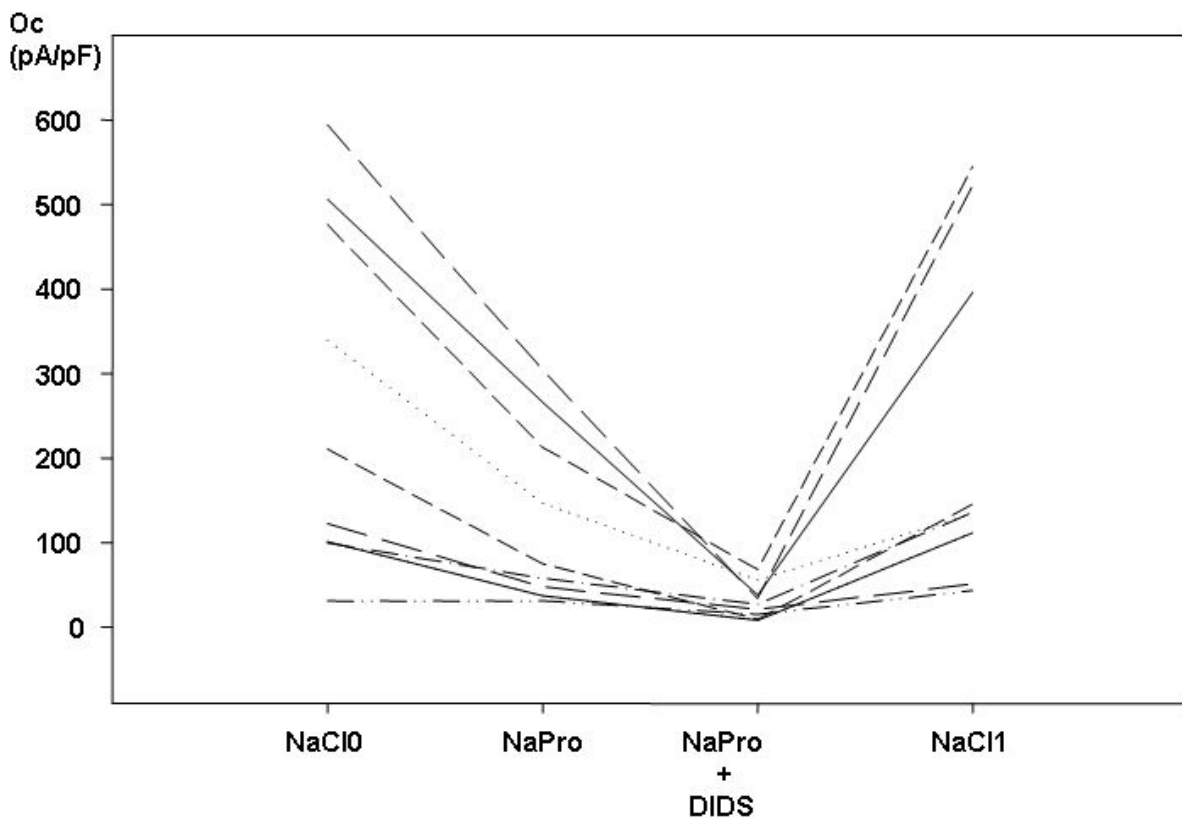


Abbildung 34

Liniendiagramm der auf die Kapazität der Zelle normierten Ströme bei Depolarisation. Abgebildet sind die auf die Kapazität normierten Stromantworten aller untersuchten Zellen auf einen Spannungspuls von +100 mV, wobei jede Linie einer Zelle entspricht ($n = 13$). Mit dem Bad wurden nacheinander folgende Lösungen zugeführt: NaCl-Lösung (NaCl0) – Natriumpropionatlösung (NaPro) – Natriumpropionatlösung + DIDS (NaPro + DIDS) – NaCl-Lösung (NaCl1). Während sich große Unterschiede in der absoluten Höhe der Ströme zeigten, war der Verlauf der Stromantwort bei allen Zellen gleich.

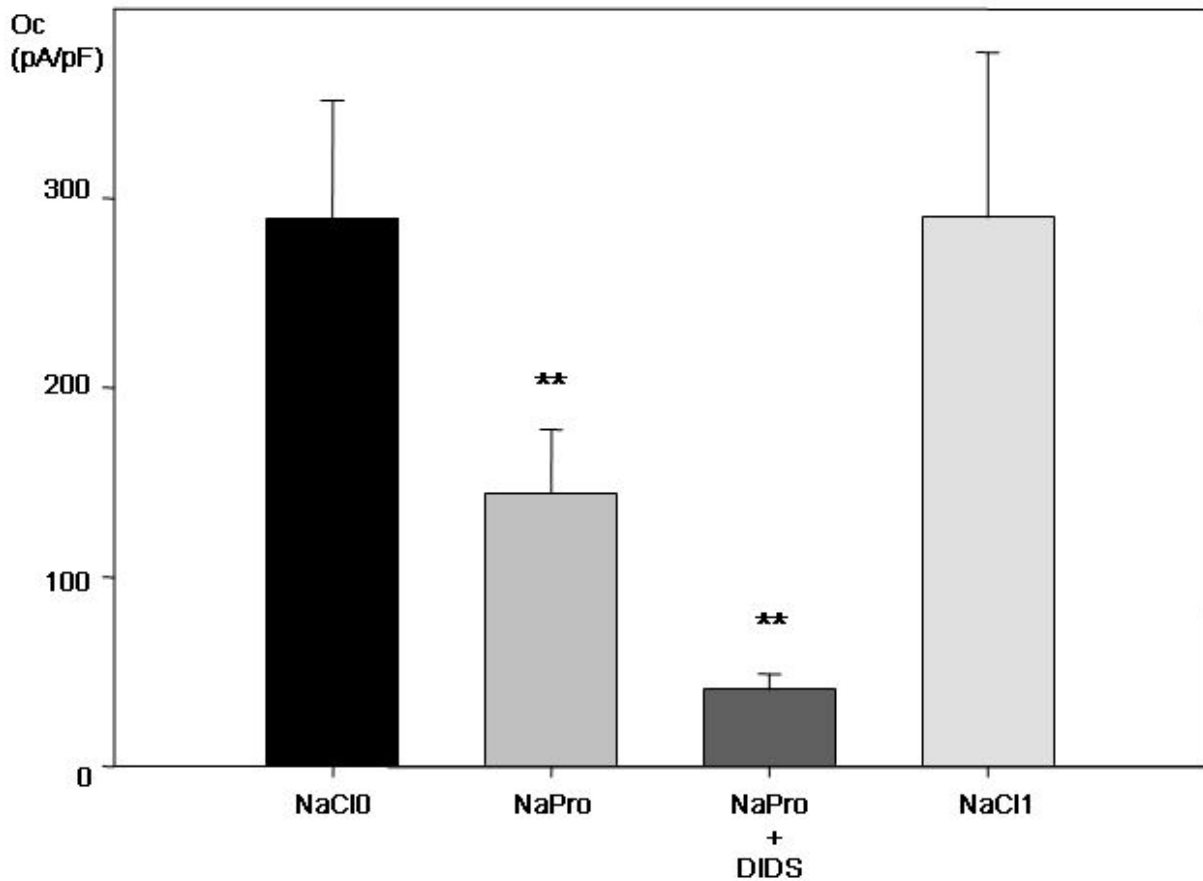


Abbildung 35

Vergleich der normierten Auswärtsströme (Mittelwert und SEM) auf die Kapazität (oc), (** = $p < 0.01$).

Tabelle 3

Oc (pA/pF) n = 13	Mittel	Std. Fehler	Median	25 %	75 %
NaCl 0	193.33	10.16	169.96	71.32	291.21
NaGlu	57.68	3.93	46.37	20.36	79.75
NaPro	105.77	10.50	90.30	53.39	141.36
NaPro + DIDS	43.05	10.23	35.76	21.01	64.52
NaCl 1	197.02	11.55	158.78	71.24	297.97
p1	0,002				
p2	0,002				
p3	0,465				

p1: Vergleich von NaCl0 und NaPro

p2: Vergleich von NaPro und NaPro + DIDS

p3: Vergleich von NaCl0 und NaCl1

4.4.2.4 Normierung auf den Ausgangswert: Auswärtsströme (in %)

Bei mit Natriumgluconatlösung gefüllten Pansenepithelzellen wurde zu Beginn jeder Messung der in NaCl Lösung gemessene Strom (bei +100 mV) mit 100 % gleichgesetzt. Die Ströme in Natriumpropionatlösung (NaPro), Natriumpropionat + DIDS (NaPro + DIDS) und NaCl-Lösung zum Auswaschen (NaCl1) wurden prozentual zum Chlorideinstrom (NaCl0) zu Beginn der Messung angegeben (sh. Abbildung 36). Im Mittel betrug der Strom bei +100 mV in propionathaltiger Lösung $55,77 \pm 9,57$ % des Stroms in chloridhaltiger Lösung zu Beginn der Messung. Der in Propionatlösung gemessene Reststrom ließ sich durch den Anionenkanalblocker DIDS signifikant hemmen (Kap. Eingesetzte Kanalblocker).

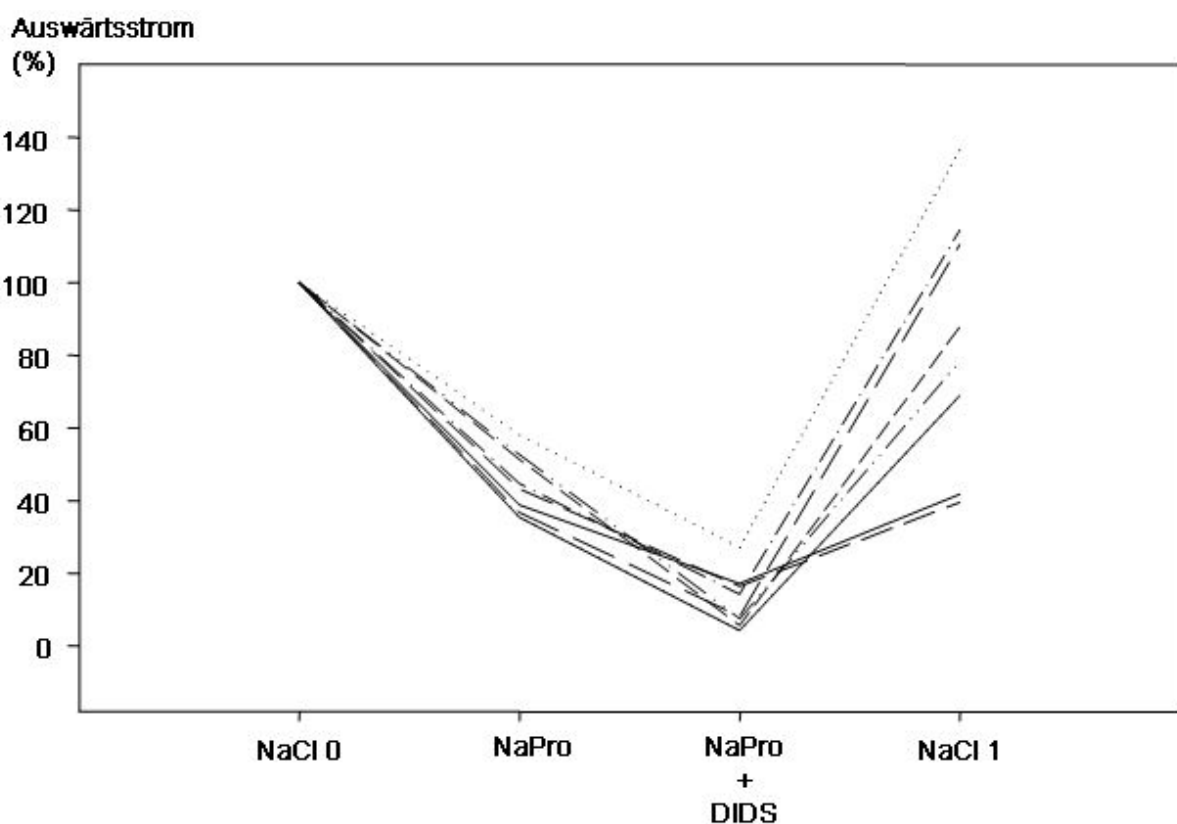


Abbildung 36

Liniendiagramm der Ströme in %. Abgebildet sind hier die Verläufe der Ströme der untersuchten Zellen ($n = 13$). Man sieht, dass bei allen Zellen der Wechsel von der Natriumchlorid- zur Natriumpropionatlösung eine Verringerung des Stromes verursachte. Die Zugabe des Anionenkanalblockers DIDS hemmte bei allen Zellen den Reststrom in Propionatlösung fast vollständig. Bei erneuter Zugabe von Natriumchlorid in die Badlösung stieg der Strom aller Zellen wieder an.

4.4.2.5 Effekte der eingesetzten Kanalblocker

4.4.2.5.1 DIDS

Der Anionenkanalblocker DIDS blockierte bei einer Konzentration von $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ deutlich den Propionateinstrom ($n = 13$, $p < 0,001$, Abbildungen 31 – 35). Der blockierende Effekt von DIDS auf den Propionatstrom war reversibel und ebenfalls mehrmals hintereinander an derselben Zelle wiederholbar. Im Mittel betrug der Strom unter Zugabe von DIDS $22,90 \pm 7,41 \%$ (siehe Abbildung 38 und Tabelle 3). Der Strom bei Hyperpolarisation änderte sich nicht signifikant bei Zugabe von DIDS. Die Änderung des Umkehrpotentials unter Zugabe von DIDS war ebenfalls nicht signifikant ($n = 13$, $p = 0,107$, sh. Abbildung 39 und Tabelle 4).

4.4.2.5.2 pCMBs

Die organische Quecksilberverbindung p-Chloromercuribenzoessäure (pCMBs) zeigte bei einer Konzentration von $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ebenfalls eine Hemmung des auf den Einstrom von Propionat zurückzuführenden Strom ($n = 8$, $p = 0,021$, Abbildungen 37, 38 und Tabelle 3). Der pCMBs-Effekt war ebenfalls reversibel. Der Strom bei Hyperpolarisation änderte sich nicht signifikant bei Zugabe von pCMBs. Unter Zugabe von pCMBs gab es keine signifikante Änderung des Umkehrpotentials ($n = 8$, $p = 0,021$, sh. Abbildung 39 und Tabelle 4).

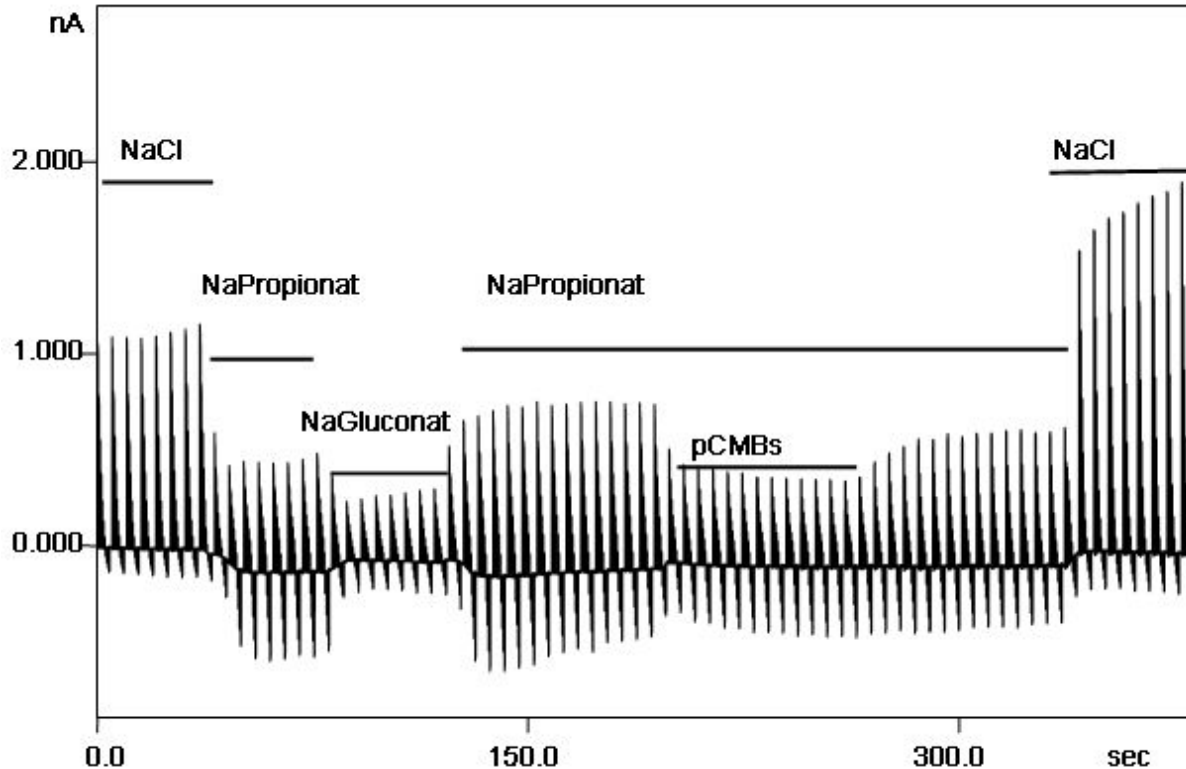


Abbildung 37

Ganzzellmessung einer mit Natriumgluconat gefüllten Pansenepithelzelle. Zu sehen ist die Erniedrigung des Stroms bei Depolarisation bei Zugabe von Propionat und pCMBs in die Perfusionslösung.

NPPB

Bei Applikation von $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ des Chloridkanalblockers NPPB (5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoat) wurde der Auswärtsstrom signifikant gehemmt ($n = 7$, $p < 0,001$, Abbildung 38 und Tabelle 3). Dieser Effekt war ebenfalls reversibel und auch mehrmals hintereinander an derselben Zelle wiederholbar. Der Propionatstrom war somit reversibel NPPB-sensitiv. Die Änderung des Umkehrpotentials unter Zugabe von NPPB war nicht signifikant ($n = 8$, $p = 0,809$, sh. Abbildung 39 und Tabelle 4).

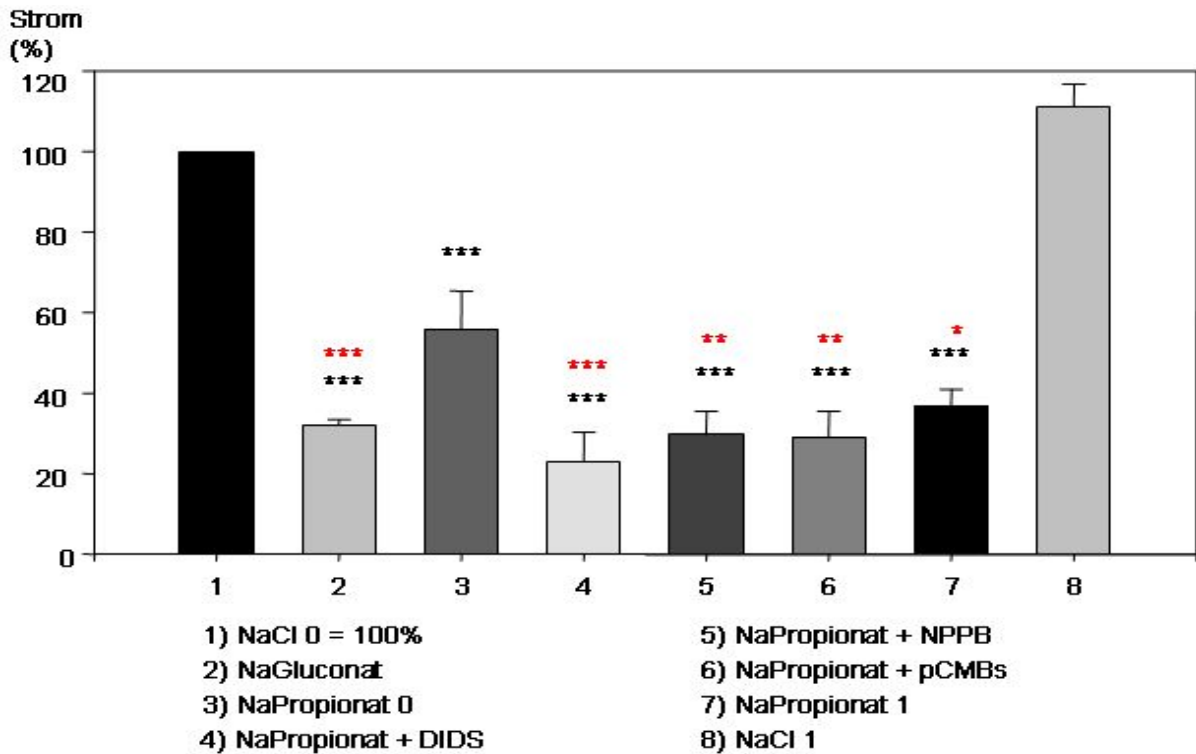


Abbildung 38

Effekte der eingesetzten Kanalblocker auf den Auswärtsstrom (Mittelwert + SEM). Vergleich der Auswärtsströme (in %) zum Natriumchloridauswärtsstrom zu Beginn der Messung (= 100 %). Der Strom in Propionatlösung ist zwar geringer als der in Chloridlösung, aber signifikant höher als der in Gluconatlösung (sh. Tabelle 3), (* = $p < 0.05$; **= $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$, rot * im Vergleich zu NaPro 0, schwarz * im Vergleich zu NaCl 0).

Tabelle 3

Strom bei +100mV (%)	n	Mittel	Std. Fehler	Median	25 %	75 %	p vs NaCl 0	p vs NaPro
NaCl 0	186	100	0	100	100	100		<0,001
NaGlu	142	32.04	1.36	26.83	22.19	38,84	<0,001	<0,001
NaPro 0	53	55.77	9.57	40.21	33.57	56.38	<0,001	
NaPro + DIDS	13	22.90	7.41	14.92	6.57	37.84	<0,001	<0,001
NaPro + NPPB	7	29.55	5.90	26.56	19.62	32.15	<0,001	0,005
NaPro + pCMBs	8	28.99	6.50	24.52	20.28	38.16	<0,001	0,021
NaPro 1	20	36,93	3,96	34,33	23,61	48,86	<0,001	0,026
NaCl 1	181	111.21	5.56	97.28	87,09	38,84	0,905	<0,001

4.4.2.5.3 Effekte der eingesetzten Kanalblocker auf das Umkehrpotential

Um die Propionatleitfähigkeit näher zu untersuchen, wurden die Umkehrpotentiale der verschiedenen Badlösungen bestimmt. Beim Wechsel von NaCl-Lösung auf Natriumpropionatlösung änderte sich das Umkehrpotential im Mittel von $-28,76 \pm 0,71$ mV in NaCl-Lösung auf $-6,06 \pm 0,85$ mV in Natriumpropionatlösung ($n = 53$, $p < 0,001$, sh. Abbildung 39 und Tabelle 4). Das Umkehrpotential blieb jedoch im negativen Bereich; eine weitere Depolarisation auf im Mittel $9,57 \pm 0,84$ mV ($n = 53$, $p < 0,001$) konnte beim Wechsel zu einer Natriumgluconatlösung beobachtet werden, entsprechend einer Leitfähigkeit der Zelle für Propionat, die zwischen der für Chlorid und Gluconat liegt.

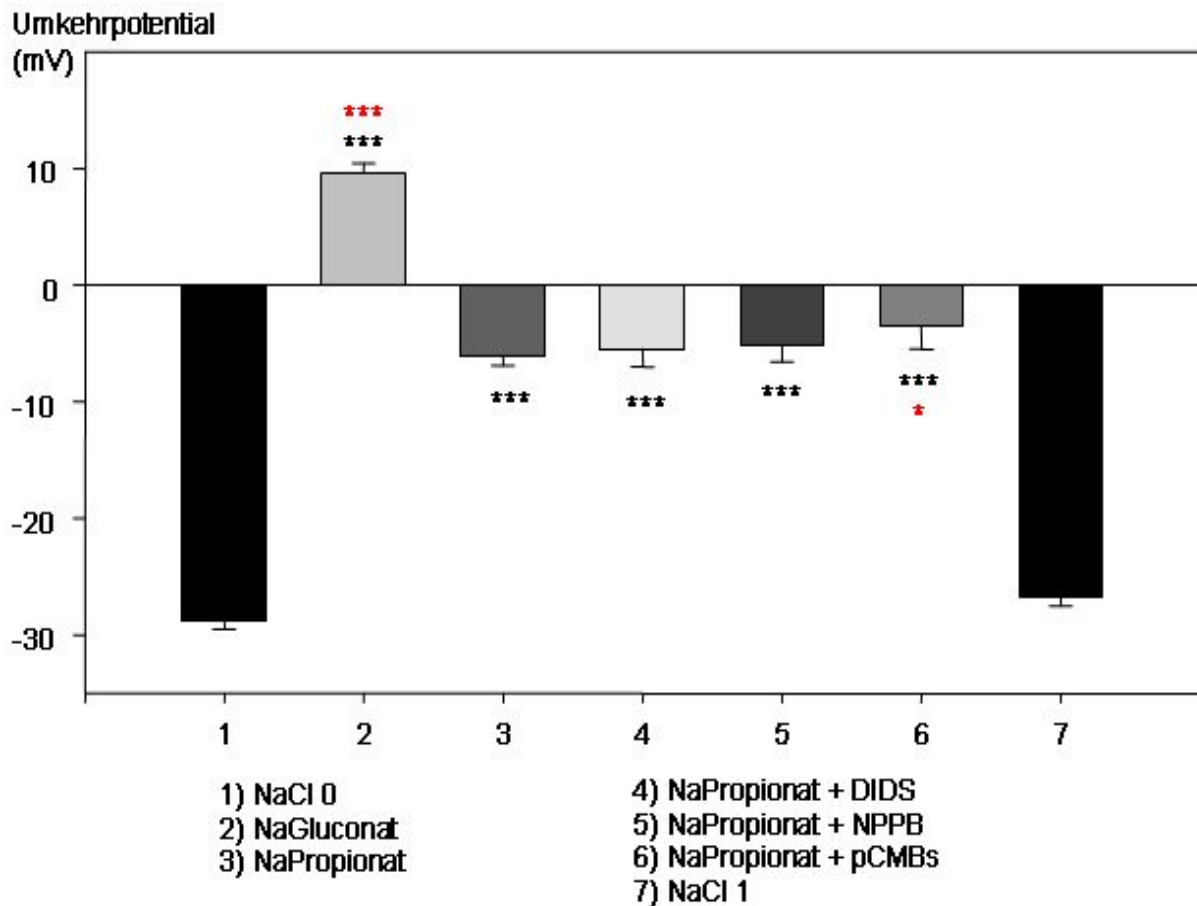


Abbildung 39

Umkehrpotentiale verschiedener Badlösungen (Mittelwert + SEM). Das Umkehrpotential in Natriumpropionatlösung war signifikant negativer als das in Natriumgluconatlösung, entsprechend einem Einstrom des Propionatanions in die Zellen. Bei Zugabe der verschiedenen Kanalblocker in die Natriumpropionatlösung gab es im Gegensatz zu den signifikanten Effekten beim Strom nur geringe Effekte auf das Umkehrpotential (sh. Diskussion). (* = $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$, rot * im Vergleich zu NaPropionat, schwarz * im Vergleich zu NaCl0).

Tabelle 4

Umkehrpotential (mV)	n	Mittel	Std.Fehler	Median	25 %	75 %	p vs NaCl0	p vs NaPro0
NaCl 0	186	-28.76	0.71	-29.60	-35.04	-23.80		<0,001
NaGluconat	142	9.57	0.84	8.31	4.03	15.22	<0,001	<0,001
NaPropionat	53	-6.06	0.85	-6.78	-10.55	-1.58	<0,001	
NaPro + DIDS	13	-5.48	1.53	-5.26	-7.55	-3.29	<0,001	0,107
NaPro + NPPB	7	-5.13	1.45	-6.01	-8.03	-3.73	<0,001	0,809
NaPro + pCMBs	8	-3.49	2.00	-2.49	-8.08	-0.33	<0,001	0,031
NaCl 1	179	-26.72	0.79	-28.97	-33.54	-19.23	0,076	<0,001

Zusammenfassend konnte durch den Wechsel zwischen Propionat und Gluconatlösung die relative Leitfähigkeit der Zellen in beiden Lösungen miteinander verglichen werden. Da die Ströme in Propionatlösung signifikant höher und die Umkehrpotentiale signifikant niedriger sind als in Gluconatlösung, kann man auf eine Leitfähigkeit für Propionat schließen. Dieses stützt die Ergebnisse, die mit Gabe des Blockers DIDS gewonnen wurden.

4.4.3 Möglicher Kationenkanal

Bei einigen Versuchen ergaben sich Hinweise für die Aktivierung des nicht selektiven Kationenkanals des Pansenepithels. Bei sieben Zellen (von insgesamt 53 Zellen) kam es bei Zugabe von Natriumpropionat in die Badlösung zu einer deutlichen Änderung des Stromes bei Hyperpolarisation (sh. Abbildung 40). Theoretisch denkbar ist zwar ein Efflux von Gluconat aus der Pipette ins Bad, die jedoch wegen der Größe des Gluconations und der ansonsten nachweisbar geringen Leitfähigkeit der Zellen für dieses Ion wenig wahrscheinlich erscheint. Eine Stimulation des Natriumeinstroms durch den nicht-selektiven Kationenkanal durch Propionat erscheint hingegen wesentlich plausibler. Die Stimulation von Kationenkanälen durch Exposition mit kurzkettigen Fettsäuren ist aus Untersuchungen anderer Präparationen gut bekannt (Diener *et al.*, 1994).

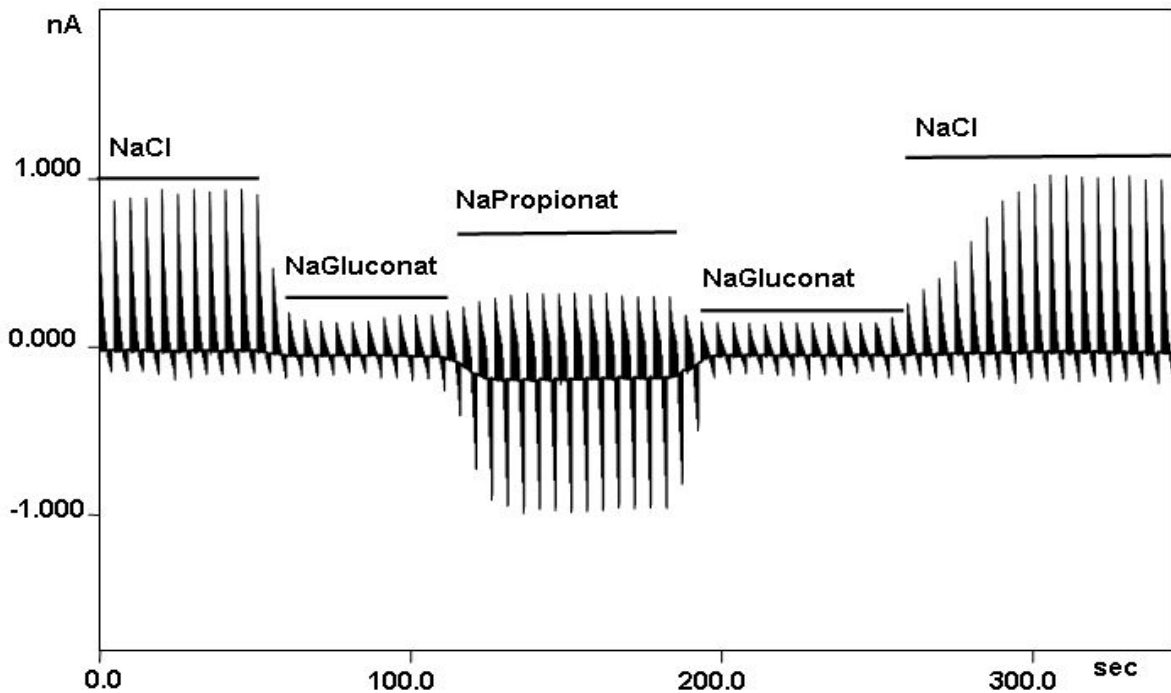


Abbildung 40

Ganzzellmessung einer Pansenepithelzelle, bei der unter Zugabe von Natriumpropionat in die Badlösung eine deutliche Änderung des Einwärtsstroms zu sehen war.

Diese Erklärung wird auch dadurch gestützt, dass der Anionenkanalblocker DIDS keinerlei Wirkungen auf diesen Einwärtsstrom zeigte, während die Wirkung des Blockers auf den durch Einstrom von Anionen bei positivem Potential bewirkten Stroms auch in diesen Zellen signifikant darstellbar war (sh. Abbildung 41). Bereits bei Exposition von Pansenepithelzellen mit Azetatlösungen konnte an einzelnen Zellen eine Aktivierung des nicht-selektiven Kationenkanals beobachtet werden, ohne dass die dafür verantwortlichen Gründe abschließend geklärt werden konnten (Stumpff *et al.*, 2009).

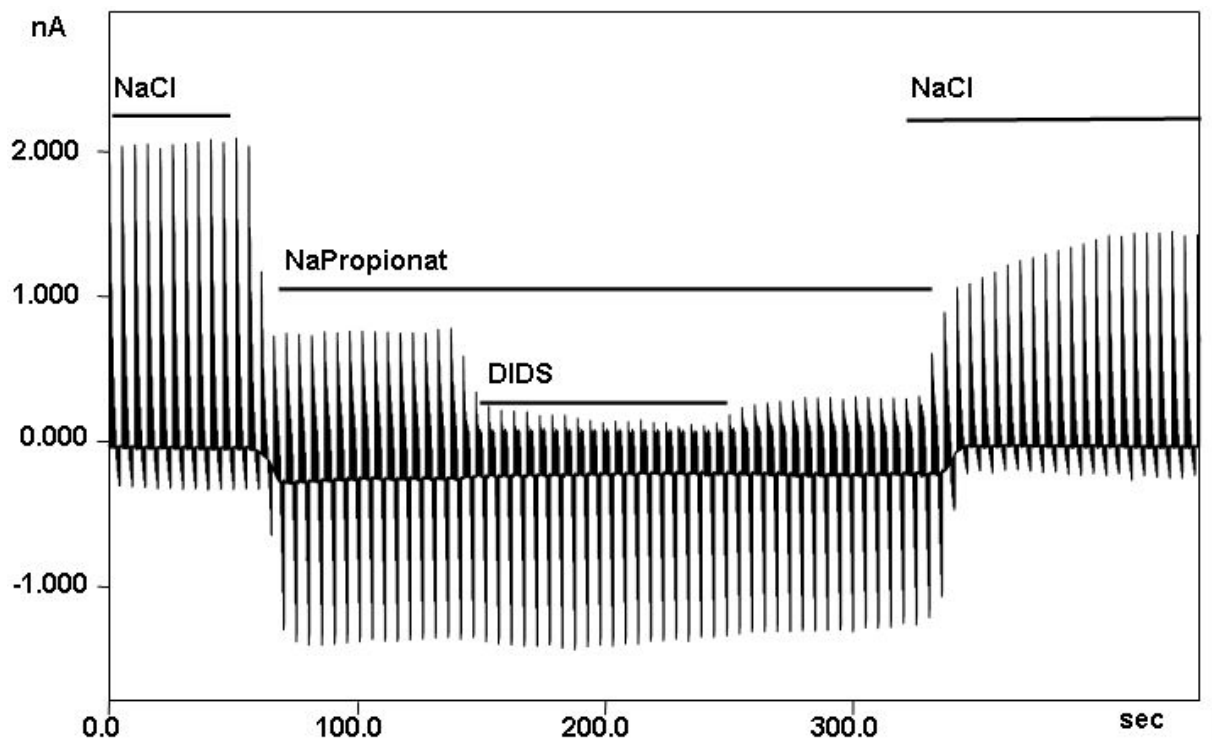


Abbildung 41

Bei dieser mit Natriumgluconatlösung gefüllten Pansenepithelzelle ist in der Ganzzellableitung bei negativen Potentialen der Natriumeinstrom deutlich zu sehen. Dieser war allerdings nicht DIDS-sensitiv.

Der nicht-selektive Kationenkanal ist sowohl am intakten Epithel des Pansens und des Psalters nachgewiesen worden und ist für den Natriumstrom über das Epithel hinweg verantwortlich (Brinkmann, 2006). Dieser Strom wurde auch an isolierten Zellen charakterisiert. Er leitet Kationen wie Natrium und Kalium, wobei divalente Kationen wie Calcium und Magnesium eine blockierende Wirkung haben; bei Entfernung derselben aus der Badlösung wird eine deutliche Steigerung der Natriumleitfähigkeit sichtbar (Leonhard-Marek *et al.*, 2005), die eine ähnliche Rektifizierung des Stromes mit Steigerung bei Hyperpolarisation aufweist. Gut denkbar erscheint, dass diese divalenten Kationen durch mit Propionat anflutenden H^+ -Ionen aus ihrer blockierenden Bindung verdrängt werden, wodurch die Leitfähigkeit für monovalente Kationen wie Natrium ansteigt. Interessanterweise ist seit langem bekannt, dass Epithelien in der Ussingkammer in der Gegenwart von Fettsäuren häufig stärkere Ströme aufweisen als ohne dieselben (Gäbel *et al.*, 1991a; Abdoun *et al.*, 2005). Alternativ erscheint es auch möglich, dass der Einstrom von Propionat eine Zellschwellung über „stretch“ Effekte bewirkt, die eine Aktivierung des Kanals zur Folge hat.

4.4.4 Hypoosmolare Natriumchloridlösung 50 %

Um das Verhalten der Zellen bei osmotischem Stress zu untersuchen, wurde eine hypotone NaCl-Lösung mit $170 \text{ mosmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (genaue Zusammensetzung sh. Anhang) in die Badlösung appliziert. Hingegen betrug die Osmolarität der Pipettenlösung ca. $280 \text{ mosmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Bei dieser Konfiguration ist ein Einstrom von Wasser in die Zelle zu erwarten. Im Versuch kommt es zu einer Änderung des Stroms. Es konnte eine deutliche Zunahme des Stroms sowohl bei Depolarisation als auch bei negativem Potential beobachtet werden (sh. Abbildung 42).

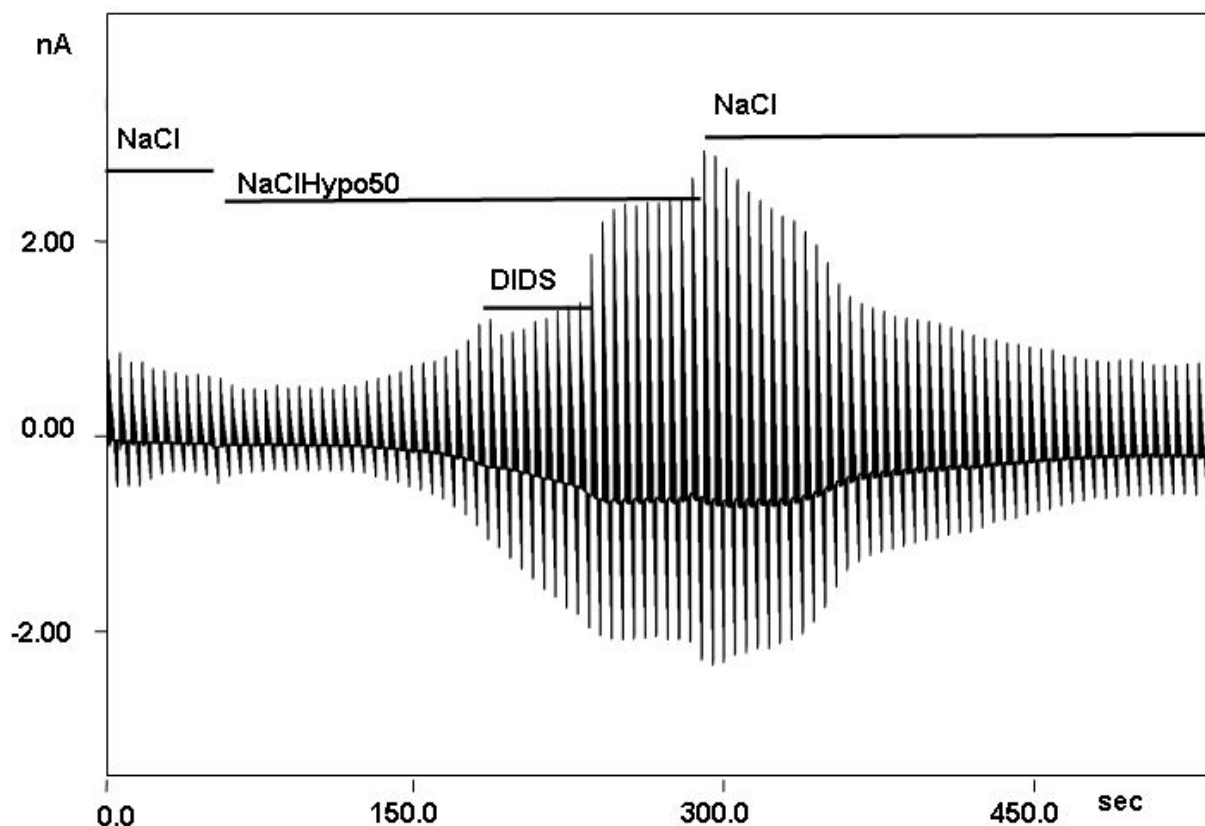


Abbildung 42

Ganzzelleableitung einer Pansenepithelzelle bei Applikation von hypoosmolarer NaCl-Lösung. Durch den osmotischen Gradienten zwischen der Pipettenlösung und der Lösung im Bad kommt es zu volumenregulatorischen Prozessen der Zelle. Die deutliche Zunahme der Stromantwort bei positiven und negativen Potentialen könnte für die Aktivierung volumenregulierter Kanäle sprechen.

Bei Zugabe von DIDS in die hypoosmolare NaCl-Lösung kommt es nur zu geringen Effekten auf den Strom bei Depolarisation. Es scheint bei dieser Zelle durch Schwellung hauptsächlich zu einer Aktivierung des nicht-selektiven Kationenkanals gekommen zu sein; der Anionenkanal spielt bei der Leitfähigkeit offenbar hier eine untergeordnete Rolle. Weitere Messungen sind erforderlich, um Schwellungseffekte abschließend zu charakterisieren.

4.4.5 Butyratleitfähigkeit

Butyrat ist im Pansen der Wiederkäuer nach Propionat mengenmäßig die dritt wichtigste kurzkettige Fettsäure. Nachdem die Leitfähigkeit für Azetat (Stumpff *et al.*, 2009) und auch für Propionat an isolierten Pansenepithelzellen mit Hilfe der Ganzzellmessungen in dieser Studie nachgewiesen worden war, sollte auch die Leitfähigkeit für Butyrat (sh. Strukturformel Abbildung 43) ermittelt werden.

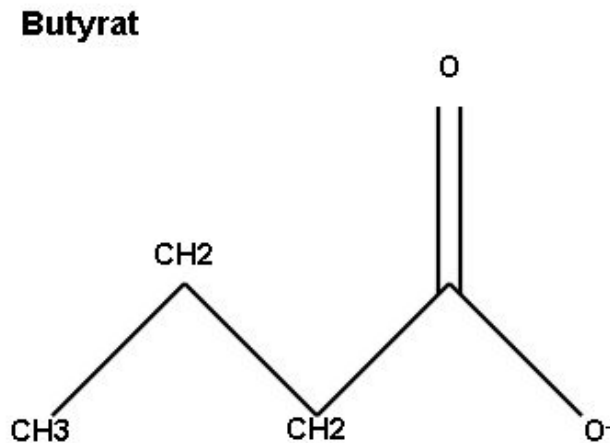


Abbildung 43

Strukturformel von Butyrat

In der Ganzzellkonfiguration waren die Pansenepithelzellen wieder mit Natriumgluconat gefüllt. Bei Ersatz von Natriumchlorid durch Natriumgluconat in der Badlösung sanken die gemessenen Ströme deutlich (sh. Abbildung 44). Im Mittel betrug der Natriumgluconatstrom $32,04 \pm 1,36$ % des Chloridstroms zu Beginn der Messung. Bei Zugabe von Natriumbutyrate in die Perfusionslösung stiegen die Ströme bei Depolarisation wieder an. Im Mittel betrug der Natriumbutyrateinstrom $53,55 \pm 16,20$ % des NaCl-Einstroms zu Beginn der Messung ($n = 31$, $p < 0,001$, sh. Tabelle 5). Bei Zugabe von Butyrat änderte sich das Umkehrpotential signifikant von im Mittel $-9,58 \pm 0,85$ mV in Natriumgluconatlösung auf $-2,36 \pm 1,28$ mV ($n = 31$, $p < 0,001$, sh. Tabelle 6). Zusammenfassend wurde hiermit festgestellt, dass der Strom zwar deutlich geringer als der Chloridstrom war, aber doch signifikant höher als der in Gluconatlösung zu messende Strom.

Wie bereits bei den Untersuchungen zur Chlorid- und Propionatleitfähigkeit, sanken bei Zugabe von $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ des Anionenkanalblockers DIDS in die Natriumbutyrateperfusionslösung die Ströme deutlich und betrug im Mittel $22,97 \pm 3,57$ % des NaCl-Einstroms zu Beginn der Messung ($n = 13$, $p < 0,001$, sh. Tabelle 5). Der DIDS-Effekt auf die Ströme war reversibel (sh. Abbildung 44). Bei Zugabe von DIDS betrug das Umkehrpotential im Mittel $1,65 \pm 1,74$ mV ($n = 13$, $p = 0,084$, sh. Tabelle 6).

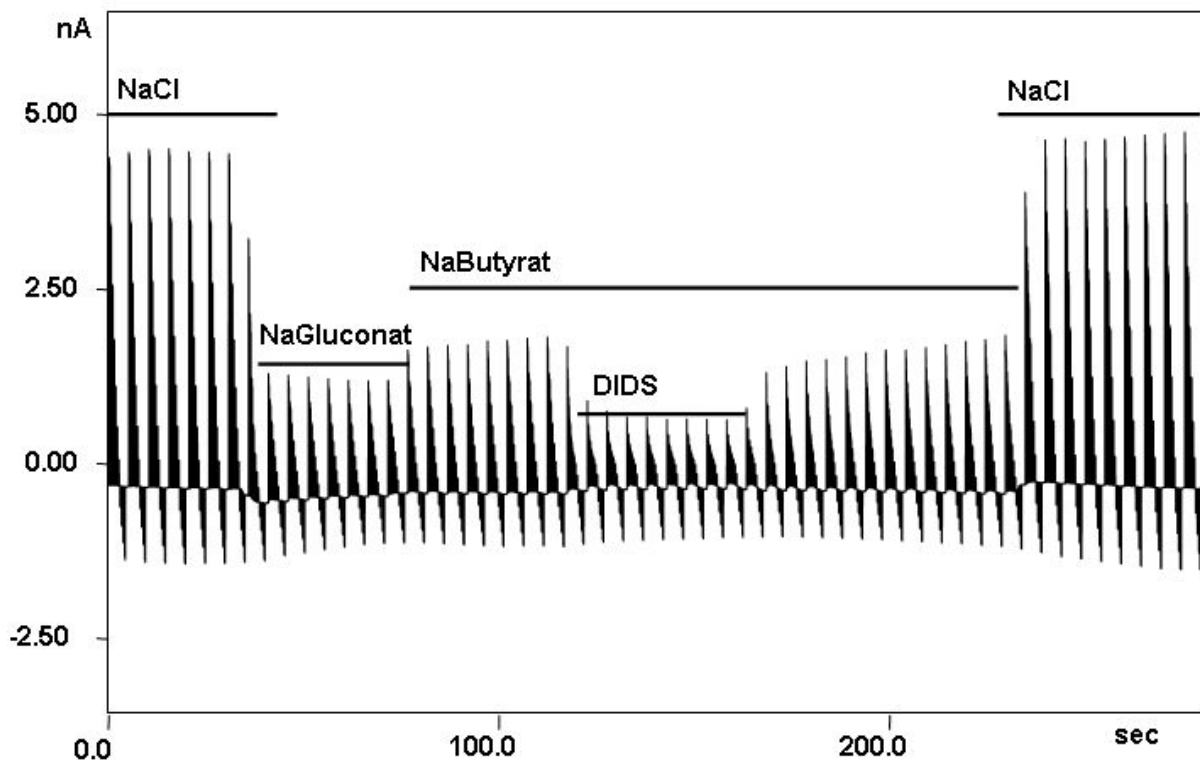


Abbildung 44

Ganzzellmessung einer mit Natriumgluconat gefüllten Pansenepithelzelle. Deutlich sichtbar ist der Stromabfall nach Ersatz von Chlorid durch Gluconat. Beim Ersatz von Gluconat durch Butyrat kam es zu einem leichten Anstieg. Bei Zugabe von DIDS sanken die Ströme auf Werte, die in etwa dem Strom in Gluconatlösung entsprachen. Die Messung deutet auf eine reversible DIDS-sensitive Butyratleitfähigkeit hin. Wirkungen auf den nicht-selektiven Kationenkanal waren in dieser Zelle nicht zu beobachten.

Tabelle 5

Strom bei + 100 mV (%)	n	Mittel	Std. Fehler	Median	75 %	25 %	p vs. NaCl 0
NaCl 0	186	100	0	100	100	100	
NaGluconat	142	32,04	1,36	26,83	38,84	22,19	<0,001
NaButyrat 0	31	53,55	16,20	33,87	48,41	26,84	<0,001
NaButyrat 1	12	39,95	6,43	33,81	54,13	21,06	<0,001
NaButyrat + DIDS	13	22,97	3,57	20,75	36,17	10,45	<0,001
p1				<0,001			
p2				0,002			
p3				0,840			

p1: Vergleich von NaButyrat 0 und NaButyrat + DIDS

p2: Vergleich von NaButyrat 0 und NaGluconat

p3: Vergleich von NaButyrat 0 und NaButyrat 1

Tabelle 6

Umkehrpotential (mV)	n	Mittel	Std. Fehler	Median	75 %	25 %	p vs. NaCl 0
NaCl 0	186	-28.76	0.71	-29.6	-23.8	-35.04	
NaGluconat	142	9,58	0,85	8,32	4,04	15,22	
NaButyrat 0	31	-2.36	1.28	-2.15	0.75	-6.46	<0,001
NaButyrat 1	12	-4.06	3.38	-2.11	0.64	-6.35	<0,001
NaButyrat + DIDS	13	1.65	1.74	1.35	4.95	-2.89	<0,001
p1	0,084						
p2	<0,001						
p3	0,026						

p1: Vergleich von NaButyrat 0 und NaButyrat + DIDS

p2: Vergleich von NaButyrat 0 und NaGluconat

P3: Vergleich von NaButyrat 0 und NaButyrat 1

4.4.6 Laktatleitfähigkeit

Für die Untersuchung der Laktatleitfähigkeit an isolierten Pansenepithelzellen (Strukturformel sh. Abbildung 45) wurde in Anlehnung an die vorherigen Ganzzellversuche die NaCl-Perfusionslösung zunächst durch Gluconat ersetzt (sh. Abbildung 46). Strom und Umkehrpotential änderten sich wie bei den vorangegangenen Messungen zur Chloridleitfähigkeit.

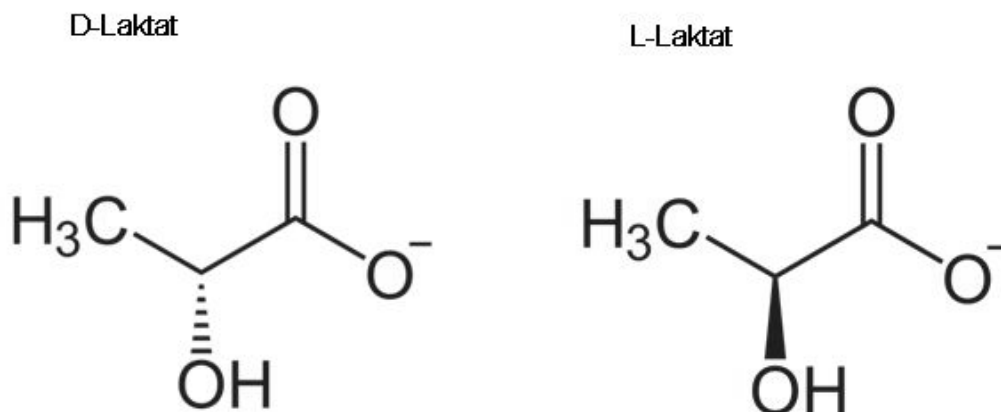


Abbildung 45

Strukturformel von D- und L- Laktat

Anschließend wurde Gluconat durch Laktat im Bad ersetzt (sh. Abbildung 46). Der Lösungswechsel war von einem signifikanten Anstieg des Stroms begleitet. Der Strom betrug nach dem Wechsel auf die Natriumgluconatlösung nur noch $9,57 \pm 0,84$ % des in NaCl-Lösung zu Beginn der Messung gemessenen Wertes. Nach Wechsel zur Natriumlaktatlösung stieg der Strom wieder an, auf $47,48 \pm 2,87$ % des Anfangswertes

($n = 25$, $p < 0,001$, sh. Abbildung 46 und Tabelle 7). Das Umkehrpotential änderte sich ebenfalls signifikant von im Mittel $9,58 \pm 0,85$ mV in Natriumgluconatlösung auf $-2,94 \pm 1,01$ mV in Natriumlaktatlösung mV ($n = 21$, $p < 0,001$, sh. Tabelle 8).

Bei Zugabe des Blockers DIDS wurde der gemessene Laktateinstrom signifikant gehemmt. Unter Zugabe von DIDS betrug der Laktateinstrom nur noch $20,11 \pm 4,9$ % des in NaCl-Lösung gemessenen Wertes ($n = 21$, $p < 0,001$, sh. Tabelle 7). Im Vergleich zum Laktateinstrom ohne DIDS ($= 47,48 \pm 2,87\%$) war der Strom somit in Gegenwart von DIDS signifikant niedriger ($n = 21$, $p < 0,001$, sh. Tabelle 7). Der DIDS-Effekt war reversibel. Nach dem Auswaschen des Laktats aus der Badlösung mit NaCl stieg der Strom wieder auf das Niveau zu Beginn der Messung an.

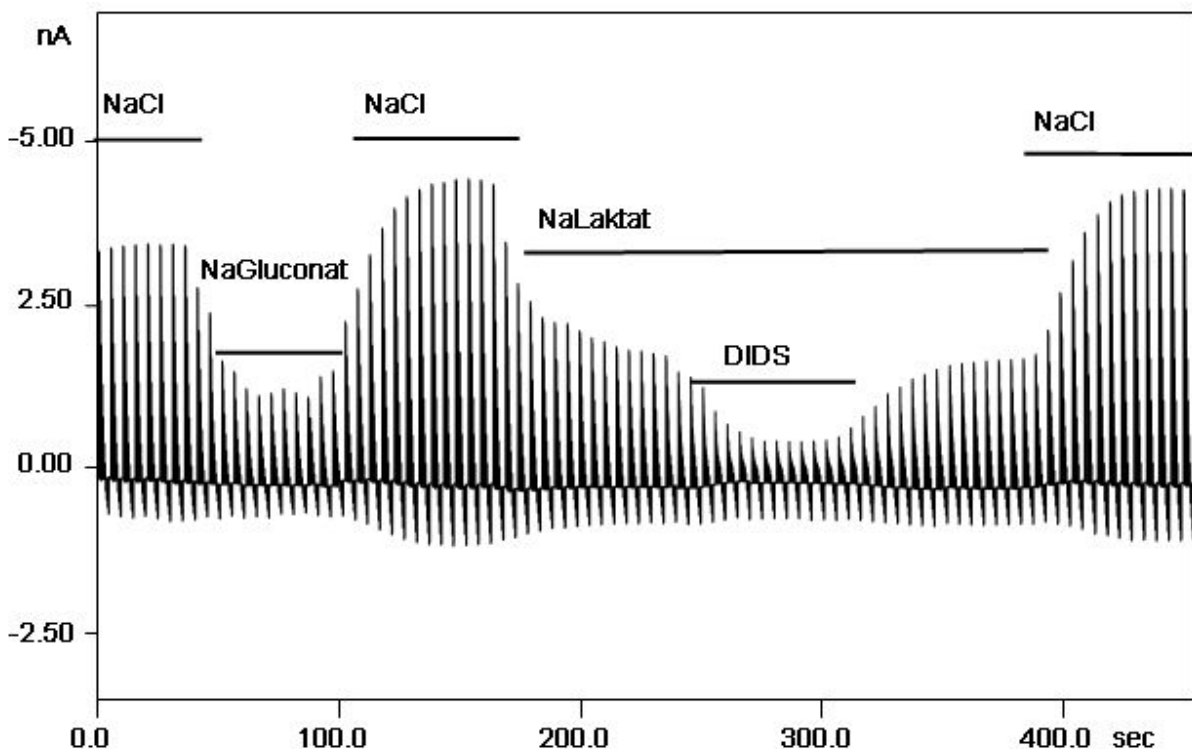


Abbildung 46

Ganzzellableitung einer Pansenepithelzelle. Deutlich sichtbar ist, dass die Leitfähigkeit der Zelle in laktathaltiger Lösung eindeutig höher ist als in gluconathaltiger Lösung. Die Daten lassen sich als eine durch DIDS reversibel hemmbare Laktatleitfähigkeit deuten.

Tabelle 7

Strom bei + 100 mV (%)	n	Mittel	Std. Fehler	Median	25%	75%	p vs NaLaktat 0
NaCl 0	186	100	0	100	100	100	<0,001
NaGluconat	142	9.57	0.84	8.34	4.06	15.19	<0,001
NaLaktat 0	25	47.48	2.87	45.43	35.85	54.88	
NaLaktat + DIDS	21	20.11	4.98	11.49	8.05	23.17	<0,001
NaLaktat 1	20	42.51	4.61	40.42	28.42	53.31	0,045
NaCl 1	179	111.21	5.56	97.28	87.28	115.81	<0,001

Tabelle 8

Umkehrpotential (mV)	n	Mittel	Std. Fehler	Median	25%	75%	p vs NaLaktat 0
NaCl 0	186	-28.77	0.72	-29.60	-35.05	-23.80	<0,001
NaGluconat	142	9.58	0.85	8.32	4.03	15.22	<0,001
NaLaktat 0	26	-2.94	1.02	-2.15	-6.29	-0.25	
NaLaktat + DIDS	21	4.96	2.48	5.29	-0.46	12.79	<0,001
NaLaktat 1	20	-1.12	1.09	-1.00	-4.34	1.61	0,020
NaCl 1	179	-26.72	0.80	-28.97	-33.54	-19.23	<0,001

Durch den signifikanten Unterschied der gemessenen Ströme bei Depolarisation in Natriumlaktatlösung im Vergleich zur Natriumgluconatlösung und der signifikanten Änderung des Umkehrpotentials konnte gezeigt werden, dass isolierte Pansenepithelzellen eine Laktatleitfähigkeit besitzen. Mit Hilfe des Umkehrpotentials konnte die relative Leitfähigkeit für Laktat im Vergleich zu Chlorid berechnet werden: $P(\text{Laktat})/P(\text{Cl}) = 0.35 \pm 0.33$; ($n = 25$). Die Laktatleitfähigkeit war ebenfalls reversibel DIDS-sensitiv.

4.4.7 Vergleich der Leitfähigkeit der Fettsäureanionen Azetat, Propionat und Butyrat

In diesem Versuch sollten die Effekte der Fettsäureanionen Azetat ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$), Propionat ($\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_2$) und Butyrat ($\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2$) auf den Auswärtsstrom untersucht werden. Um die Effekte der Fettsäureanionen direkt miteinander vergleichen zu können, wurde teilweise an derselben Zelle im Wechsel die Natriumgluconatlösung im Bad durch Natriumazetat, Natriumpropionat und Natriumbutytrat ersetzt. Bereits während der Messungen konnte beobachtet werden, dass die Auswärtsströme mit zunehmender Kettenlänge abnahmen (sh. Abbildung 47).

Beim direkten Vergleich der Auswärtsströme der Fettsäureanionen wurde der Wert für den Natriumgluconatstrom (bei +100 mV) subtrahiert. Somit entfällt der Beitrag des nicht-

selektiven Kationkanals zum Gesamtstrom und es konnten die Unterschiede zwischen den einzelnen Fettsäureanionen besser dargestellt werden (sh. Abbildung 48)

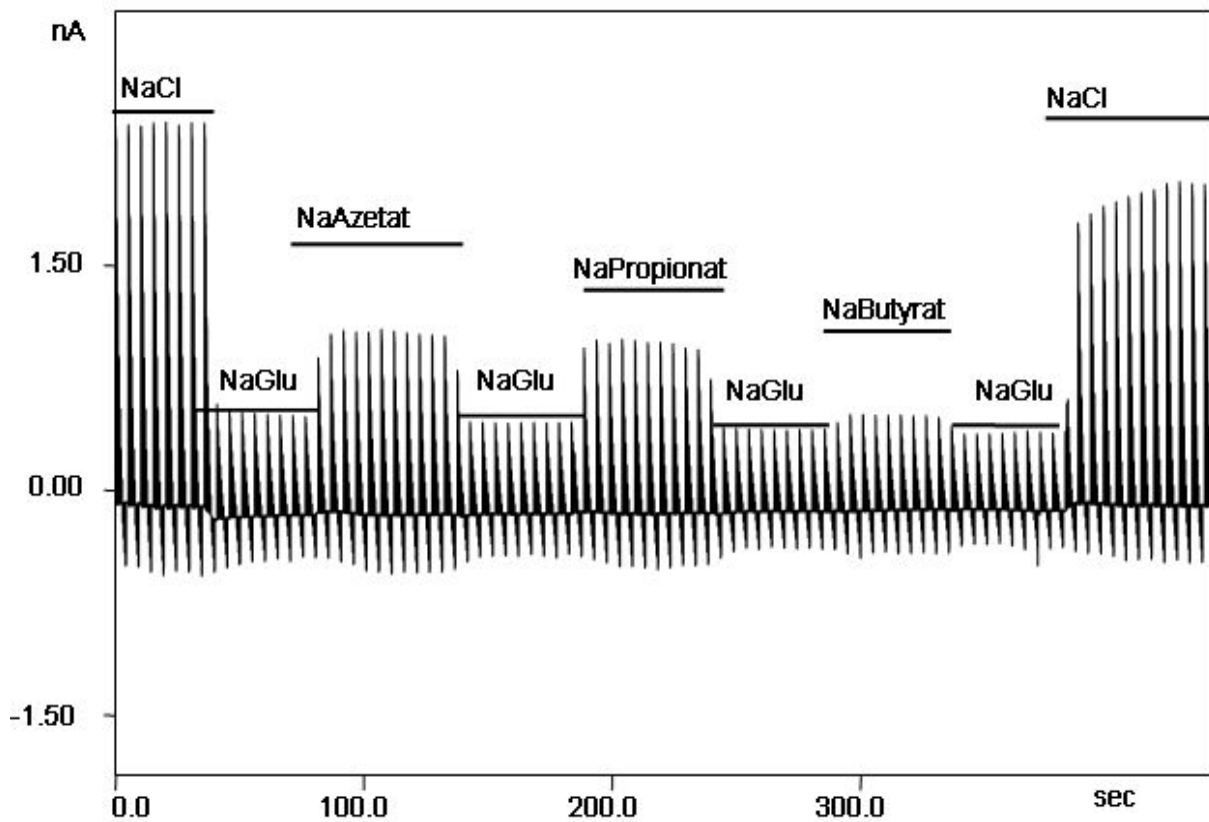
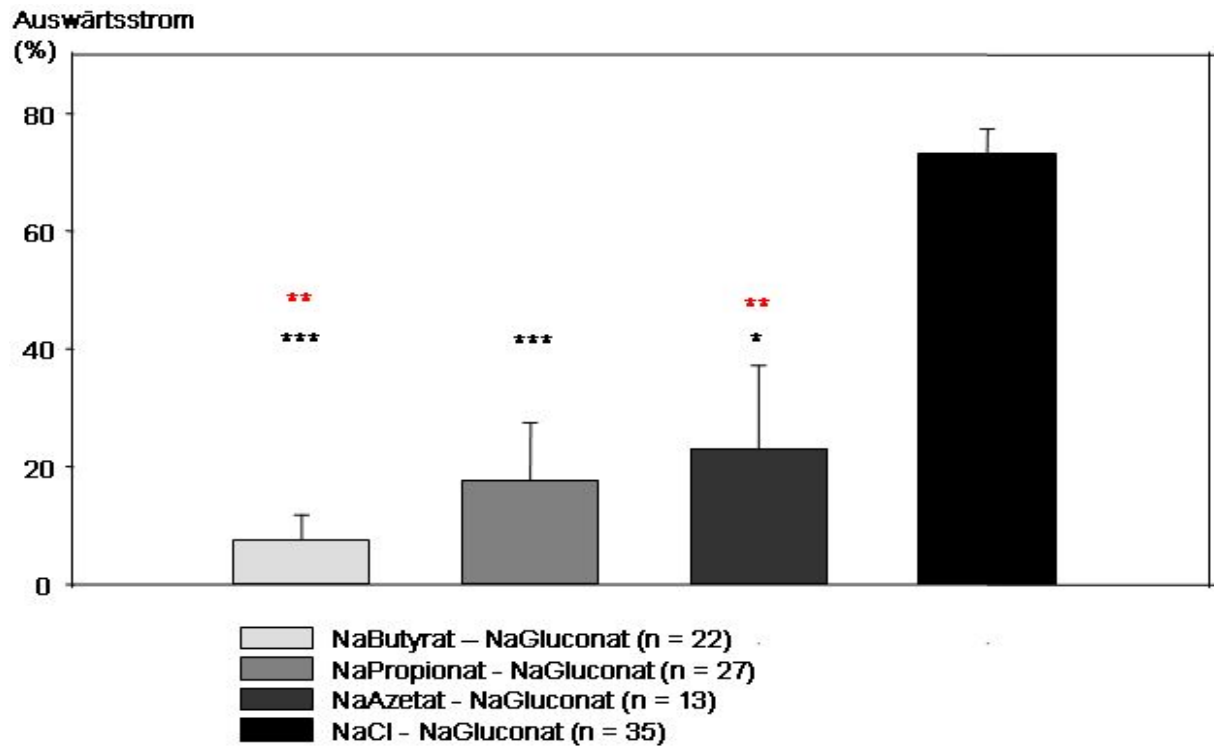


Abbildung 47

Ganzzellmessung an einer mit Natriumgluconatlösung gefüllten Pansenepithelzelle. Effekte der verschiedenen Fettsäureanionen auf den Strom. Hier wurde im Wechsel die Natriumgluconatlösung (NaGlu) im Bad durch Natriumazetat, Natriumpropionat und Natriumbutytrat ersetzt. Bei Depolarisation des Pipettenpotentials verringerte sich der Strom mit zunehmender Kettenlänge des eingesetzten Fettsäureanions, entsprechend einer mit der Ionengröße abnehmenden Leitfähigkeit.

**Abbildung 48**

Durch subtrahieren des Gluconatauswärtsstroms können die Auswärtsströme (Mittelwert + SEM) der verschiedenen Fettsäureanionen besser miteinander verglichen werden. Die Leitfähigkeit der Zellmembran der Pansenepithelzellen für die Fettsäureanionen Azetat, Propionat und Butyrat nahm mit zunehmender Größe des Fettsäureanions ab, (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$, rot * im Vergleich zu NaPropionat, schwarz * im Vergleich zu NaCl).

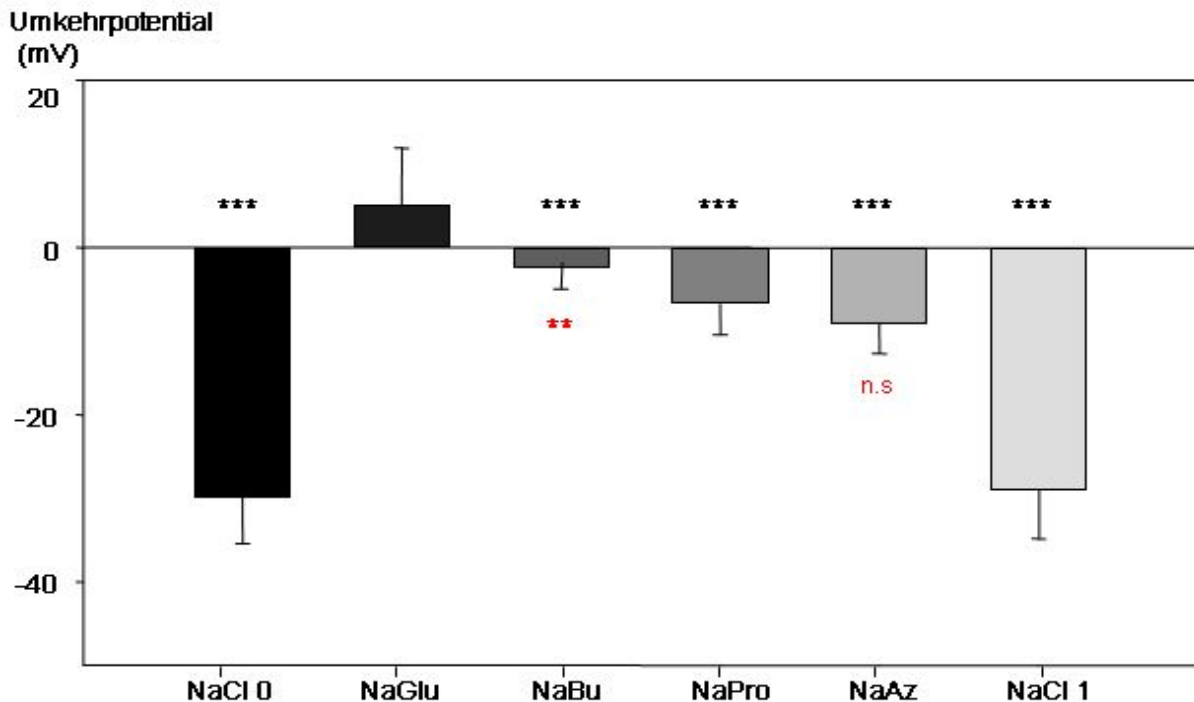


Abbildung 49

Vergleich der Umkehrpotentiale der verschiedenen Fettsäureanionen (Mittelwert + SEM): Natriumbutyrat (NaBu), Natriumpropionat (NaPro), Natriumazetat (NaAz) (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$, rot * im Vergleich zu NaPropionat, schwarz * im Vergleich zu NaCl).

Es bestehen unterschiedliche Permeabilitäten für die verschiedenen kurzkettigen Fettsäuren. Mit Hilfe der Umkehrpotentiale und der Nernstgleichung kann die relative Leitfähigkeit der Zellmembran für verschiedene Ionen berechnet werden. Die relative Leitfähigkeit für Azetat im Verhältnis zu Chlorid betrug $P(\text{Azetat})/P(\text{Cl})$: 0.42 ± 0.01 ($n = 16$). Die relative Leitfähigkeit für Propionat im Verhältnis zu Chlorid betrug $P(\text{Propionat})/P(\text{Cl})$: 0.39 ± 0.01 ($n = 47$). Die relative Leitfähigkeit von Butyrat im Verhältnis zu Chlorid betrug $P(\text{Butyrat})/P(\text{Cl})$: 0.36 ± 0.02 ($n = 32$). Die relative Leitfähigkeit von Gluconat im Verhältnis zu Chlorid betrug $P(\text{Gluconat})/P(\text{Cl})$: 0.26 ± 0.01 ($n = 39$). Mit zunehmender Kettenlänge der kurzkettigen Fettsäureanionen nahm deren relative Leitfähigkeit im Vergleich zu Chlorid also ab.

4.4.8 Leitfähigkeit für die Halide Iodid, Bromid und Fluorid

Eine Methode zur Charakterisierung von Anionenkanälen ist die Applikation der Halide Iodid (I^-), Bromid (Br^-) und Fluorid (F^-) zur Bestimmung der Eisenmann-Sequenz. Mit dieser Sequenzanalyse lassen sich Größe und Eigenschaften der Kanalpore bestimmen. Hierfür wurde an derselben Zelle im Wechsel die Natriumgluconatlösung im Bad durch Natriumiodid, Natriumbromid und Natriumfluorid ersetzt (sh. Abbildung 50).

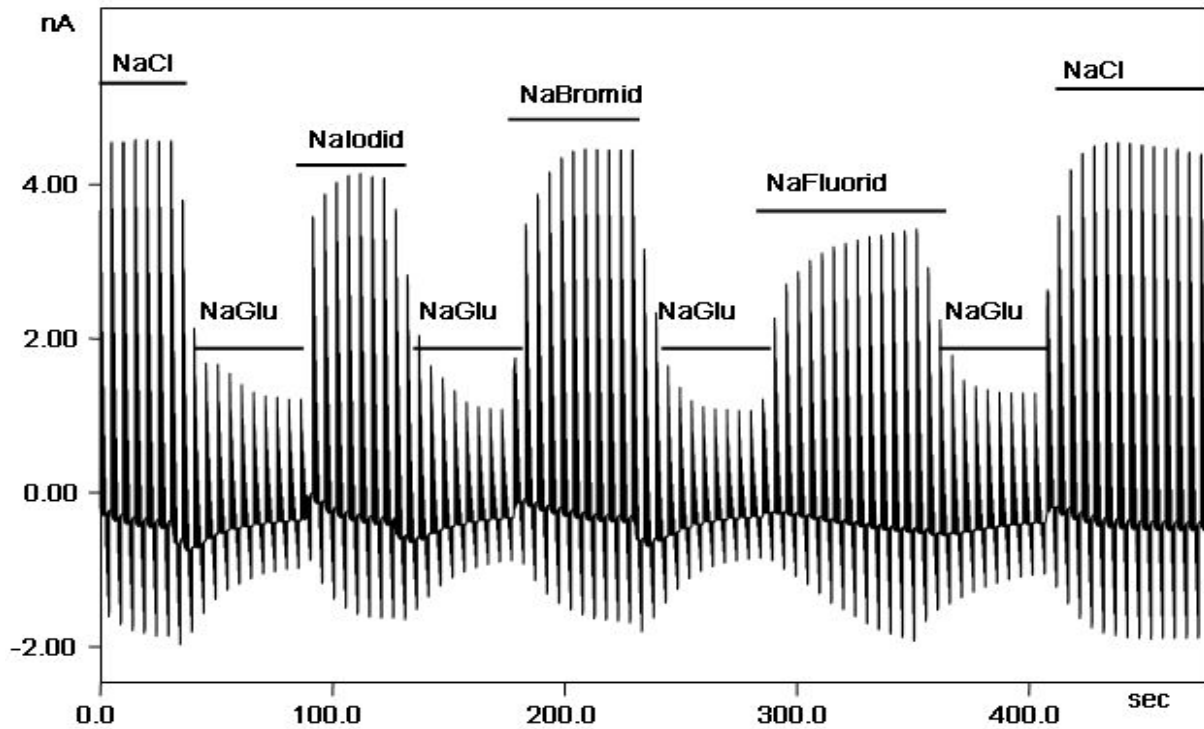


Abbildung 50

Ganzzelleableitung einer Pansenepithelzelle bei Applikation der Halidlösungen Natriumiodid, Natriumbromid und Natriumfluorid in die Perfusionslösung. Die Leitfähigkeiten von Chlorid, Bromid und Iodid lagen recht dicht beieinander; lediglich die Leitfähigkeit für Fluorid zeigte eine signifikante Abweichung nach unten (sh. Diskussion). An dieser Zelle konnten auch Effekte auf den Einwärtsstrom gesehen werden, deren Ursache jedoch nicht wirklich geklärt werden konnte.

Auch die Zugabe des Anionenkanalblockers DIDS in die Badlösung ($200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) hemmte bei allen drei Halidlösungen deutlich die Ströme (sh. Abbildung 51).

Auswärtsstrom (%)

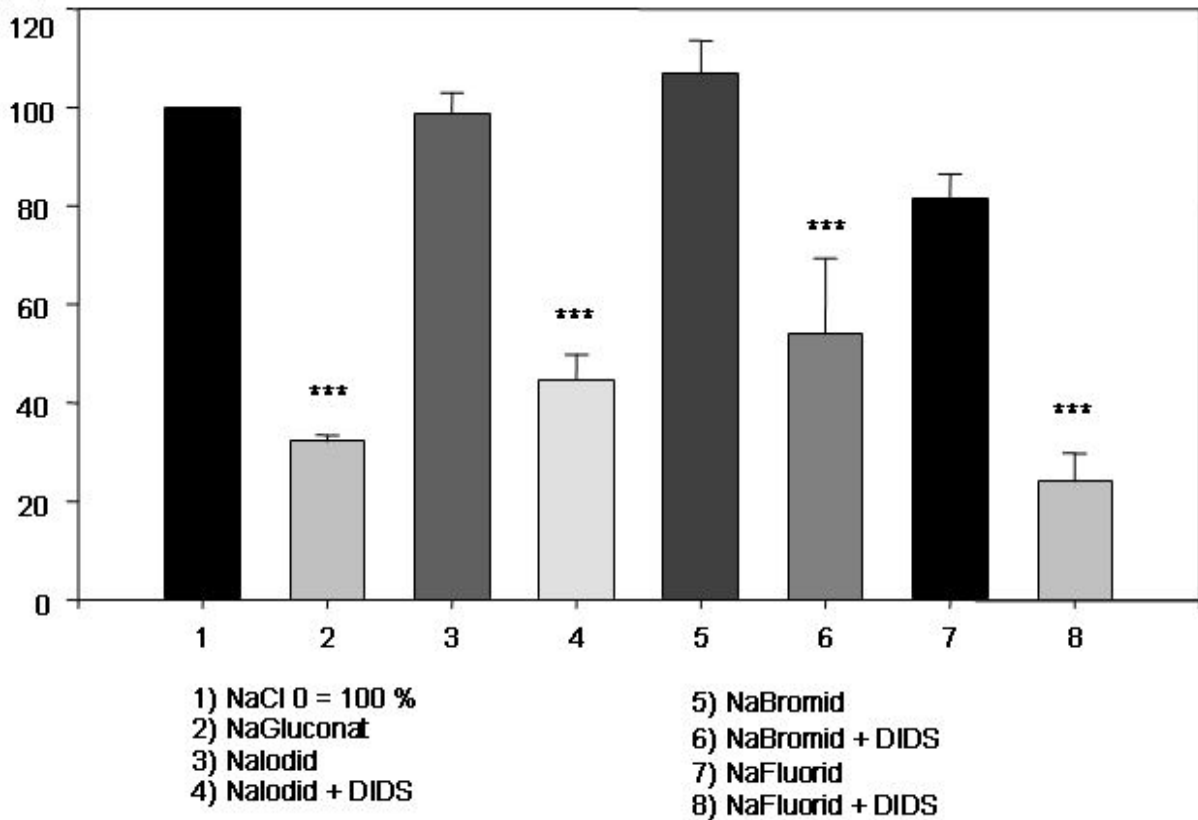


Abbildung 51

Vergleich der Ströme der verschiedenen Halidlösungen und unter DIDS-Zugabe in % zum Natriumchloridauswärtsstrom zu Beginn der Messung (= 100%), (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$).

Tabelle 9

Strom bei + 100 mV (%)	n	Mittel	Std. Fehler	Median	25%	75%
NaCl0	7	100.000	0.000	100.000	100.000	100.000
NaGlu	7	22.705	1.716	21.491	20.442	23.406
NaBro	7	106.205	13.843	100.614	94.450	118.240
NaBro + DIDS	7	53.881	15.384	44.423	31.777	53.795
NaCl1/NaGlu	7	97.063	8.533	92.711	89.751	99.153
p1				0,006		
p1				<0,001		

p1: Vergleich von NaBro und NaBro + DIDS

p2: Vergleich von NaGlu und NaBro + DIDS

Tabelle 10

Strom bei +100 mV (%)	n	Mittel	Std. Fehler	Median	25%	75%
NaClO	6	100.000	0.000	100.000	100.000	100.000
NaGlu	6	27.142	4.134	23.406	20.981	35.598
NaFlu	6	66.082	3.284	64.403	61.847	72.161
NaFlu + DIDS	6	23.950	5.796	27.363	11.654	31.144
NaCl1	6	89.023	5.277	92.966	84.447	95.714
p1	<0,001					
p2	<0,001					

p1: Vergleich von NaFlu und NaFlu + DIDS

p2: Vergleich von NaGlu und NaFlu + DIDS

Tabelle 11

Strom bei +100 mV (%)	n	Mittel	Std. Fehler	Median	25%	75%
NaClO	10	100.000	0.000	100.000	100.000	100.000
NaGlu	10	24.653	2.199	23.187	21.039	25.581
Nalod	10	85.353	4.043	86.987	78.538	95.324
Nalod + DIDS	10	44.613	4.557	44.613	38.145	47.568
NaCl1	10	92.871	2.759	92.966	89.635	97.998
p1	<0,001					
p2	<0,001					

p1: Vergleich von Nalod und Nalod + DIDS

p2: Vergleich von NaGlu und Nalod + DIDS

4.4.9 Ganzzellmessungen an isolierten Psalterepithelzellen

Nachdem es gelungen war mit der Zellisolationskammer Psalterepithelzellen zu isolieren und zu kultivieren, konnten auch Patch-Clamp-Experimente an diesen Zellen durchgeführt werden. Für die Ganzzellmessungen wurden die Psalterepithelzellen ebenfalls mit einer Natriumgluconatlösung gefüllt (Zusammensetzung sh. Anhang).

4.4.9.1 Leitfähigkeit für Chlorid und für Azetat

Es wurde zunächst die Leitfähigkeit für Chlorid überprüft (sh. Abbildungen 52 und 53). Bei Zugabe von Natriumgluconatlösung wurde der Strom bei +100 mV deutlich gehemmt. Im Mittel betrug der Strom in Natriumgluconatlösung nur $33,17 \pm 2,31$ % des Stroms in NaCl-Lösung ($n = 46$, $p < 0,001$, sh. Abbildungen 52 - 54 und Tabelle 12); in NaCl-Lösung entsprechen also fast zwei Drittel des Stromes bei depolarisiertem Potential einem Einstrom

von Chlorid aus dem Bad in die Zelle. Bei Zugabe von Natriumazetat in die Perfusionslösung sank der bei Depolarisation gemessene Strom ebenfalls erheblich (sh. Abbildungen 52 und 53); er lag jedoch signifikant über dem in Natriumgluconatlösung gemessenen Niveau. Im Mittel betrug er $78,75 \pm 9,68 \%$ des NaCl-Einstroms zu Beginn der Messung ($n = 33$, $p < 0,001$, sh. Abbildung 54 und Tabelle 12). Die Änderung der Ströme bei Hyperpolarisation war nicht signifikant.

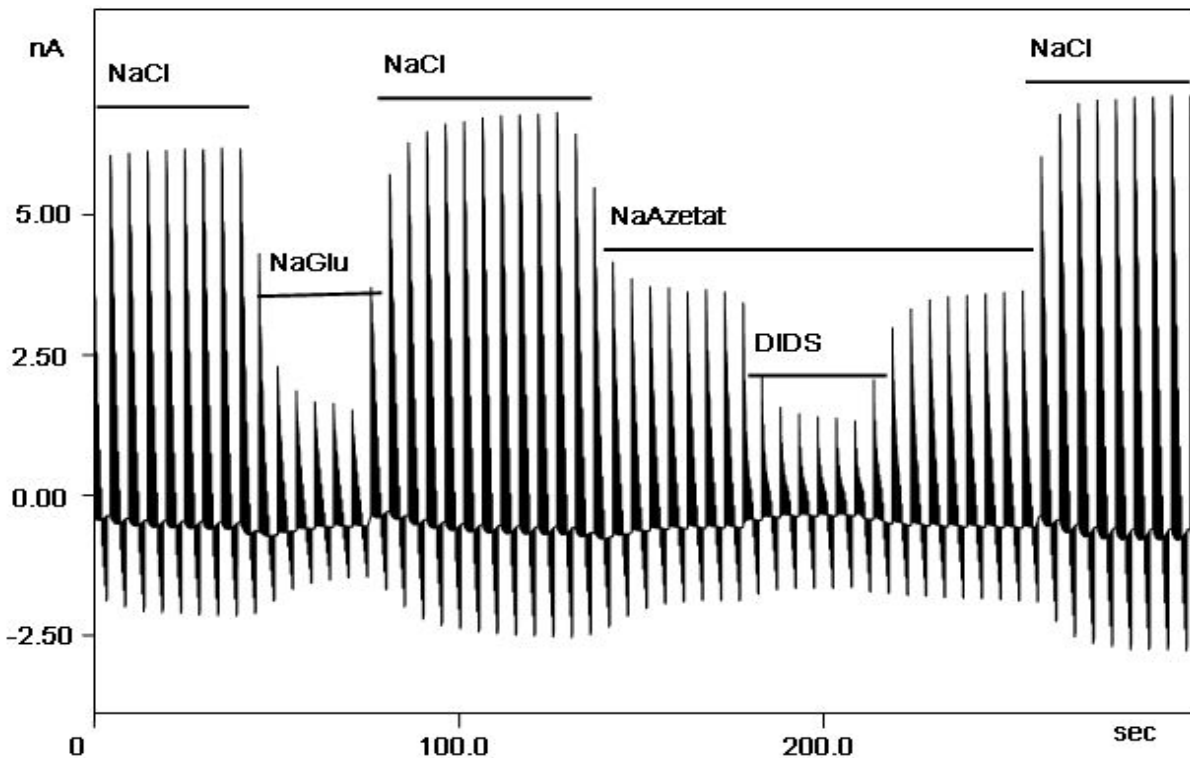
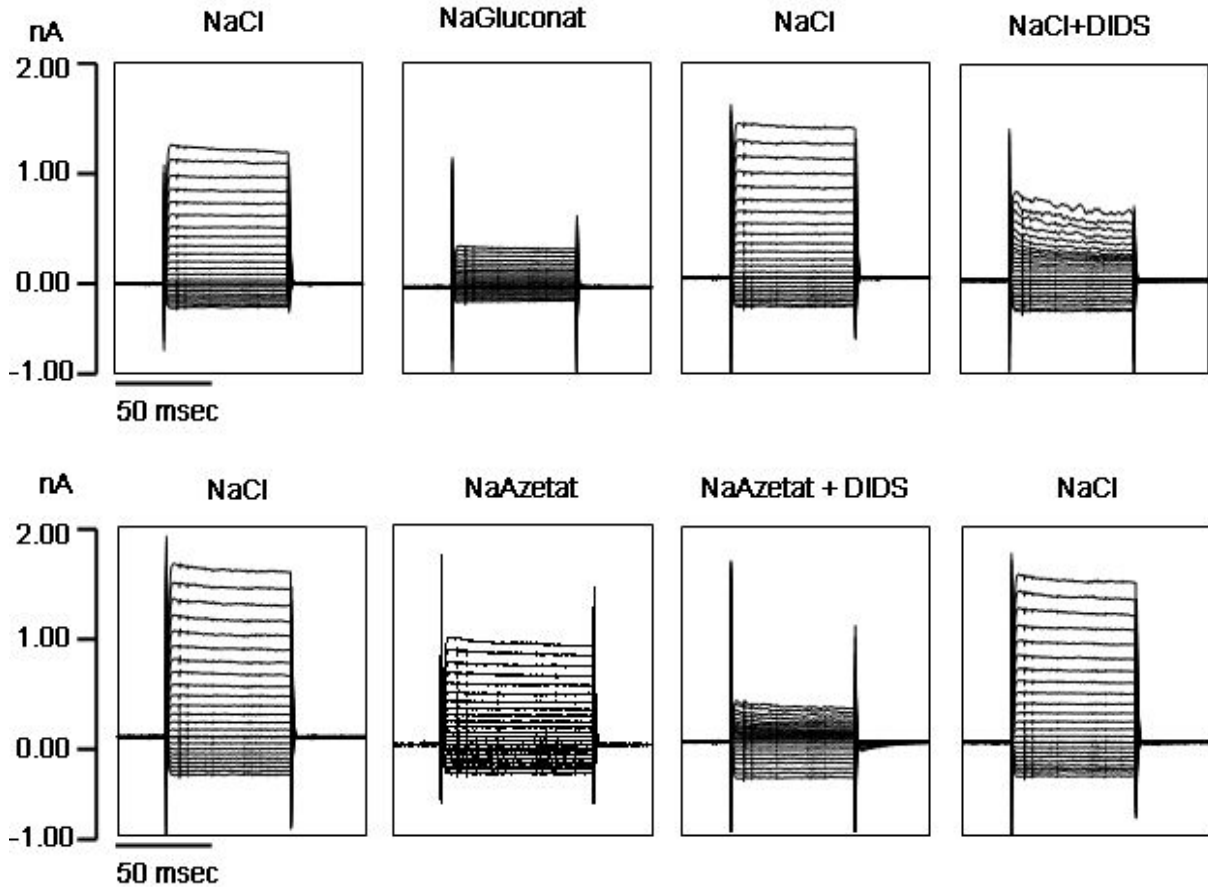


Abbildung 52

Ganzzelleableitung einer mit Natriumgluconatlösung gefüllten Psalterepithelzelle. Hier sind eine Chloridleitfähigkeit und eine reversible DIDS-sensitive Azetatileitfähigkeit zu sehen.

Wie bereits bei den Pansenepithelzellen wurde bei Applikation von $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ des Blockers DIDS der Chloridauswärtsstrom ($n = 23$, $p < 0,001$) sowie auch der Azetatauswärtsstrom ($n = 25$, $p < 0,001$) signifikant gehemmt (sh. Abbildungen 52 - 54 und Tabelle 12). Im Mittel betrug der Natriumchloridauswärtsstrom unter DIDS-Zugabe $57,86 \pm 6,00 \%$ des Natriumchloridauswärtsstroms zu Beginn der Messung. Der Natriumazetatauswärtsstrom betrug im Mittel unter DIDS-Zugabe $34,69 \pm 5,89 \%$ des Natriumchloridauswärtsstroms zu Beginn der Messung. Zusätzlich zu dem kontinuierlichen Pulsprotokoll wurde ebenfalls ein konventionelles Pulsprotokoll durchgeführt (sh. Abbildung 53).

**Abbildung 53**

Konventionelles Pulsprotokoll bei verschiedenen Badlösungen bei einer Psalterepithelzelle in der Ganzzellkonfiguration. Die Ströme sind wie bei den Pansenepithelzellen deutlich auswärtsrektifizierend. Der zeitliche spannungsabhängige Effekt des Blockers DIDS auf den Auswärtsstrom ist bei Chlorid sehr gut und bei Azetat angedeutet zu sehen.

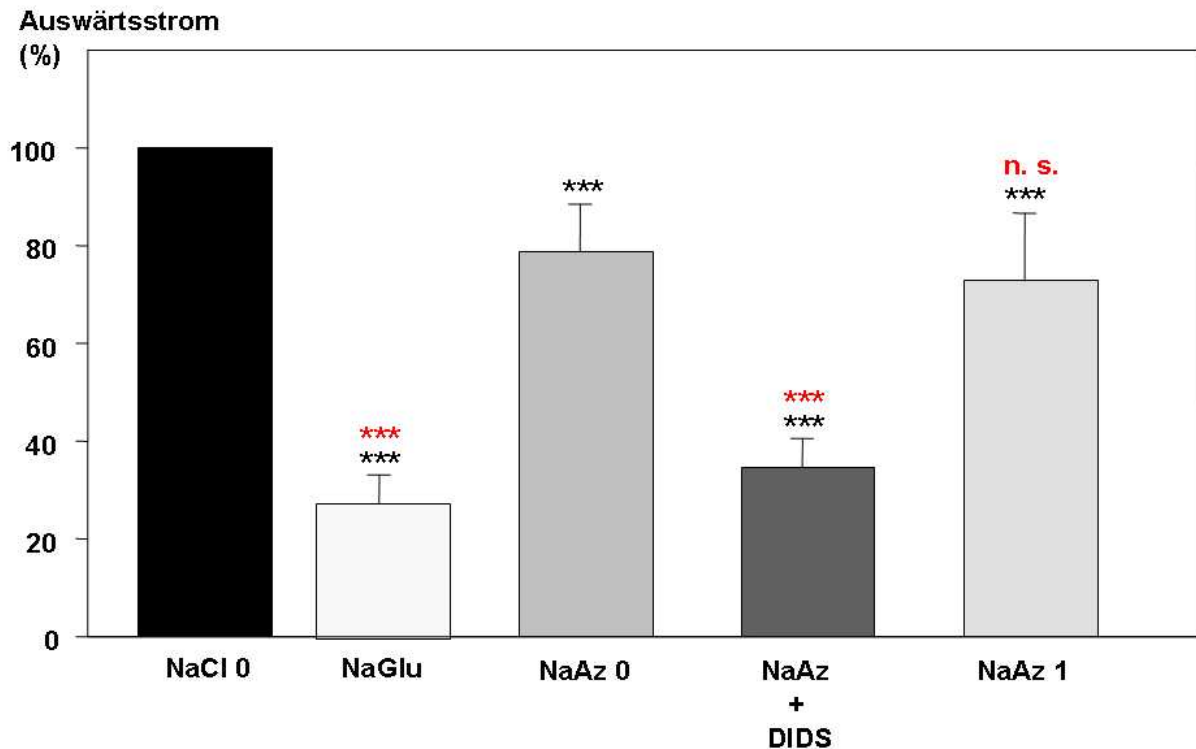


Abbildung 54

Vergleich der Ströme bei Depolarisation in Prozent (NaCl-Lösung zu Beginn der Messung = 100 %, Mittelwert + SEM, *** = $p < 0.001$, rot * im Vergleich zu NaAzetat, schwarz * im Vergleich zu NaCl0).

Tabelle 12

Strom bei + 100 mV (%)	n	Mittel	Std. Fehler	Median	25%	75%	p vs NaCl 0
NaCl 0	46	100	0	100	100	100	
NaGlu	46	33.17	2.31	27.09	22.34	41.35	<0,001
NaCl 1	46	157.15	11.39	129.17	107.82	175.78	
NaCl + DIDS	23	57.86	6.00	51.22	35.00	72.64	<0,001
NaAz 0	33	78.75	9.68	56.95	38.35	111.61	<0,001
NaAz + DIDS	25	34.69	5.89	18.51	13.90	51.77	<0,001
NaAz 1	23	72.77	13.85	58.25	32.72	91.14	<0,001
p1	<0,001						
p2	<0,001						
p3	0,902						

p1: Vergleich von NaAzetat 0 und NaGluconat

p2: Vergleich von NaAzetat 0 und NaAzetat + DIDS

p3: Vergleich von NaAzetat 0 und NaAzetat 1

4.4.9.2 Vergleich der Auswärtsströme der Fettsäureanionen am Psalter

An den isolierten Psalterepithelzellen wurden ebenfalls Ganzzellmessungen mit Natriumpropionatlösung (n = 6) und Natriumbutyratlösung durchgeführt (n = 6). Eine erste Auswertung der gemessenen Auswärtsströme und Umkehrpotentiale zeigt einen ähnlichen Verlauf wie bei den Pansenepithelzellen (sh. Abbildung 55 und Tabellen 13 und 14). Die gemessenen Auswärtsströme sanken mit zunehmender Molekülgröße des kurzkettigen Fettsäureanions.

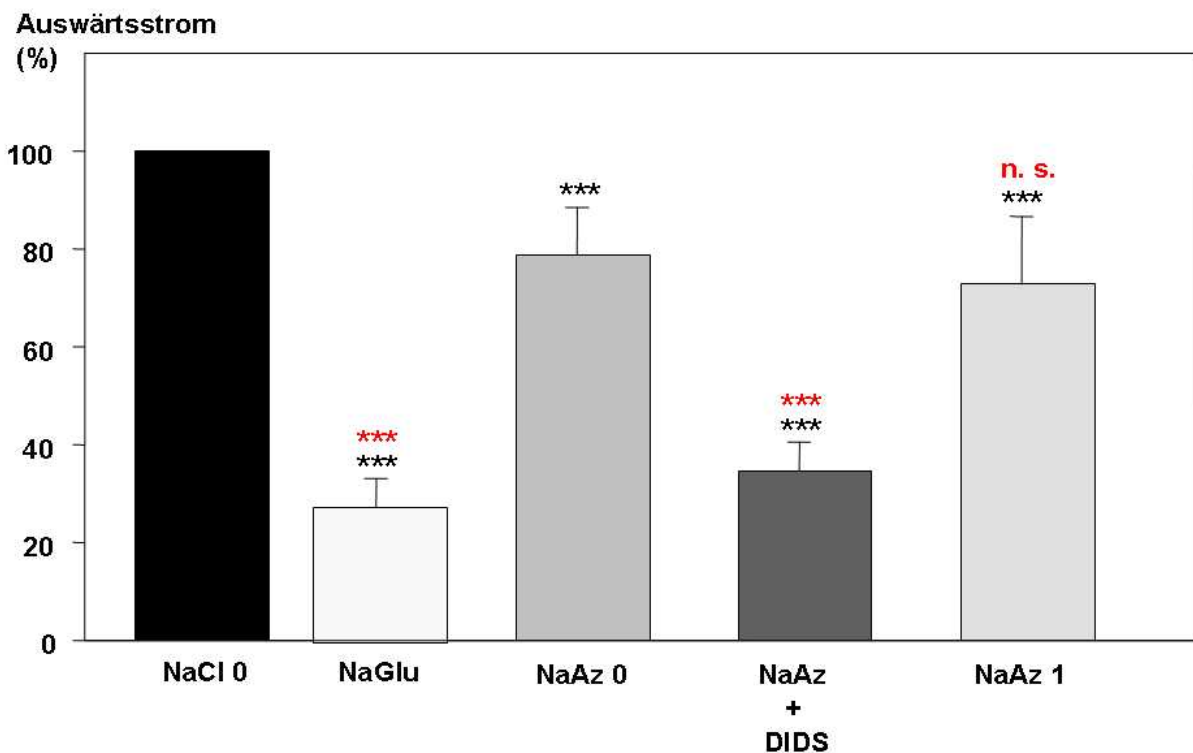


Abbildung 55

Vergleich der Auswärtsströme in Prozent zur NaCl-Lösung = 100 % (Mittelwert + SEM, *** = p < 0.001).

Tabelle 13

Auswärtsstrom (%)	n	Mittel	Std. Fehler	Median	25%	75%	p vs NaCl 0
NaCl 0	46	100	0	100	100	100	
NaGlu	46	33.17	2.31	27.09	22.34	41.35	<0,001
NaAz	33	78.75	9.68	56.95	38.35	111.61	<0,001
NaPro	6	62.00	11.50	66.00	33.03	90.10	<0,001
NaBu	6	41.00	7.99	33.26	27.20	63.75	<0,001

Tabelle 14

Umkehrpotential (mV)	n	Mittel	Std.Fehler	Median	25%	75%	p vs NaCl 0
NaCl 0	46	-30.71	1.31	-29.49	-33.14	-26.40	<0.001
NaCl+DIDS	23	-31.24	2.06	-29.96	-34.78	-23.11	0.68
NaGlu	46	10.39	1.41	10.75	6.84	14.40	<0.001
NaAz	33	-6.29	1.49	-6.40	-10.80	-0.55	<0.001
NaAz+DIDS	25	-5.45	1.74	-6.00	-10.44	2.49	<0.001

4.4.9.3 Gegenüberstellung der Leitfähigkeit an Pansen- und Psalterepithelzellen

Bei der Gegenüberstellung der Leitfähigkeiten der Fettsäureanionen im Vergleich zu Chlorid an Pansenepithelzellen und Psalterepithelzellen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (sh. Abbildung 56 und Tabelle 15).

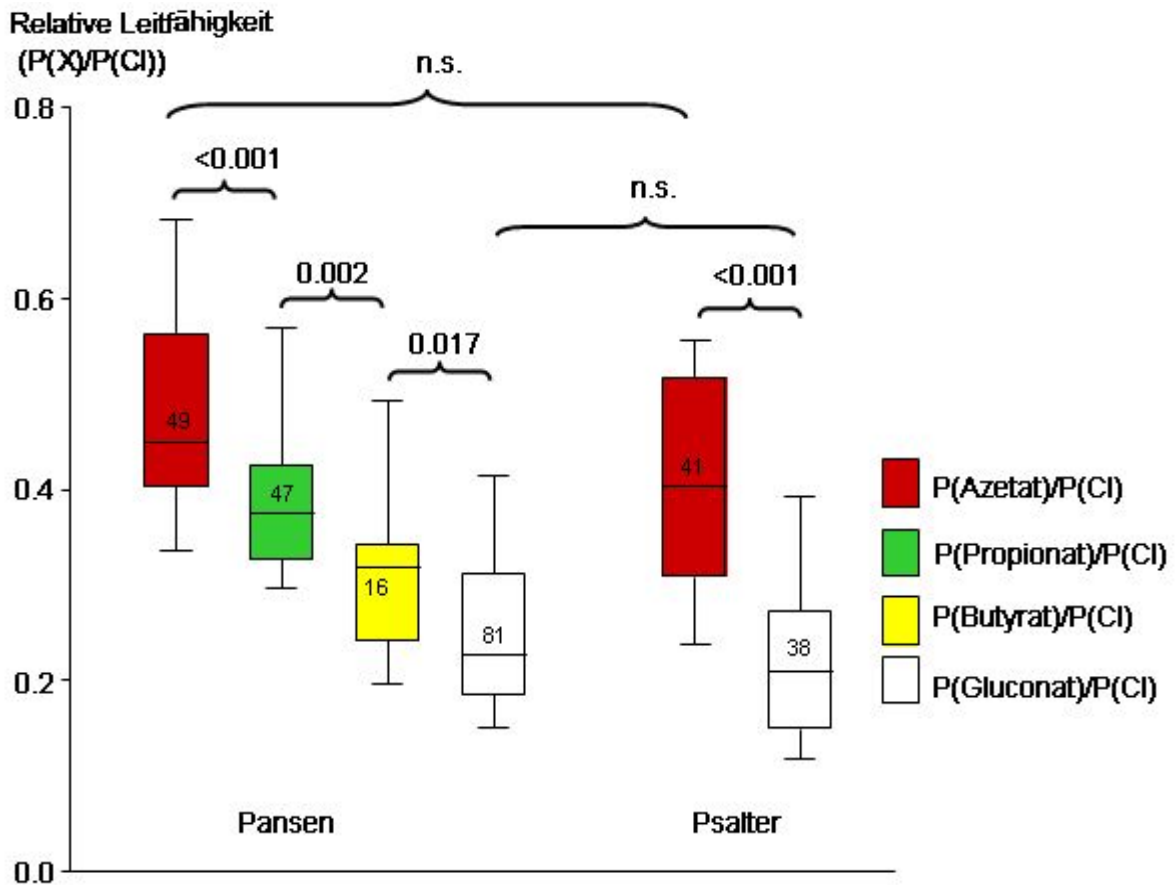


Abbildung 56

Vergleich der Leitfähigkeiten an isolierten Pansen- und Psalterepithelzellen (n = Zahlen in den Balken, p = Zahlen über den Klammern)

Tabelle 15

Pansen o (pA)	n	Mittel	Std. Fehler	Median	25%	75%	p vs Psalter
NaCl	186	2.00	0.10	1.72	0.73	2.95	0.749
NaGlu	142	0.60	0.04	0.50	0.22	0.82	0.660
NaAz	31	1.47	0.15	1.49	1.01	1.66	0.405
NaPro	51	1.05	0.10	0.90	0.56	1.43	0.023
NaBu	31	0.91	0.10	0.96	0.48	1.09	0.002
Pansen oc (pA/pF)	n	Mittel	Std. Fehler	Median	25%	75%	p vs Psalter
NaCl	186	193.33	10.17	169.96	71.33	291.22	0.933
NaGlu	142	57.69	3.93	46.38	20.36	79.76	0.954
NaAz	31	145.84	14.33	141.66	97.36	185.75	0.232
NaPro	51	105.77	10.51	90.31	53.39	141.37	0.012
NaBu	31	86.47	8.69	96.30	50.59	110.53	0.002
Pansen oo (%)	n	Mittel	Std. Fehler	Median	25%	75%	p vs Psalter
NaGlu	142	32.05	1.37	26.83	22.19	38.84	0.615
NaAz	31	64.91	8.34	47.58	44.66	68.27	0.735
NaPro	51	52.18	9.51	39.94	33.46	55.80	0.189
NaBu	31	53.55	16.21	33.87	26.84	48.41	0.918

Psalter o (pA)	n	Mittel	Std. Fehler	Median	25%	75%
NaCl	46	2.50	0.35	1.58	0.66	3.64
NaGlu	46	0.78	0.12	0.37	0.19	1.20
NaAz	33	1.55	0.24	0.79	0.47	2.55
NaPro	6	0.44	0.10	0.42	0.23	0.59
NaBu	6	0.28	0.05	0.27	0.19	0.35
Psalter oc (pA/pF)	n	Mittel	Std. Fehler	Median	25%	75%
NaCl	46	223.67	31.70	125.08	63.42	315.51
NaGlu	46	70.18	11.16	29.40	18.75	110.35
NaAz	33	138.20	21.43	84.55	35.61	220.70
NaPro	6	39.03	9.39	30.70	22.25	60.60
NaBu	6	24.15	3.87	22.26	18.32	28.95
Psalter oo (%)	n	Mittel	Std. Fehler	Median	25%	75%
NaGlu	46	33.18	2.31	27.09	22.34	41.35
NaAz	33	66.57	7.23	52.16	38.26	75.44
NaPro	6	62.01	11.50	66.00	33.03	90.11
NaBu	6	41.00	8.00	33.26	27.20	63.75

4.4.10 Einzelkanalmessungen

Zur Untersuchung einzelner Ionenkanäle wurden Einzelkanalmessungen in der Inside-Out-Konfiguration an Pansen und an Psalterepithelzellen durchgeführt (sh. Abbildung 57).

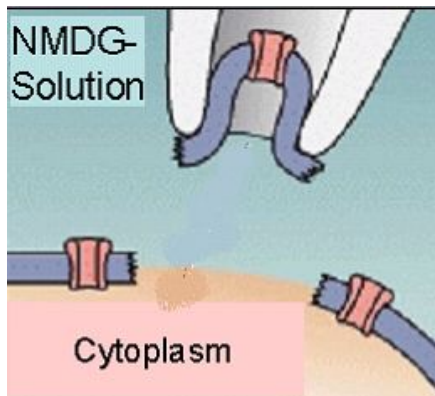


Abbildung 57

Schematische Darstellung der Inside-Out-Konfiguration

4.4.10.1 Einzelkanalmessungen an isolierten Pansenepithelzellen

In der Pipettenlösung befand sich eine NMDG-(N-Methyl-D-glucamin)-Propionatlösung, im Bad befanden sich abwechselnd eine NMDG-Chlorid-, eine NMDG-Propionat und eine NMDG-Gluconatlösung (genaue Zusammensetzung der Lösungen sh. Anhang).

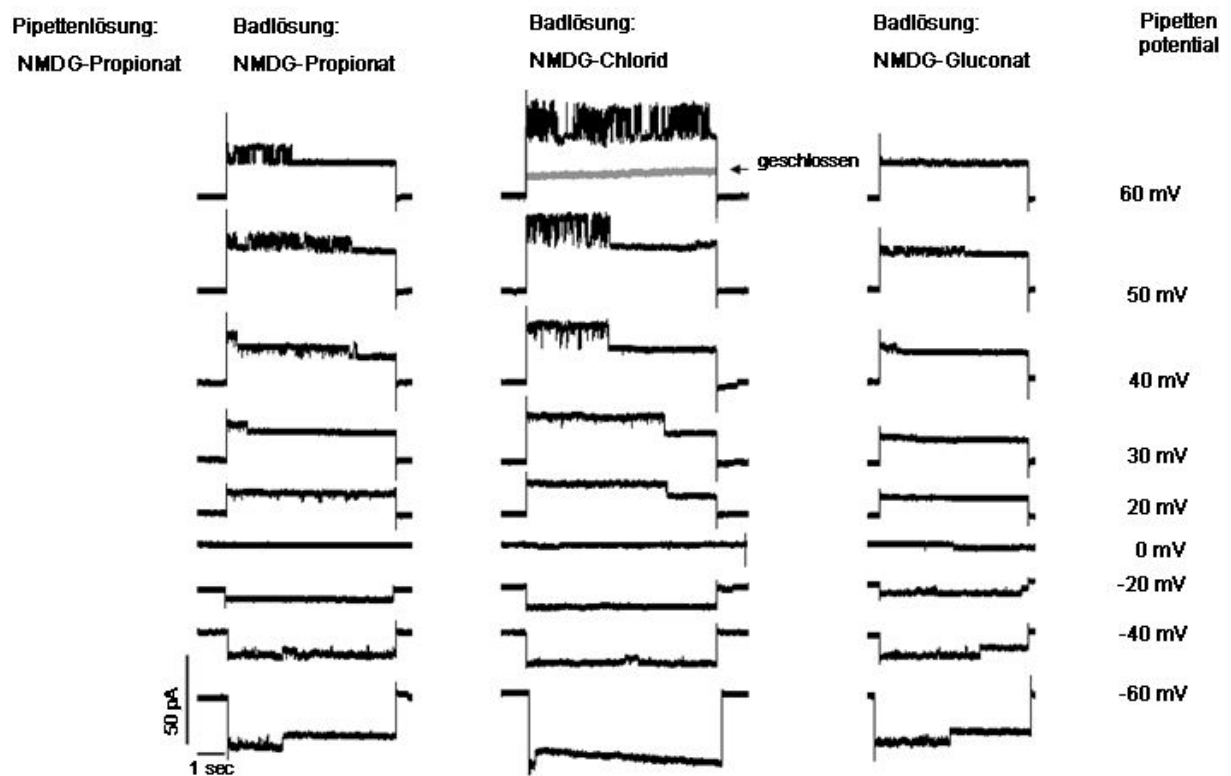


Abbildung 58

Einzelkanalströme die durch ein herausgelöstes Stück der Zellmembran einer Pansenepithelzelle gemessen wurden.

In der Mehrzahl der herausgelösten Membranstücke konnten keine Kanäle beobachtet werden. Von diesen „stummen“ Membranen eindeutig abgrenzbar war die Minderheit an Membranstückchen, die Kanäle enthielten (sh. Abbildung 58). Es waren große Kanalereignisse zu sehen, deren Größe bei positivem Pipettenpotential von dem Anion in der Badlösung abhing. Sie wurden durch das Einströmen der Anionen im Bad durch den Kanal hindurch in die Pipette verursacht, wobei das positive Pipettenpotential als Triebkraft fungierte.

Bei NMDG-Chlorid in der Badlösung sind die bei positivem Potential gemessenen Ströme besonders groß, und fallen bei NMDG-Propionatlösung im Bad deutlich ab. Bei NMDG-Gluconat in der Perfusionslösung sind bei positivem Potential kaum Kanalereignisse zu sehen, da das Gluconatmolekül zu groß ist, um durch den Kanal zu permeieren. Die Kanalereignisse bei negativen Potentialen werden durch das Ausströmen von Propionationen aus der Pipette durch den Kanal hindurch ins Bad verursacht. Da sich die Zusammensetzung der Pipettenlösung nicht änderte, sind diese unabhängig von der Zusammensetzung der Badlösung zu beobachten.

4.4.10.2 Zusammenfassung der Einzelkanalmessungen im Strom-Spannungs Diagramm

Im Strom-Spannungsdiagramm (sh. Abbildung 59) sind alle Daten der Einzelkanalmessungen an isolierten Pansenepithelzellen zusammengefasst.

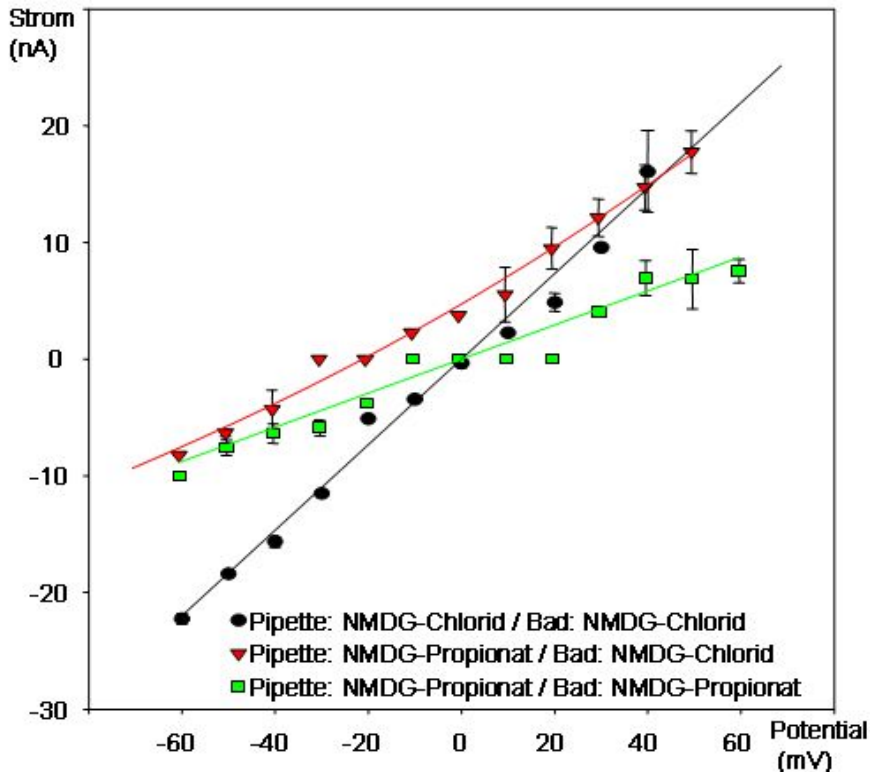


Abbildung 58

Strom-Spannungsdiagramm der Einzelkanalmessungen

Zunächst wurden die Messpunkte für die Einzelkanalleitfähigkeit der Kanäle in symmetrischer NMDG-Chloridlösung (schwarze Kreise), symmetrischer NMDG-Propionatlösung (grüne Vierecke) und asymmetrischer NMDG-Propionatlösung in der Pipette und NMDG-Chloridlösung im Bad (rote Dreiecke) eingetragen. Für die symmetrischen Messlösungen (Pipette = Bad) ergeben sich Regressionsgeraden, aus deren Steigungen die Einzelkanalleitfähigkeiten des Kanals für Chlorid (schwarze Linie) und für Propionat (grüne Linie) berechnet werden können. Die Einzelkanalleitfähigkeit isolierter Pansenepithelzellen beträgt für Chlorid ca. 350 pS und 100 pS für Propionat

Mit Hilfe der Goldman-Hodgkin-Katz Gleichung für den Strom (Hille, 2001; Stumpff *et al.*, 2009) und dem Programm Sigma Plot konnte ebenfalls die Kurve für die asymmetrischen Lösungen (Propionatlösung in der Pipette und Chloridlösung im Bad) ermittelt werden (rote Linie). Bei Hyperpolarisation (-60 mV) liegen die Werte der asymmetrischen Lösung (rote

Dreiecke) zusammen mit denen der symmetrischen Propionatlösung (grüne Vierecke), entsprechend dem Ausstrom von Propionat aus der Pipette durch den Kanal ins Bad. Bei Depolarisation (+60 mV) liegen die Werte der asymmetrischen Lösung (rote Dreiecke) zusammen mit denen der symmetrischen Chloridlösung (schwarze Kreise), entsprechend dem Einstrom von Chlorid aus dem Bad durch den Kanal in die Pipette. Mit zunehmendem Potential nimmt der Einfluss des Konzentrationsgradienten ab und die Kurve nähert sich asymptotisch den für die symmetrischen Konzentrationen bestimmten Geraden.

4.4.10.3 Einzelkanalmessungen an isolierten Psalterepithelzellen

Ebenfalls wurden auch an isolierten Psalterepithelzellen in der Inside-out-Konfiguration Einzelkanalmessungen durchgeführt (sh. Abbildung 60). Die Kanalereignisse sind wie bei den Pansenepithelzellen besonders bei Depolarisation ab +30 mV gut zu sehen. Hier wurde mit einer NMDG-Propionatlösung als Pipettenlösung gearbeitet. Bei NMDG-Chlorid in der Perfusionslösung sind die Kanalereignisse am stärksten zu sehen, entsprechend der höheren Leitfähigkeit des Kanals für das Anion Chlorid. Doch auch bei NMDG-Propionat in der Perfusionslösung sind die Kanalereignisse noch deutlich zu erkennen. Bei NMDG-Gluconat in der Perfusionslösung führte die Depolarisation zu keinen deutlichen Kanalereignissen. Eine Mischung der Lösungen NMDG-Propionat und NMDG-Chlorid zu gleichen Teilen in der Perfusionslösung führte ebenfalls bei Depolarisation zu sichtbaren Ereignissen. Dies spricht gegen eine negative Interaktion beider Anionen miteinander.

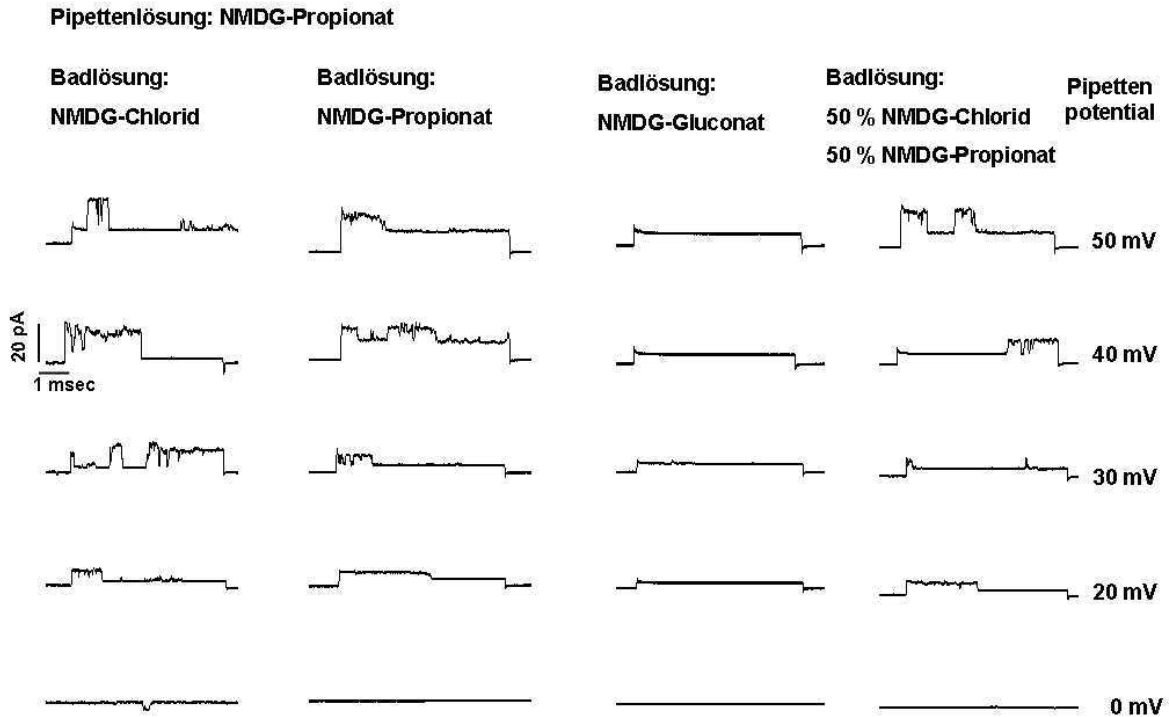


Abbildung 60

Einzelkanalmessungen in der Inside-out-Konfiguration an einer Psalterepithelzelle. In der Pipette befand sich eine NMDG-Propionatlösung. Deutlich sind die Kanalereignisse bei Depolarisation (+50 mV) zu erkennen. Die Anionen aus der Badlösung werden durch das positive Potential durch den Anionenkanal zur Pipettenelektrode hin getrieben. Bei NMDG-Gluconat in der Badlösung sind allenfalls winzigste Kanalereignisse zu sehen, da das Gluconation zu groß ist. Die Leitfähigkeit des Kanals nimmt somit mit der Größe des Anions ab.

4.4.10.4 Vergleich der Einzelkanalmessungen an Pansen- und Psalterepithelzellen

Im folgenden Diagramm (sh. Abbildung 61) wurden die Einzelkanalmessungen der Pansen- und Psalterepithelzellen miteinander verglichen. Für beide Zelltypen konnten die Messergebnisse mit einer Einzelkanalleitfähigkeit für Chlorid von 350 pS und 100 pS für Propionat in befriedigenderweise angepasst werden.

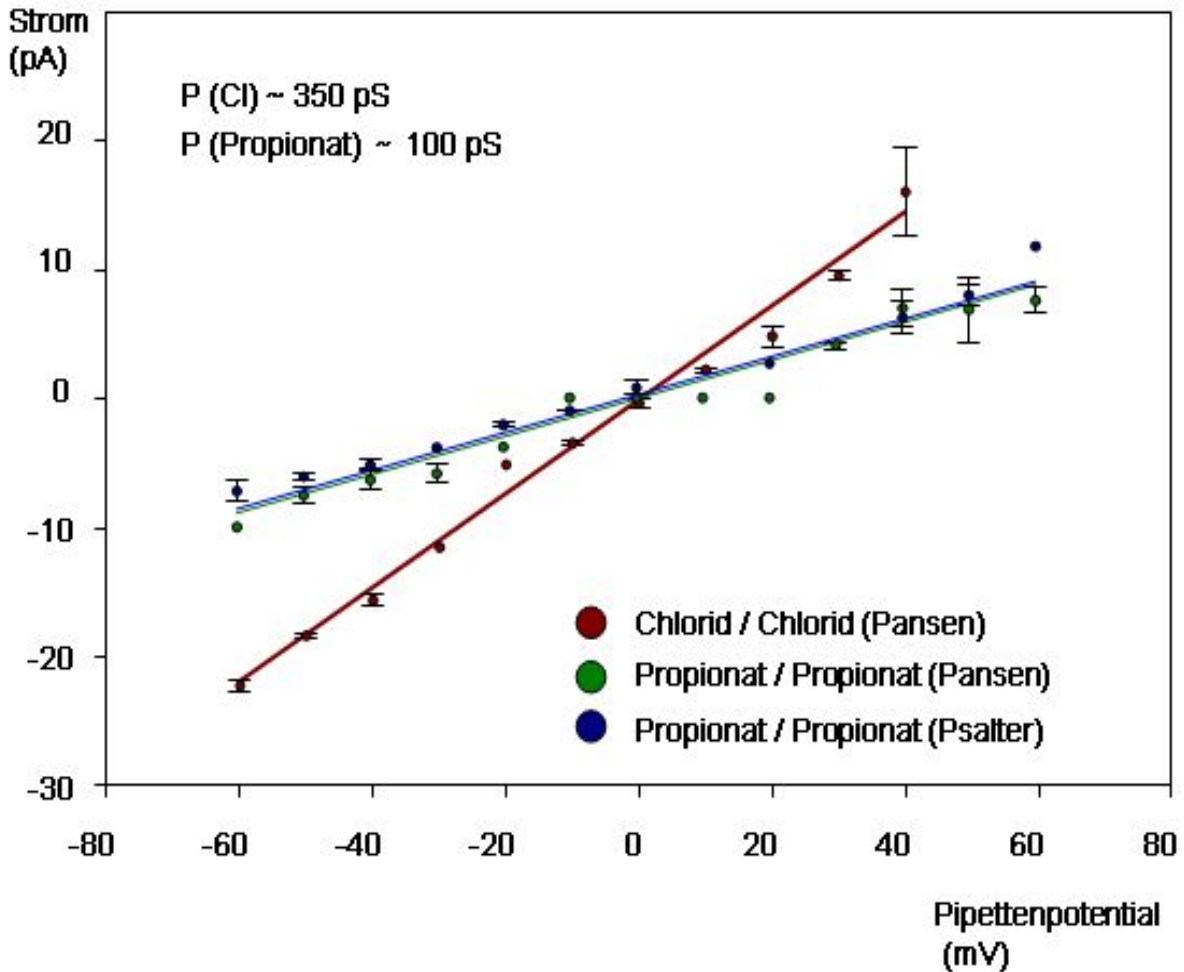


Abbildung 61

Strom-Spannungsdiagramm der Einzelkanalmessungen an Pansen- und Psalterepithelzellen. Die Regressionsgerade der Einzelkanalleitfähigkeit für Propionat ist für Pansen- (grün) und Psalterepithelzellen (blau) fast gleich.

4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Durch die in dieser Studie neu konzipierte Zellisolationskammer ist es nun auch möglich, Psalterepithelzellen zu isolieren und zu kultivieren. Mit Hilfe der Immunhistochemischen Färbungen konnte gezeigt werden, dass das native Pansen- und Psaltergewebe und ebenfalls isolierte Pansen- und Psalterepithelzellen die Tight Junction Proteine Occludin, Claudin 1, 4 und 7 exprimieren. Die Claudine 1 und 4 sind charakteristisch für besonders dichte Epithelien und stellen eine Barriere für den Stofftransport dar. Diese Daten unterstützen die Auffassung, dass der Anionentransport, besonders von größeren Molekülen wie kurzkettigen Fettsäureanionen, transzellulär erfolgt.

Die Ergebnisse der Ganzzellmessungen der Patch-Clamp-Experimente bestätigen eine reversible, DIDS-sensitive Chloridleitfähigkeit (Stumpff *et al.*, 2009). Der Blocker NPPB führte

ebenfalls zu einer reversiblen Hemmung der Chloridleitfähigkeit. Gadolinium und Arachidonsäure führten zu einer nicht reversiblen Hemmung des Chloridauswärtsstroms. Der Blocker Glibenclamid zeigte keine signifikanten Effekte.

An isolierten Pansenepithelzellen konnte eine Leitfähigkeit für Propionat nachgewiesen werden. Diese ist reversibel DIDS, pCMBs und NPPB sensitiv. Ebenfalls konnte an diesen Zellen eine reversible DIDS-sensitive Butyratleitfähigkeit nachgewiesen werden. Die relativen Leitfähigkeiten im Vergleich zu Chlorid waren 0,26 für Gluconat, 0,36 für Butyrat, 0,39 für Propionat und 0,42 für Azetat. Die Sequenz der Anionen-Leitfähigkeiten ist somit: Chlorid > Acetat > Propionat > Butyrat > Gluconat. Zusätzlich wurde an den isolierten Pansenepithelzellen eine reversible DIDS-sensitive Laktatleitfähigkeit nachgewiesen.

Für die eingesetzten Halide ergab sich die Sequenz: $F^- \approx Cl^- \approx Br^- > I^-$.

Ebenfalls konnte mit Hilfe der Ganzzellmessungen an isolierten Psalterepithelzellen eine reversible DIDS-sensitive Chlorid- und Azetatleitfähigkeit nachgewiesen werden.

Ein Vergleich der Auswärtsströme und Leitfähigkeiten von Pansen- und Psalterepithelzellen in identischen Lösungen (Natriumchlorid, Natriumgluconat und Natriumazetat) zeigte keinen signifikanten gewebespezifischen Unterschied.

Dank der Einzelkanalmessungen konnte gezeigt werden, dass Pansen- und Psalterepithelzellen einen Anionkanal aufweisen, der für die Anionen der kurzkettigen Fettsäuren durchlässig ist. Die Einzelkanalleitfähigkeit beträgt ca. 350 pS für Chlorid und 100 pS für Propionat.

5 Diskussion

5.1 Einführung

Da Wiederkäuer ihren Energiebedarf zu 80 % aus kurzkettigen Fettsäuren decken, ist die ungestörte Produktion und Resorption kurzkettiger Fettsäuren im Pansen von herausragender Bedeutung (Bergman, 1990; Gäbel *et al.*, 2002). Im Pansen der Wiederkäuer werden bis zu $100 \text{ mol} \cdot \text{d}^{-1}$ kurzkettige Fettsäuren produziert, die überwiegend von den Vormägen resorbiert werden. Die mengenmäßig wichtigsten sind Azetat, Propionat und Butyrat.

Sehr häufig kommt es bei rohfaserarmer und kohlenhydratreicher Fütterung von Produktions-Wiederkäuern zur akuten Pansenazidose bzw. zur subakuten ruminalen Azidose (Krause und Oetzel, 2005; Morgante *et al.*, 2007). Diese Erkrankungen treten in engem Zusammenhang mit dem Absinken des intraruminalen pH-Wertes und der Anhäufung kurzkettiger Fettsäuren im Pansen auf. Das Pansenepithel selbst kann so stark beschädigt werden, dass es zu Nekrosen kommt und Bakterien und Toxine aus dem Pansen in den Blutkreislauf des Tieres übertreten. Systemische Erkrankungen sind die Folge. Die betroffenen Tiere zeigen erhebliche Leistungseinbußen, welche zu großen wirtschaftlichen Verlusten führen: im schlimmsten Fall verenden die Tiere.

Zwar gibt es unzählige Studien mit verschiedenen Fütterungsmodellen, doch es besteht noch erheblicher Klärungsbedarf bezüglich des genauen Pathomechanismus der Erkrankungsgruppe. So ist das Verständnis der genauen Transportmechanismen für kurzkettige Fettsäuren am Vormagenepithel der Wiederkäuer noch unvollständig, obschon dieses als eine Voraussetzung für das Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen gesehen werden muss, die zu den systemischen Manifestationen der Pansenazidose führen (Owens *et al.*, 1998; Kleen *et al.*, 2003; Nagaraja und Titgemeyer, 2007; Vasconcelos und Galyean, 2008). So vermag das einfache Diffusionsmodell nicht zu erklären, warum ein Absinken des ruminalen pH-Wertes nicht eine rasche Rückregulation durch vermehrten Efflux der protonierten Säure bewirkt, sondern im Gegenteil einen Teufelskreis mit Anreicherung beider. Auch bei physiologischem Pansen pH steht eine viel größere Menge kurzkettiger Fettsäureanionen als Protonen im Pansenlumen zur Verfügung; nach dem einfachen Diffusionsmodell müsste hier bereits eine gestörten Resorption vorliegen.

Dabei sind die Erkenntnisse aus den Studien zum Transportmechanismus von Fettsäuren am Pansen nicht nur für den Wiederkäuer von Bedeutung; auch im Colon werden Fettsäuren produziert und von dort über das Epithel ins Blut transportiert. Historisch konnte der

transepitheliale Transport von Fettsäuren jedoch zunächst am Pansenepithel nachgewiesen werden (McAnally, 1942). Der Pansen gilt seither als ein wichtiges Modell für allgemeine Untersuchungen zum epithelialen Stofftransport (Bergman, 1990; Sehested *et al.*, 1999a; Gäbel *et al.*, 2002; Aschenbach *et al.*, 2009; Stumpff *et al.*, 2009).

Wie bereits in der Einleitung erläutert, ist aus früheren Studien bekannt, dass Chlorid vom Pansenepithel resorbiert wird. Inzwischen kann es als gesichert gelten, dass Chlorid apikal durch einen Anionenaustauscher aufgenommen, und basolateral über einen Kanal ins Blut gelangt (Sehested *et al.*, 1999a; Abdoun *et al.*, 2005; Leonhard-Marek *et al.*, 2006; Aschenbach *et al.*, 2009; Stumpff *et al.*, 2009). Hierin gleicht der Pansen anderen resorbierenden Epithelien wie dem Colon (Schmidt *et al.*, 2004). Am Pansen konnte der für die basolaterale Ausschleusung von Chlorid verantwortliche Kanal inzwischen näher charakterisiert werden; dabei zeigte sich, dass der Kanal neben Chlorid auch weitere Anionen wie Bikarbonat und Azetat leitet. (Stumpff *et al.*, 2009). Der Kanal wird somit als Effluxweg für Azetatanionen aus dem Pansenepithel ins Blut diskutiert (Leonhard-Marek *et al.*, 2009; Aschenbach *et al.*, 2010 (submitted)).

Neben Azetat werden Propionat und Butyrat bei den Fermentationsprozessen im Pansen gebildet (Bergman, 1990). Ausgehend von den Erkenntnissen vorangegangener Untersuchungen, sollte in dieser Studie untersucht werden, ob isolierte Pansenepithelzellen neben Azetat auch eine Leitfähigkeit für das kurzkettige Fettsäureanion Propionat besitzen. In der vorliegenden Arbeit wurde dies mit der Patch-Clamp-Technik untersucht. Mit Hilfe dieser Technik kann die Leitfähigkeit von Zellmembranen für Ionen direkt gemessen werden.

Über den Anionentransport am Psalter gibt es bisher nur recht wenige Untersuchungen (Harrison, 1971; Martens und Gabel, 1988). So waren Messungen an kultivierten Zellen des Psalters nicht möglich, weil es bislang keine Methode zur Isolierung von Psalterepithelzellen gab. Um ebenfalls Patch-Clamp-Experimente an isolierten Psalterepithelzellen durchführen zu können, wurde im Rahmen dieser Studie zunächst eine Isolationsmethode für Psalterepithelzellen etabliert. Durch immunhistochemische Methoden wurden diese Zellen und die aus dem Pansen isolierten Zellen anschließend charakterisiert; ein epithelialer Ursprung kann aufgrund dieser Untersuchungen als gesichert gelten.

In den Patch-Clamp-Experimenten an isolierten Pansen- und Psalterepithelzellen in der Ganzzelleableitung wurde der Einfluss verschiedener kurzkettiger Fettsäureanionen und Ionenkanalblocker auf die Leitfähigkeit der Zellmembran untersucht. Zur weiteren Charakterisierung wurde auch die Leitfähigkeit für verschiedene Halide gemessen. In

Einzelkanalmessungen in der Inside-out Konfiguration an beiden Zelltypen wurde die Einzelkanalleitfähigkeit für Propionat ermittelt.

5.2 Zellisolierung

5.2.1 Verbesserung der bisherigen Isolierungsmethode für Pansenepithelzellen

Die Zellen für die Patch-Clamp-Experimente wurden aus dem Pansenepithel von frisch geschlachteten Schafen gewonnen. In den meisten Studien, die mit Pansenepithelzellkulturen durchgeführt wurden, wurde die klassische Isolierungsmethode nach Galfi verwendet (Galfi *et al.*, 1981). Die Pansenzotten werden mit einer Schere manuell abgeschnitten und anschließend in einer Trypsinlösung inkubiert. Das Trypsin wirkt an der gesamten Oberfläche der abgeschnittenen Pansenzotten; also auch am bindegewebigen Teil der Pansenzotte, der Schnittstelle. Es besteht die Gefahr, eine inhomogene Zellkultur zu erhalten, da auch Fibroblasten und andere Zellen des subepithelialen Raums aus der Schnittstelle ins Trypsin-Zellgemisch gelangen können.

Der wesentliche Vorteil der in dieser Studie neu etablierten Isolierungsmethode mit Hilfe der Zellisolationskammer ist, dass die Trypsinlösung nur von apikal auf das eingespannte Epithel wirkt. Das Abschneiden der Zotten entfällt und die Struktur des Epithels bleibt intakt. Die Gefahr einer Kontamination mit Zellen des subepithelialen Raums wird so minimiert.

5.2.2 Isolierung der Psalterepithelzellen

In dieser Studie wurde in Anlehnung an die neue Isolierungsmethode für Pansenepithelzellen mit Hilfe der Zellisolationskammer ebenfalls die Isolierung von Psalterepithelzellen durchgeführt. Die Psalterepithelzellen wurden nach dem in Kapitel Material und Methoden beschriebenen Verfahren kultiviert.

5.3 Charakterisierung der Pansen- und Psalterepithelzellen

5.3.1 HE-Färbung

Da es bei der Etablierung der neuen Isolierungsmethode mithilfe der Zellisolationskammer noch keine Angaben zur optimalen Dauer der Trypsinbehandlung gab, wurde das Epithel nach verschiedenen Inkubationszeiten in Trypsin-EDTA-Lösung in der Zellisolationskammer HE-gefärbt. Somit konnte die Eindringtiefe des Trypsins in die Epithelschichten kontrolliert werden. Die benötigte Einwirkzeit des Trypsins bis zum Ablösen der oberen Zellschichten hing von der Qualität des Epithels ab, z. B. ob dieses von einem älteren Schaf stammte und

eine dickere Hornschicht aufwies. Wichtig war es, das Trypsin lange genug einwirken zu lassen, da nur Zellen aus dem Stratum basale in Kultur wachsen und proliferieren (Graham und Simmons, 2005). Andererseits sollte vermieden werden, bei der Trypsinierung ins subepitheliale Gewebe vorzudringen.

5.3.2 Färbung der Zytokeratine

Um die kultivierten Zellen zu charakterisieren, wurden immunhistochemische Färbungen der Zytokeratine der Pansen- und Psalterepithelzellen durchgeführt. Zytokeratine sind filamentartige Strukturen im Zytosol von Epithelzellen (Franke *et al.*, 1981; Moll *et al.*, 1982). Durch den Nachweis der Expression von Zytokeratin lässt sich der epitheliale Ursprung der Zellkultur nachweisen.

Am in der Zellisolationkammer eingespannten und mit Trypsin behandelten Epithel konnte bestätigt werden, dass bereits die Zellschicht des *stratum basale* Zytokeratin exprimiert. Nach ca. einer Woche in Kultur wurden die zugehörigen Primärkulturzellen ebenfalls immunhistochemisch untersucht. Die Expression der für Epithelzellen charakteristischen Zytokeratine Pan-Zytokeratin und Zytokeratin AE1 bestätigt, dass es sich um Zellen epithelialen Ursprungs handelt.

Bei diesen Untersuchungen fiel auf, dass nicht alle kultivierten Pansen und Psalterepithelzellen die Zytokeratine Pan-Zytokeratin und Zytokeratin AE1 in gleichem Maße exprimierten. Um diese Variabilität weiter zu untersuchen, wurden zusätzliche Vimentin-Färbungen durchgeführt (keine Abbildung). Vimentin wird häufig als Marker für Fibroblasten verwendet; jedoch zeigen zahlreiche Untersuchungen, dass die Expression von Vimentin unspezifisch ist und nicht nur von einem bestimmten Zelltyp wie z. B. Fibroblasten produziert wird. Vielmehr muss Vimentin als Marker für proliferierende Zellen betrachtet werden und wird so auch von proliferierenden Keratinozyten, insbesondere unter Kulturbedingungen, exprimiert (Raymond und Leong, 1989; Richard *et al.*, 1990; Tomakidi *et al.*, 1997; van der Velden *et al.*, 1999; Hansson *et al.*, 2003). Der Nachweis von Vimentin gelingt auch in Zelllinien epithelialen Ursprungs, so z.B. MDBK-Zellen (Madin-Darby Bovine Kidney) (Ben-Ze'ev, 1984) oder MDCK-Zellen (Madin-Darby Canine Kidney) (eigene Untersuchungen zusammen mit Dorothee Günzel).

5.3.3 Färbungen der Tight Junction Proteine

Epithelien besitzen ein dichtes Netz an Tight Junctions. Diese Strukturen dienen zum einen als parazelluläre Barriere für niedermolekulare Stoffe; aber auch der selektive Transport

bestimmter Ionen kann durch spezielle Tight Junction Proteine hindurch erfolgen. Aktuell sind 24 verschiedene Claudine beim Menschen bekannt, es stehen jedoch nicht für alle Claudine Antikörper zur Verfügung. Bei den immunhistochemischen Färbungen am nativen Pansen- und Psalterepithel konnte eine membranständige Expression der Proteine der Tight Junction: Occludin, Claudin 1, 4 und 7 nachgewiesen werden. Die Claudine 1 und 4 sind typischerweise in „dichten“ Epithelien mit fast undurchlässigen Tight Junctions lokalisiert (z. B. Dickdarm, distaler Nierentubulus und Epidermis) (Amasheh *et al.*, 2005). Claudin 7 gilt als ein für Anionen impermeables Tight Junction Protein (Alexandre *et al.*, 2005); allerdings mit einer gewissen Durchlässigkeit für Kationen.

Hierdurch konnten Beobachtungen an der Ussingkammer bestätigt werden, wonach es sich beim Pansen- und Psalterepithel um ein besonders dichtes Epithel handelt; insbesondere der Transport von Anionen dürfte primär transzellulär erfolgen. Die kultivierten Pansen- und Psalterepithelzellen exprimierten ebenfalls die Proteine: Occludin, Claudin 1, 4 und 7. Dies belegt, dass die kultivierten Pansen- und Psalterzellen epithelialen Ursprungs sind.

5.4 Patch-Clamp-Technik

5.4.1 Methode zur Untersuchung einzelner Ionenkanäle

Mit Hilfe der erstmals 1976 von Erwin Neher und Bert Sakmann beschriebenen Patch-Clamp-Technik wurde es möglich, Ionenströme von wenigen Picoampere über einzelne Kanalproteine zu messen; für diese Entdeckung wurde 1991 der Nobelpreis für Medizin und Physiologie verliehen (Neher und Sakmann, 1976). Mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik konnten daraufhin eine Vielzahl von Ionenkanälen untersucht werden; nur so ist es möglich, direkt die biophysikalischen Eigenschaften von Kanälen wie die Leitfähigkeit für einzelne Ionen, relative Permeabilität, Eisenmannsequenz, Blockersensitivität und Spannungsabhängigkeit zu untersuchen. Im Kapitel Material und Methoden wird die Patch-Clamp-Technik im Detail erklärt.

5.4.2 Verwendete Lösungen in den Patch-Clamp-Experimenten

Bei den mit der Patch-Clamp-Technik durchgeführten Experimenten gilt besondere Sorgfalt bei der exakten Planung der Zusammensetzung der extra- und intrazellulären Lösungen und beim Ansetzen dieser Lösungen. Unerwünschte Abweichungen der Ionenkonzentration, der Osmolarität und dem pH-Wert zwischen Perfusions- und Pipettenlösung können die gemessenen Ionenströme stark beeinflussen und müssen vermieden werden.

Hypo- oder hyperosmolare Lösungen können zum Schrumpfen oder Anschwellen der Zellen führen. Die Volumenregulation der Zelle kann von veränderten Leitfähigkeiten für verschiedene Ionen begleitet sein. Bekannt ist dieses Phänomen bei Chlorid-, Kalium- oder Calciumkanälen (Sarkadi und Parker, 1991; Hoffmann, 1992). Die Osmolarität der Perfusions- und Pipettenlösungen wurde bei jeder neu angesetzten Lösung mit einem Osmometer geprüft. Gegebenenfalls wurden entsprechende Mengen des dominierenden Anions oder Mannitol der Lösung hinzugefügt, um eine Osmolarität von $290 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ zu erreichen.

Protonen können ebenfalls die Eigenschaften vieler Ionenkanäle modifizieren (Chesler und Kaila, 1992). Bei den Ganzzellmessungen wurden alle verwendeten Badlösungen mit Tris-OH auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt, die Pipettenlösungen auf einen pH-Wert von 7,2. Bei den Einzelkanalmessungen werden die Ströme nur an einem aus der Zellmembran herausgelösten Membranstück gemessen und nicht wie bei der Ganzzellmessung über die gesamte Zellmembran. Da in der Inside-Out Konfiguration gearbeitet wurde, befand sich die ehemalige Außenseite der Zellmembran in direktem Kontakt mit der Pipettenlösung; die ehemalige Innenseite der Zellmembran befand sich in direktem Kontakt mit der Perfusionslösung. Deshalb wurden bei den Einzelkanalmessungen die Perfusionslösungen auf einen pH-Wert von 7,2 und die Pipettenlösungen auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

5.4.3 Ganzzellkonfiguration

Da das Pansenepithel ein polares Epithel ist, besteht ein Unterschied zwischen der apikalen und der basolateralen Membran. In Ussingkammerversuchen ist es möglich, die Polarität eines Epithelstücks zu erhalten. Da bei den Patch-Clamp-Experimenten mit kultivierten und einzeln isolierten Zellen gearbeitet wird, geht diese Polarität verloren. Die Zellen werden bei der Isolierung aus dem ursprünglichen Zellverband gelöst und in Trypsinlösung suspendiert. Da die Zellen vereinzelt ausgesät werden, kann nicht genau bestimmt werden, ob sich die ursprüngliche Polarität (apikal/serosal) ausbildet. Beim Patchen wird an einer einzelnen Zelle gearbeitet, die von einer genau definierten Badlösung umspült wird. Es nicht möglich, die gemessenen Effekte einem bestimmten Membranabschnitt der Zelle (apikal oder basolateral) zuzuordnen. Bei der Diskussion der Daten in den folgenden Abschnitten wurde dies berücksichtigt.

Der Austausch von Ionen zwischen Pipetten- und Zellinnerem findet innerhalb von Sekunden statt (Pusch und Neher, 1988). Die Geschwindigkeit des Stoffaustausches zwischen Pipette und Zelle hängt vom Volumen der Zelle und dem Durchmesser der Pipettenspitze ab. Bei den eigenen Experimenten dauerte es ca. zwei Minuten nach dem Herstellen der

Ganzzellkonfiguration bis sich stabile Verhältnisse eingestellt hatten. Da das Volumen der Pipettenlösung wesentlich größer als das Zellvolumen war, blieb die Zusammensetzung der Pipettenlösung dabei praktisch unverändert. Für die Experimente hat dieser Vorgang sowohl Vor- als auch Nachteile: Einerseits verliert das Zytoplasma seine natürliche Zusammensetzung und damit auch Substanzen wie ATP oder kleine Proteine, die für die Funktion der untersuchten Kanäle wichtig sein könnten (Numberger und Draghun, 1996). Andererseits ist es möglich, das intrazelluläre Milieu in der Ganzzellkonfiguration genau zu kontrollieren. In den vorliegenden Untersuchungen wurde von dieser Möglichkeit Gebrauch gemacht, indem zur Reduktion von Kationenleitfähigkeiten die Kaliumkonzentration auf geringe Werte ($5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) abgesenkt wurde, und durch Natrium ersetzt wurde, das von Pansenepithelzellen nur in geringem Umfang geleitet wird (Leonhard-Marek *et al.*, 2005; Brinkmann, 2006). Dabei wurde auf eine identische Natriumkonzentration innen und außen geachtet; eine Natriumleitfähigkeit dürfte so nicht zu einem von Null verschiedenen Membranpotential beitragen.

Die Anzahl bestimmter Ionenkanäle ist bei jeder Zelle unterschiedlich. In der Ganzzellkonfiguration kann nicht bestimmt werden, wie viele Kanäle sich in der Zellmembran befinden, bzw. wie viele von ihnen im „offenen“ oder „geschlossenen“ Zustand sind. Hierfür sind Einzelkanalmessungen nötig.

5.4.4 Einzelkanalmessungen

Wie bereits erwähnt, wird bei Einzelkanalmessungen der Strom nur an einem aus der Zellmembran herausgelösten Membranstück gemessen. Sie ist die Methode der Wahl, um einzelne Ionenkanäle zu untersuchen, da in dieser Konfiguration die Ereignisse eines einzelnen Ionenkanals registriert werden können. Daraus kann anschließend die Leitfähigkeit eines einzelnen Kanals für ein bestimmtes Ion berechnet werden. Da das herausgelöste Membranstück bei den Einzelkanalmessungen nur ein winzigster Teil der gesamten Membran darstellt, ist es eher unwahrscheinlich, dass sich zwei verschiedene Kanalspezies in dem herausgelösten Membranstück befinden.

Ein weiterer Vorteil der Einzelkanalmessungen ist die Möglichkeit, ganz unmittelbar während der Messung die Stabilität des Seals zu überprüfen.

5.4.5 Inside-Out-Konfiguration

In der Inside-Out-Konfiguration wird durch das Herauslösen eines Membranstücks die ehemals zytosolische Seite der Zellmembran mit verschiedenen Lösungen umspült. Die

meisten Kanäle werden durch intrazelluläre Prozesse z. B. durch second messenger wie cAMP oder ATP aktiviert. Allerdings enthält das Membranstück nicht nur die integralen Membranproteine, sondern auch Strukturen, die an der Membranninnenseite haften, wie Transduktionsproteine, Organellen oder Teile des Zytoskeletts (Szaszi *et al.*, 2000). Durch Herstellung der Inside-Out-Konfiguration wird das Zytosol mitsamt seinen Strukturen zerstört. Ein weiteres Problem dieser Konfiguration ergibt sich aus dem Auswaschen von niedermolekularen intrazellulären Bestandteilen. Unter Umständen werden die zu untersuchenden Kanäle nicht wie *in vivo* reguliert. Auch bei der Inside-Out-Konfiguration können die Kanäle nicht einer apikalen oder basolateralen Seite der Zelle zugeordnet werden.

5.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der Patch-Clamp-Experimente

5.5.1 Ganzzellmessungen an isolierten Pansenepithelzellen

Um die Anionenleitfähigkeit der Pansenepithelzellen zu untersuchen, wurden Patch-Clamp-Experimente in der Ganzzellkonfiguration an isolierten und mit Natriumgluconat gefüllten Pansenepithelzellen durchgeführt. In die Badlösung wurden im Wechsel verschiedene Anionenlösungen appliziert und die Stromantwort der Zellen auf definierte Spannungspulse gemessen.

5.5.2 Chloridleitfähigkeit

In der Ganzzellkonfiguration zeigten die untersuchten Pansenepithelzellen eine signifikante Chloridleitfähigkeit. Der Wechsel von Chlorid zu Gluconat in die Badlösung war neben dem Absinken des Chlorideinstroms von einer signifikanten Depolarisation des Membranpotentials begleitet ($n = 142$, $p < 0,001$).

5.5.3 Propionatleitfähigkeit

Die Pansenepithelzellen zeigten eine signifikante Propionatleitfähigkeit. Im Vergleich zur Gluconatlösung war der Propionateinstrom signifikant höher und das Umkehrpotential hyperpolarisierte signifikant in Propionatlösung ($n = 53$, $p < 0,001$), entsprechend einem vermehrten Einstrom von Propionatanionen in die Zelle.

5.5.4 Butyratleitfähigkeit

Ebenfalls konnte eine, wenn auch deutlich geringere, Butyratleitfähigkeit nachgewiesen werden. Das Umkehrpotential hyperpolarisierte signifikant beim Wechsel von Gluconat- zu Butyratlösung ($n = 31$, $p < 0,001$).

5.5.5 Laktatleitfähigkeit

Da der gemessene Laktateinstrom signifikant größer war als in Gluconatlösung und das Umkehrpotential beim Wechsel von der Gluconat- zur Laktatlösung signifikant negativer wurde ($n = 25$, $p < 0,001$), konnte auch eine Laktatleitfähigkeit nachgewiesen werden.

5.5.6 Vergleich der Leitfähigkeiten der kurzkettigen Fettsäureanionen an isolierten Pansenepithelzellen

Die relativen Leitfähigkeiten der kurzkettigen Fettsäureanionen im Vergleich zu Chlorid wurden mit Hilfe der Umkehrpotentiale berechnet. Mit zunehmender Kettenlänge der kurzkettigen Fettsäureanionen nahm deren relative Leitfähigkeit im Vergleich zu Chlorid ab.

P(Gluconat)/P(Cl): 0.26 ± 0.01 ; ($n = 39$)

P(Laktat)/P(Cl): 0.35 ± 0.33 ; ($n = 25$)

P(Butyrat)/P(Cl): 0.36 ± 0.02 ; ($n = 32$)

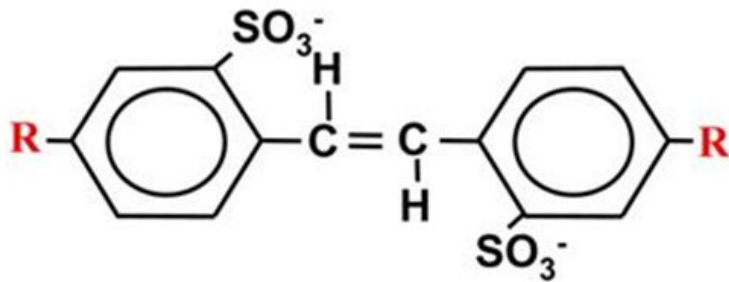
P(Propionat)/P(Cl): 0.39 ± 0.01 ($n = 47$)

P(Azetat)/P(Cl): 0.42 ± 0.01 ; ($n = 16$)

5.5.7 DIDS

Das Stilbenderivat DIDS (4,4'-Diisothiocyanostilben-2,2'-Disulfonsäure, Strukturformel sh. Abbildung 62) wird „klassisch“ in verschiedenen Geweben und Zelltypen als relativ spezifischer Inhibitor von Anionentransportern und Anionenkanälen verwendet (Knickelbein, R. *et al.*, 1985a; Knickelbein, R. G. *et al.*, 1985b).

DIDS



(4,4'-Diisothiocyanostilben-2,2'-Disulfonsäure)

Abbildung 62

Struktur von DIDS, einem Stilbenderivat, das als spezifischer Anionenkanalblocker eingesetzt wird.

Der Anionenkanalblocker DIDS wurde in dieser Studie in der Ganzzellkonfiguration bei allen Perfusionslösungen mit einer Konzentration von $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ hinzugefügt und dessen Effekt untersucht. Es kam bei allen Anionen-Lösungen - Chloridlösung ($n = 13$, $p < 0,001$), Propionatlösung ($n = 13$, $p < 0,001$), Butyratlösung ($n = 13$, $p < 0,001$), Laktatlösung ($n = 21$, $p < 0,001$), Halidlösungen ($n = 16$, $p = 0,001$) - zu einer signifikanten, reversiblen Abnahme der gemessenen Stromantwort bei Depolarisation. In den eigenen Untersuchungen konnte somit an isolierten Pansen- und Psalterepithelzellen eine reversible DIDS-sensitive Anionenleitfähigkeit gezeigt werden.

Die Stromantwort bei negativen Potentialen änderte sich nicht signifikant bei der Zugabe von DIDS. Dies bedeutet, dass kein nennenswerter und durch DIDS hemmbarer Ausstrom von Gluconat aus der Pipettenlösung ins Bad zu beobachten ist. Ströme bei hyperpolarisierendem Potential dürften also entweder auf einem Influx von Natrium, oder aber auf einem Leckstrom basieren.

Bei den konventionellen Pulsprotokollen konnte die hemmende Wirkung von DIDS sehr genau im zeitlichen Verlauf beobachtet werden (sh. Abbildungen 25, 32 und 53 Ergebnisteil). Dieser Effekt lässt sich mit einem im Grunde sehr einfachen, mechanischen Modell erklären („cork in the bottle“, sh. Abbildung 63). Nach diesem Modell handelt es sich bei DIDS um ein großes Anion, dass mechanisch die apikale Pore des Anionenkanals verschließt (Droogmans *et al.*, 1998). Bei Hyperpolarisation wird das negativ geladene DIDS aus der Pore herausgeschleudert; bei Depolarisation kommt es umgekehrt zu einer Anziehung der

DIDS-Anionen in die Porenöffnung. Nach einer Depolarisation wandern die DIDS-Moleküle also in Richtung Porenregion und es dauert eine gewisse Zeit, bis alle blockierbaren Kanäle durch DIDS verschlossen sind (Droogmans *et al.*, 1998).

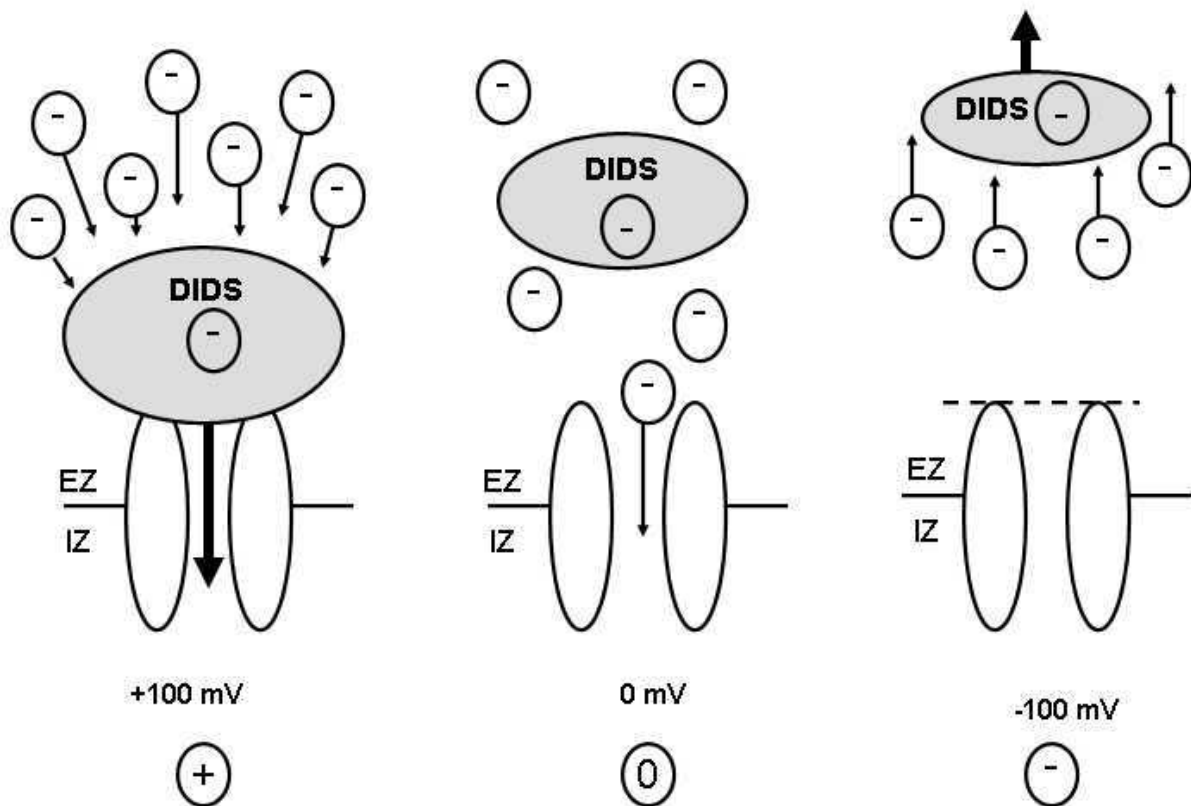


Abbildung 63

EZ: extrazellulär, IZ: intrazellulär

Dargestellt ist das Verhalten des Anionenkanalblockers DIDS. Bei Depolarisation (+100 mV, links im Bild), werden Anionen, aufgrund der elektrischen Anziehungskräfte gegensätzlicher Ladungen, zur Elektrode hingezogen. DIDS ist ein großes Anion; durch seine Größe verschließt es die Pore des Kanals für kleinere Anionen, die Stromantwort nimmt ab.

Bei 0 mV (mittig) ist kein elektrischer Gradient vorhanden. Die kleinen Anionen passieren zufällig durch Brownsche Molekularbewegungen den Kanal. Das große DIDS Molekül kann die Pore nicht passieren. Da es nicht angezogen wird, kann es sie auch nicht permanent blockieren.

Bei Hyperpolarisation (-100mV, rechts im Bild) werden negativ geladene Teilchen wie kleine Anionen (z. B. Chlorid) aber auch große Anionen wie DIDS, von der Elektrodenregion abgestoßen. Sie können nicht in die Nähe des Kanals kommen.

Interessanterweise beeinflusst die Zugabe von DIDS in die verschiedenen Anionenperfusionen nicht das Umkehrpotential der mit Natriumgluconat gefüllten Zellen. Aufgrund des hemmenden Effekts von DIDS auf die Anionenleitfähigkeit wäre zu erwarten gewesen, dass sich ein Potential in der Nähe des Nernstpotentials für Natrium (= 0 mV) einstellen würde. Somit hätte DIDS also zu einer Depolarisation der Zellen in Richtung auf 0 mV

geführt. Dies wurde jedoch nicht beobachtet. Möglicherweise hängt dies damit zusammen, dass in Anwesenheit von Magnesium die Natriumleitfähigkeit der Pansenepithelzellen sehr gering ist (Brinkmann, 2006); somit trägt sie nicht wesentlich zum Membranpotential bei. Da kaum von einem kompletten Block der Anionenleitfähigkeit, sondern nur von deren Hemmung auszugehen ist, ist es denkbar, dass die Anionenleitfähigkeit trotz DIDS weiterhin die entscheidende Größe für das Membranpotential darstellt. Hinzu kommt, dass wegen der Spannungsabhängigkeit des DIDS Blocks (s. o.) mit einer nur geringen Wirkung von DIDS am Umkehrpotential zu rechnen ist, da dieses im negativen Potentialbereich liegt. Somit verwundert es nicht, dass DIDS keine signifikanten Effekte auf das Umkehrpotential hatte.

5.5.8 Andere Anionenkanalblocker

5.5.8.1 NPPB

Die Applikation von $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ des Anionenkanalblockers NPPB hemmte reversibel den Chlorideinstrom ($n = 7$, $p < 0,001$). Auch die Applikation von NPPB in die Natriumpropionatlösung hemmte reversibel den Propionateinstrom ($n = 7$, $p < 0,001$). Das Umkehrpotential änderte sich nicht signifikant; es dürften ähnliche Gründe vorliegen wie bereits für DIDS besprochen.

5.5.8.2 Glibenclamid

Glibenclamid wird als Blocker des CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) eingesetzt (Vandorpe *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2004). Da es bei Zugabe von Glibenclamid in die NaCl-Perfusionslösung keine signifikante Änderung der Stromantwort und des Umkehrpotentials ($n = 13$, $p = 0,4$) gab, spricht dieses Ergebnis gegen die Beteiligung eines CFTR an der Chloridleitfähigkeit des Pansenepithels.

5.5.8.3 pCMBs

Die serosale Applikation von pCMBs in der Ussingkammer blockiert den Transport kurzkettiger Fettsäuren durch das Pansenepithel (Kirat und Kato, 2006), das in der Regel im Sinne eines funktionellen Nachweises eines Monocarboxylattransporters diskutiert wird. Da pCMBs jedoch auch Chloridkanäle blockiert (Nagel und Katz, 1997; Stumpff *et al.*, 2009), wurde die Wirkung auf Propionatleitfähigkeit isolierter Pansenepithelzellen untersucht. Bei Zugabe der Quecksilberverbindung pCMBs wurde eine reversible Hemmung des

Propionatstroms beobachtet ($n = 8$, $p < 0,001$). Das Umkehrpotential änderte sich nicht signifikant.

5.5.9 Weitere Kanalmodulatoren

Zusätzlich wurden weitere Kanalmodulatoren in der Ganzzellkonfiguration, wie Arachidonsäure, Gadolinium und Ionomycin untersucht. Im Kapitel Ergebnisse sind die Messungen detailliert dargestellt. Da jeweils nur wenige Zellen ($n = 3$) untersucht wurden, wird von einer ausführlicheren Diskussion und abschließenden Interpretation der Daten abgesehen.

5.5.10 Halide

Für die Charakterisierung von Anionenkanälen wird üblicherweise die Halidsequenz (Eisenmann-Sequenz) herangezogen (Hille, 2001). Halide sind Anionen der siebten Hauptgruppe des Periodensystems der Elemente. Sie sind in Lösung einfach negativ geladen und haben verschieden große Ionenradii. Durch Applikation der Halide Iodid (I^-), Bromid (Br^-) und Fluorid (F^-) wurde in dieser Studie die Eisenmann-Sequenz für den untersuchten Ionenkanal bestimmt.

Für das Verständnis des Zustands von Ionen in wässriger Lösung sind die energetischen Verhältnisse von besonderer Bedeutung. Bei der Anlagerung von Wassermolekülen um ein Ion (Hydratation) wird Energie - die Hydratationsenthalpie - frei. Diese Energie resultiert aus elektrostatischer Anziehung Ion-Dipol und hängt von der Ladung und dem Radius des betreffenden Ions ab. Kleine Ionen mit hoher Ladung besitzen demnach besonders hohe Beträge der Hydratationsenthalpie. Die kleineren Ionen bilden in wässrigen Lösungen somit stärker ausgebildete und schwerer ablösbare Hydrathüllen als die größeren. Durch die Hydratisierung sind außerdem die Größenverhältnisse im Vergleich zum kristallinen Zustand verändert. In Tabelle 16 sind die Atom und Ionenradii und die Hydratationsenthalpien einiger Halide zusammengefasst.

Bevor ein Ion die Pore eines Ionenkanals passieren kann, muss die Hydrathülle abgestreift werden, wofür Energie in Höhe der Hydratationsenthalpie benötigt wird. Nach dem Abstreifen der Hydrathülle sind die Wechselwirkungen des Ions mit der Pore entscheidend für dessen Leitfähigkeit durch den Kanal. Diese Wechselwirkungen nehmen in der Regel mit der Größe des Ionenradius ab. Nach der Eisenman-Theorie zeigen kleinere Ionen eine größere Wechselwirkung mit den Ladungen der Porenwand, da sie sich näher an diese heranbewegen können. Es wird beim Eintritt in die Pore viel Energie frei, die zur Ablösung

der Hydrathülle verwandt werden kann. Ein kleiner Ionenradius begünstigt somit die Leitfähigkeit durch die Pore. Größere Ionen werden hingegen weniger dicht mit den Ladungen der Porenwand interagieren können; es wird demnach weniger Energie frei beim Eintritt in die Pore. Zusammenfassend wird dementsprechend eine schmale Pore mit intensiver Wechselwirkung die kleinen Ionen begünstigen. Bei einer eher großlumigen Pore wird hingegen wenig Energie frei, wenn die Ionen in die Pore eintreten; es überwiegt der Beitrag der Hydratationsenthalpie und der Durchfluss der größeren Ionen mit kleinerer Hydratationsenthalpie wird begünstigt.

Tabelle 16

Ion	Atomradius (10^{-12}m)	Ionenradius (10^{-12}m)	Hydratationsenthalpie (kJ mol^{-1})
F	72	136	-510
Cl⁻	99	181	-376
Br⁻	114	195	-342
I⁻	133	216	-298

Die Sequenz des in dieser Studie untersuchten Anionenkanals war $\text{I}^- \approx \text{Br}^- \approx \text{Cl}^- > \text{F}^-$ und entspricht somit ungefähr einer Eisenmann 1 Sequenz. Das deutet auf eine große Pore mit schwacher Wechselwirkung hin. In Abbildung 64 sind die relativen Leitfähigkeiten der Halide aufgetragen. Wie bereits erwähnt, waren die Leitfähigkeiten für Fluorid, Bromid und Iodid reversibel DIDS-sensitiv. Auch die Leitfähigkeit für Nitrat (Stumpff *et al.*, 2009) ließ sich zwanglos in die Sequenz einordnen.

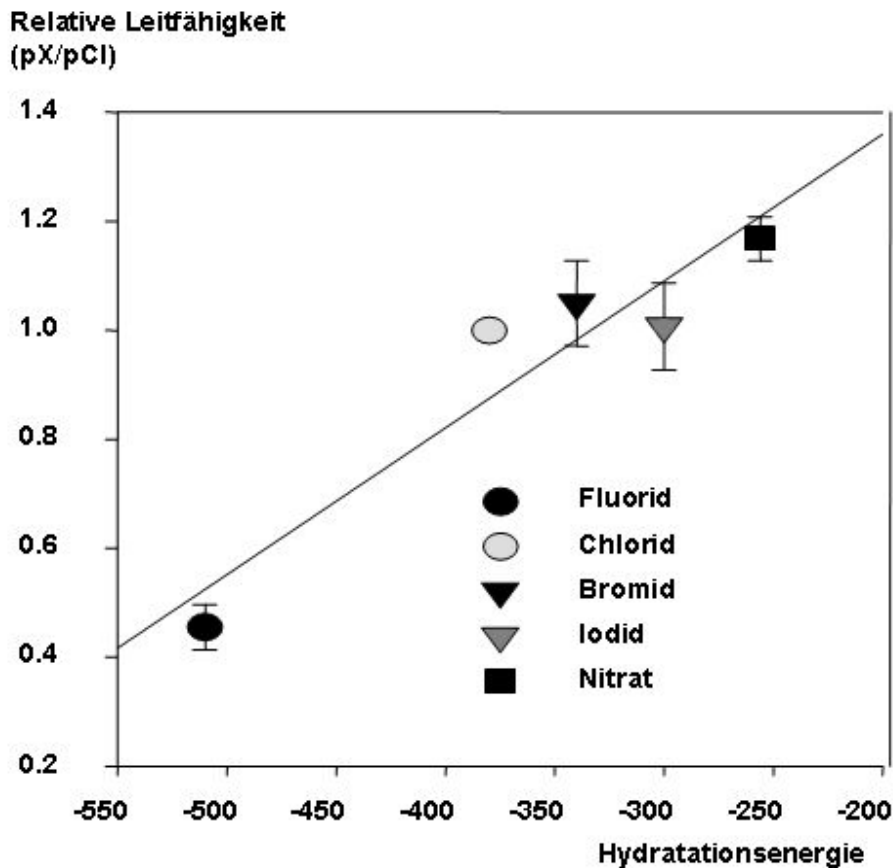


Abbildung 64

Relative Leitfähigkeitssequenz der Halide im Vergleich zu Chlorid (=1)

Es sei darauf hingewiesen, dass es sich bei der Eisenmann Theorie um eine aus den Kationenleitfähigkeiten verschiedener Glassorten abgeleitete Idealisierung handelt, und sie kann im Prinzip nur auf den Idealfall eines kugelförmigen Ions angewandt werden. In vorliegenden Beispiel des ruminalen Anionenkanals lässt sich auch die Leitfähigkeit des Nitrations aus der Hydratationsenthalpie herleiten; dieses mag daran liegen, dass das Nitratmolekül eine symmetrische Struktur besitzt und somit einer Kugelform mit symmetrischer Ladungsverteilung sehr nahe kommt.

Bei größeren Molekülen mit asymmetrischer Ladungsverteilung ist hingegen dieses Modell nicht anwendbar. Dementsprechend konnten die Leitfähigkeiten von asymmetrischen Molekülen wie Bikarbonat, Azetat, Propionat und Butyrat oder Laktat nicht in das obige Schema eingeordnet werden.

Vereinfacht visualisiert werden die Seitenarme (die z.B. Protonen als kleinste Ladungsträger besitzen) bei entsprechender sterischer Anordnung sehr starke Wechselwirkungen mit den Ladungen der Porenwand eingehen können; weitere Wechselwirkungen sind zu erwarten. Es

kann daher nicht verwundern, dass die Leitfähigkeit der Pore mit zunehmender Kettenlänge des Moleküls – und zunehmender Anzahl von Protonen - abnimmt. Im Bezug auf die Bedingungen im Vormagenepithel werden kurzkettige Fettsäureanionen durch den Anionenkanal geleitet. Die Leitfähigkeiten in der Reihe Azetat, Propionat und Butyrat verhalten sich umgekehrt proportional zur wachsenden Zahl der Kohlenstoffatome in den Fettsäuren.

5.6 Einzelkanalmessungen an isolierten Pansenepithelzellen

In den Patch-Clamp-Versuchen in der Inside-Out Konfiguration konnten die Einzelkanalereignisse dargestellt werden. Diese wurden anschließend in ein Strom-Spannungsdiagramm aufgetragen. Aus der Steigung der Regressionsgeraden im Strom-Spannungs-Diagramm konnte die Einzelkanalleitfähigkeit des Anionenkanals für Propionat berechnet werden und betrug ca. 100 pS in symmetrischer Lösung. In vorangegangenen Patch-Clamp-Studien an isolierten Pansenepithelzellen wurde für Chlorid eine Einzelkanalleitfähigkeit von ca. 350 pS ermittelt und für Azetat eine Einzelkanalleitfähigkeit von ca. 140 pS (Stumpff *et al.*, 2009).

Befand sich auf einer Seite der Membran eine chloridhaltige Lösung, auf der anderen Seite hingegen eine propionathaltige Lösung, resultierte eine gekrümmte Strom-Spannungskurve, die sich durch die Stromgleichung der Goldman-Hodgkin-Katz-Theorie in befriedigender Weise angleichen lässt (Hille, 2001). Hierbei wurden die aus symmetrischer Lösung ermittelte Permeabilität von 100 pS für Propionat und 350 pS für Chlorid verwandt. Es findet sich also kein Hinweis auf eine negative Interaktion zwischen Propionat und Chlorid in der Pore.

5.7 Ganzzellmessungen an isolierten Psalterepithelzellen

Neben den Untersuchungen an isolierten Pansenepithelzellen wurden - dank der in dieser Studie neu entwickelten Zellisoliationskammer - ebenfalls erstmalig Patch-Clamp-Versuche an isolierten Psalterepithelzellen durchgeführt. Die Psalterepithelzellen wurden wie zuvor mit Natriumgluconatlösung gefüllt.

5.7.1 Chloridleitfähigkeit

Die Leitfähigkeit für Chlorid an isolierten Psalterepithelzellen wurde durch eine signifikante Depolarisation des Umkehrpotentials beim Ersatz von Chlorid durch Gluconat in der Ganzzellkonfiguration überprüft ($n = 46$, $p < 0,001$). Bei Applikation des Anionenkanalblockers DIDS wurde auch bei den Psalterepithelzellen der Chlorideinstrom signifikant reversibel gehemmt ($n = 23$, $p < 0,001$).

5.7.2 Azetatileitfähigkeit

Die Leitfähigkeit für Azetat an Psalterepithelzellen konnte durch das negative Umkehrpotential nachgewiesen werden, das signifikant niedriger als das in Gluconatlösung gemessene war ($n = 33$, $p < 0,001$). Der Azetateinstrom war reversibel DIDS-sensitiv ($n = 25$, $p < 0,001$).

5.7.3 Weitere kurzkettige Fettsäureanionen

An den isolierten Psalterepithelzellen wurden ebenfalls Ganzzellmessungen mit Natriumpropionatlösung ($n = 6$) und Natriumbutyratlösung in der Perfusionslösung durchgeführt ($n = 6$). Ein Vergleich der Stromantworten der Zellen zeigte einen ähnlichen Verlauf wie bei den Pansenepithelzellen. Die gemessenen Auswärtsströme sanken mit zunehmender Molekülgröße des kurzkettigen Fettsäureanions. Der Vergleich der Leitfähigkeiten der verschiedenen Anionen zwischen Pansen- und Psalterepithelzellen ergab keinen signifikanten Unterschied.

5.8 Einzelkanalmessungen an isolierten Psalterepithelzellen

Zur Bestimmung der Einzelkanalleitfähigkeit für Propionat wurden Einzelkanalmessungen an isolierten Psalterepithelzellen in der Inside-out Konfiguration durchgeführt. Im Stromspannungsdiagramm war die durch die Software erstellte Regressionsgerade der Leitfähigkeit für Propionat der Psalterepithelzellen im Vergleich zur Regressionsgeraden für Propionat der Pansenepithelzellen bemerkenswert ähnlich (~ 100 pS). Daten aus asymmetrischen Ansätzen (Chlorid/Propionat) lassen auf eine Chloridleitfähigkeit schließen, die mit ~ 350 pS nicht von der des Anionenkanals des Pansenepithels zu unterscheiden ist.

5.9 Ionenkanäle

Die zentrale Aufgabe dieser Studie war die Untersuchung des basolateralen Anionenkanals an Pansen- und Psalterepithelzellen. Um diesen Anionenkanal in eine der vielen Ionenkanalfamilien einzuordnen, ist es wichtig, die Eigenschaften von Anionenkanälen im allgemeinen und bestimmter Anionenkanalfamilien zu erläutern. Im Folgenden werden die verschiedenen Eigenschaften der bisher charakterisierten Chloridkanäle dargestellt und diskutiert, ob sie als möglicher Transporter für das eigene Zellmodell (sh Kapitel Eigenes Zellmodell, Diskussion) in Frage kommen könnten, da eine molekularbiologische Charakterisierung des in dieser Studie untersuchten Anionenkanals bisher fehlt.

5.9.1 CIC Familie

Eine große Chloridkanalfamilie stellen die CIC-Proteine dar; sie kommen in fast allen Geweben vor, einige sind jedoch sehr gewebespezifisch (Jentsch *et al.*, 2002). Der CIC0 wurde erstmals aus dem elektrischen Organ des Zitterrochens isoliert (Jentsch *et al.*, 1990). Der CIC1 ist ein Muskel-spezifischer Chloridkanal (Steinmeyer *et al.*, 1991; Jentsch *et al.*, 2002). Mutationen an diesem Kanal sind verantwortlich für die Erkrankung Myotonia Congenita beim Menschen (Thomsen's disease) (Pusch *et al.*, 1995). CIC Ka und CIC Kb kommen fast ausschließlich in der Niere im aufsteigenden Teil der Henleschleife (TAL, thick ascending loop of Henle) vor (Adachi *et al.*, 1994; Kieferle *et al.*, 1994; Vandewalle *et al.*, 1997; Yoshikawa *et al.*, 1999; Jentsch *et al.*, 2002). Unter anderem wegen der niedrigen Leitfähigkeit (1 pS) des CIC1 (Pusch *et al.*, 1994) kann es sich beim großen Anionenkanal des Pansenepithels kaum um einen Vertreter dieser Gruppe handeln.

CIC2-Kanäle werden in vielen Zelltypen exprimiert und durch Hyperpolarisation aktiviert (Jentsch *et al.*, 2002). Arachidonsäure ist ein Enhancer der Chloridkanäle der CIC2-Gruppe (Cuppoletti *et al.*, 2000; Cuppoletti *et al.*). In dieser Studie wurde an drei Zellen der Effekt von Arachidonsäure untersucht. Eine Erhöhung der Stromantwort blieb aus. Der Chlorideinstrom wurde irreversibel gehemmt. Wieder passt die Leitfähigkeit des CIC2-Kanals (< 10 pS) nicht zu dem Anionenkanal des Pansenepithels.

Die Chloridkanäle CIC3, -4, -5, -6 und -7 sind bisher weniger gut untersucht (Jentsch 2005). Ihre Lokalisation ist zum einen an intrazellulären Organellen als auch in der Plasmamembran möglich (Dowland *et al.*, 2000; Jentsch *et al.*, 2002; Nilius und Droogmans, 2003; Jentsch *et al.*, 2005b). Der CIC4 wurde lumenwärts im Darm der Ratte nachgewiesen (Mohammad-Panah *et al.*, 2002). Kleinere Mengen von CIC4 befanden sich in subapikalen Endosomen. Beim CIC 4 ist noch unklar, ob er wirklich einen Chloridkanal darstellt, oder ob er als endosomaler Cl⁻/H⁺-Austauscher fungiert (Jentsch *et al.*, 2005a; Picollo und Pusch, 2005). Beim CIC 6 und -7 ist bisher nichts über deren biophysikalische Eigenschaften bekannt.

Kein Kanal der CIC-Familie hat eine Leitfähigkeit > 50 pS (Kew, 2006; Duran *et al.*, 2010). Für den Anionenkanal im Pansen- und Psalterepithel scheinen daher eher Proteine anderer Familien in Frage zu kommen. Da eine molekularbiologische Charakterisierung des Kanals bisher nicht möglich ist, kann eine Zuordnung zu einer bestimmten Kanalgruppe nur aufgrund vom Vergleich der bisher bekannten Eigenschaften stattfinden.

5.9.2 CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator)

Im Intestinaltrakt des Menschen ist der CFTR ein sehr wichtiges Transportprotein für Chlorid (Galiotta und Moran, 2004). Da Mutationen des CFTR-Gens beim Menschen zur Erkrankung der cystischen Fibrose führen, ist er einer der am meisten untersuchten Chloridkanäle (Dawson *et al.*, 1999; Gadsby und Nairn, 1999; Sheppard und Welsh, 1999). Erstmals wurde das CFTR-Gen 1989 von Rommens, Riordan und Kerem isoliert (Kerem *et al.*, 1989; Riordan *et al.*, 1989; Rommens *et al.*, 1989).

Der CFTR ist ein durch cAMP aktivierbarer Chloridkanal, der in einer Reihe von Epithelien exprimiert wird wie z. B. dem Pankreas-, dem Lungen- und dem Korneaepithel. Der CFTR wurde bereits im gesamten Darm-Trakt der Monogastrier nachgewiesen (Crawford *et al.*, 1991; Hayden und Carey, 1996; Ameen, N. *et al.*, 2000a; Ameen, N. A. *et al.*, ; Sun *et al.*, 2001; Spiegel *et al.*, 2003). Innerhalb des Epithels wird zumeist eine apikale Lokalisation (Denning *et al.*, 1992; Ameen, N. A. *et al.*, 1999; Ameen, N. *et al.*) im Colon aber auch eine basolaterale Lokalisation beschrieben (Doucet *et al.*, 2003). Auch eine Lokalisation in subapikalen Vesikeln wurde gezeigt (Dalemans *et al.*, 1992; Webster *et al.*, 1994; Ameen, N. A. *et al.*, 1999; Ameen, N. A. *et al.*, 2000b).

Der CFTR fungiert nicht nur als Chloridkanal in sezernierenden Epithelien, sondern er hat auch Anteil an der Regulation verschiedener anderer Ionenkanäle und Transporter (Schwiebert *et al.*, 1999; Kunzelmann, 2001). So wurde ein aktivierender Einfluss auf auswärtsgerichtete Chloridkanäle (ORCC) (Egan *et al.*, 1992; Gabriel *et al.*, 1993; Schwiebert *et al.*, 1999) und ein hemmender Effekt auf epitheliale Na⁺-Kanäle (ENaC) nachgewiesen (Stutts *et al.*, 1995; Ismailov *et al.*, 1996; Schwiebert *et al.*, 1999; Kunzelmann, 2001). Aufgrund der vielfältigen Interaktionen des CFTR mit anderen Transportproteinen wird eine Makromolekülkomplex-Bildung vermutet (Li und Naren, 2005).

Es ist bekannt, dass der CFTR neben Chlorid auch eine Permeabilität für zahlreiche andere Anionen besitzt (Illek *et al.*, 1999; Hug *et al.*, 2003; Spiegel *et al.*, 2003; Fatehi und Linsdell, 2008). In Eierstockzellen von chinesischen Hamstern konnte gezeigt werden, dass der CFTR ebenfalls eine Leitfähigkeit für Azetat und Propionat hatte (Fatehi und Linsdell, 2008). Die Leitfähigkeit für Azetat beträgt ca. 10 % der Chloridleitfähigkeit (Fatehi und Linsdell, 2008). Hingegen besitzt der Anionenkanal von Pansen und Psalter eine weit höhere Leitfähigkeit für Azetat, die im Vergleich zu Chlorid ca. 60 % beträgt.

Die Leitfähigkeitssequenz des CFTR ist P(Br-)>P(Cl-)>P(I-)>P(F-) (Nilius und Droogmans, 2003). Bezüglich der Hemmstoffsensitivität erweist sich der CFTR nur bei intrazellulärer Zugabe als DIDS-sensitiv (Linsdell und Hanrahan, 1996; Jentsch *et al.*, 2002). Eine bessere

Sensitivität besteht für die nichtsteroidalen Antiphlogistika Nifluminsäure und Flufenaminsäure sowie für NPPB und Glibenclamid (McCarty *et al.*, 1993; Jentsch *et al.*, 2002; Scott-Ward *et al.*, 2004). Hingegen waren in der vorliegenden Studie zum Anionenkanal des Pansens weder auf die Stromantwort der Zellen noch auf das Umkehrpotential bei Zugabe von Glibenclamid signifikante Effekte zu beobachten. Die Einzelkanalleitfähigkeit des CFTR liegt zwischen 6 und 10 pS, und ist somit sehr viel kleiner als die von uns beobachtete Leitfähigkeit im Pansenepithel. Diese Daten sprechen nicht dafür, dass es sich bei dem am Pansenepithel untersuchten Anionenkanal um den CFTR handelt.

Diese Schlussfolgerung ergibt sich auch aus anderen Überlegungen. Als für den CFTR hochspezifisch muss gelten, dass er durch Erhöhung der zytosolischen cAMP Konzentration geöffnet wird. In vorherigen Patch-Clamp-Studien an isolierten Pansenepithelzellen hatte cAMP jedoch keine Wirkung auf die Chloridleitfähigkeit (Brinkmann, 2006). Ähnliches ergaben frühere Ussingkammerstudien, die am Pansenepithel durch eine Erhöhung der cAMP-Konzentration keine Effekte auf die Chloridleitfähigkeit ergaben (Wolffram *et al.*, 1989). In der Ussingkammerstudie von Gäbel (Gäbel *et al.*) wurde durch Zugabe von cAMP die Chloridleitfähigkeit sogar herabgesetzt. Dies wurde in sicherlich zutreffender Weise im Zusammenhang mit der nachgewiesenen hemmenden Wirkung von cAMP auf die Natriumaufnahme durch den NHE beschrieben. Die Leitfähigkeit für SCFA wurde durch cAMP nicht beeinflusst. Trotz molekularbiologischem Nachweis (Bilk, 2008) gibt es also insgesamt wenig Hinweise auf eine funktionelle Expression des CFTR im Sinne einer klassischen Chloridleitfähigkeit. An einem resorbierenden Epithel wie dem Pansen wäre eine solche auch als eher ungewöhnlich einzustufen; eine regulatorische Funktion kann und sollte jedoch nicht ausgeschlossen werden.

5.9.3 Maxi-Anionen Kanäle

Der in dieser und vorangegangenen Studien untersuchte ruminale Anionenkanal zeigt eine große Leitfähigkeit für Chlorid (~ 350 pS), Azetat (~ 140 pS) und Propionat (~ 100 pS) (Stumpff *et al.*, 2009; Georgi *et al.*, 2010a; Georgi *et al.*, ; Georgi *et al.*, ; Stumpff *et al.*). Die Eigenschaften des Kanals wie dessen große Leitfähigkeit sowie die glockenförmige, spannungsabhängige Offenwahrscheinlichkeit unterscheiden ihn deutlich von den bekannten molekularbiologisch gut charakterisierten Chloridkanälen der Zellmembran. Der in dieser Studie untersuchte Anionenkanal ähnelt hingegen sowohl bezüglich seiner Leitfähigkeit, als auch bezüglich seiner Spannungsabhängigkeit den funktionell sehr gut charakterisierten Maxi-Anionenkanälen (Nilius und Droogmans, 2003; Sabirov *et al.*, 2006), die jedoch bisher molekularbiologisch noch nicht charakterisiert werden konnten.

Maxi-Anionenkanäle mit einer großen Chloridleitfähigkeit (von ~ 250 – 430 pS) wurden in verschiedensten Gewebetypen nachgewiesen (Schwiebert *et al.*, 1994; Mitchell und Jacob, 1996; Valverde *et al.*, 2002). Sie besitzen die größten bisher bekannten Einzelkanal-leitfähigkeiten und sind phylogenetisch vermutlich sehr alt (Nilius und Droogmans, 2003; Sabirov *et al.*, 2006).

Die Selektivität für Anionen gegenüber Kationen ist sehr hoch. Hingegen sind Maxi-Anionenkanäle für anorganische Ionen wie die Halide Cl⁻, Br⁻ und I⁻ wenig selektiv (Qu und Hartzell, 2004), während F⁻ deutlich schlechter geleitet wird. Dieses entspricht einer Eisenmann 1 Sequenz. Eine solche Sequenz wurde auch für den ruminalen Anionenkanal bestätigt. Es ist ebenfalls gut dokumentiert, dass Anionenkanäle in der Lage sind, auch sehr große Anionen zu transportieren (Sabirov *et al.*, 2006). Große negativ geladene Aminosäuren wie Taurin und Glutamat oder ATP werden über solche Maxi-Anionenkanäle transportiert (Diener und Scharrer, 1995; Manolopoulos *et al.*, 1997; Dutta *et al.*, 2004); eine Rolle in der Signaltransduktion wird postuliert. Allgemeiner wird eine Rolle dieser Kanäle in der Volumenregulation vermutet. In diesem Zusammenhang muss es als fast erstaunlich betrachtet werden, dass eine Beteiligung dieser Kanäle am kurzkettigen Fettsäuretransport am Magen-Darmtrakt bisher noch nicht untersucht wurde. Lediglich an hypodermalen Zellen des Nematoden *Ascaris suum* wurde die Leitfähigkeit von Maxi-Anionenkanälen für Azetat und Butyrat untersucht (Blair *et al.*, 2003); eine Rolle in der Ausscheidung von Fettsäuren aus dem Nematoden wird postuliert.

Abschließend kann gesagt werden, dass der ruminale und omasale Anionenkanal höchstwahrscheinlich zur Gruppe der Maxi-Anionenkanäle gehört (Sabirov *et al.*, 2006), deren molekularbiologische Struktur bisher jedoch noch nicht aufgeklärt werden konnte.

5.10 Diskussion verschiedener Zellmodelle zum Transport kurzkettiger Fettsäuren am Vormagenepithel

5.10.1 Klassischer Transport der undissoziierten protonierten kurzkettigen Fettsäuren (HSCFA) allein über Lipiddiffusion

In diesem seit Jahrzehnten dominierenden Modell wird angenommen, dass die HSCFA durch Lipiddiffusion in die Pansenepithelzelle aufgenommen und basolateral ausgeschleust werden. Es müsste sich nach diesem Modell ein Gleichgewichtszustand einstellen (Influx = Efflux). Bei Annahme einer gleichen Permeabilität der apikalen und basolateralen Membran für Fettsäuren und einem mukosalen pH-Wert von 7 wird dieser Gleichgewichtszustand erreicht, wenn die intrazelluläre Konzentration kurzkettiger Fettsäuren der Hälfte der mukosalen Konzentration entspricht.

Aufgrund ihres pK-Wertes (~4,8), dissoziieren bei einem neutralen zytosolischen pH-Wert, der bei ca. 7,2 liegt (Müller *et al.*, 2000; Gäbel *et al.*, 2002) ca. 99,5 % der aufgenommenen HSCFA sofort in ein kurzkettiges Fettsäureanion und ein Proton. Da die kurzkettigen Fettsäureanionen negativ geladene Moleküle sind, können sie die basolaterale Zellmembran nun nicht mehr durch einfache Lipiddiffusion verlassen. Sie akkumulieren im Zellinneren ebenso wie die Protonen.

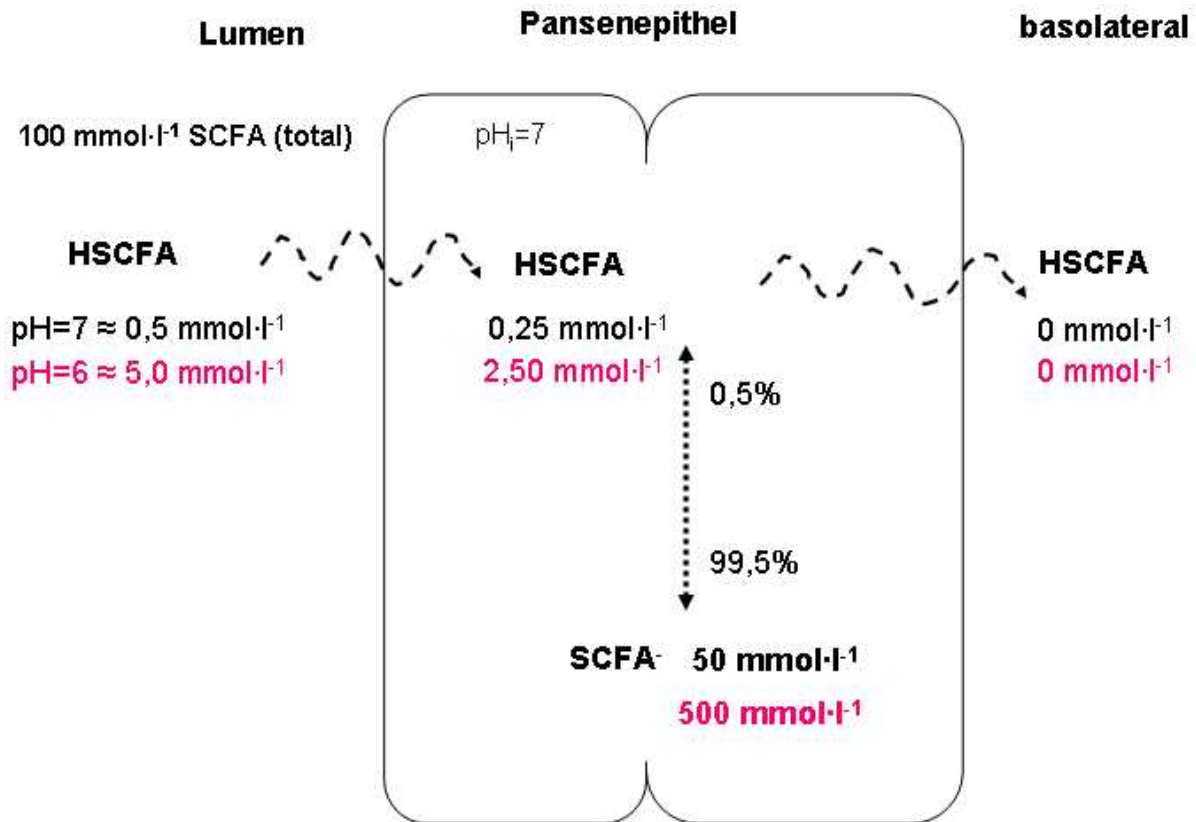


Abbildung 65

Transport der HSCFA allein über Lipiddiffusion

Nach dem Steady-State-Prinzip stellt sich die intrazelluläre SCFA-Konzentration bei der Hälfte des mukosalen pH-Wertes ein. Wenn der mukosale pH-Wert 7 beträgt und im Pansenlumen eine kurzkettige Fettsäurenkonzentration von 100 mmol·l⁻¹ vorliegt, dann befinden sich 0,5 mmol·l⁻¹ HSCFA im Pansenlumen und dementsprechend 0,25mmol·l⁻¹ HSCFA im Zytosol der Pansenepithelzelle. Da das Zytosol einen relativ konstanten pH-Wert von 7 aufweist, dissoziieren über 99,5 % der HSCFA in ein Proton und ein SCFA⁻. Da die SCFA⁻ das Zytosol aufgrund ihrer negativen Ladung nicht durch Lipiddiffusion verlassen können, akkumulieren sie im Zellinneren auf eine Konzentration von 50 mmol·l⁻¹.

Im Fall einer Azidose sinkt der pH-Wert im Pansenlumen. Bei einem mukosalen pH-Wert von 6 verschiebt sich das Gleichgewicht; der Influx der HSCFA ist nun ca. 10 mal höher. Die kurzkettigen Fettsäuren akkumulieren wieder im Zellinneren. Wird der zytosolische pH durch pH regulatorische Mechanismen bei 7.0 gehalten, steigt die Konzentration undissoziierter HSCFA Fettsäuren im Zytosol auf 2,5 mmol·l⁻¹. Nach der Henderson-Hasselbalch Gleichung muss dann die Konzentration der Fettsäureanionen auf theoretisch 500 mmol·l⁻¹ ansteigen (Stumpff *et al.*, 2009). Dieses würde zu einem sofortigen Zusammenbruch der Zellhomeostase und des Epithels führen (Schmidt *et al.*, 2004).

Mit jeder aufgenommenen SCFA wird ebenfalls ein Proton aufgenommen. Das Proton wird apikal über den NHE entsorgt (Martens und Gabel, 1988; Gäbel *et al.*, 2002); Fettsäureanionen akkumulieren also intrazellulär, da für den Efflux kein Proton vorhanden ist. Erst bei sehr hohen Fettsäurekonzentrationen wird nach der Henderson-Hasselbalch Gleichung ein genügend hoher Prozentsatz von Fettsäureanionen in protonierter Form vorliegen, so dass der Efflux wieder dem Influx entspricht. Da es in diesem Fall zu starken Veränderungen der Osmolarität kommt, kann dieses Zellmodell nicht funktionieren. Auch die Existenz der an der basolateralen Zellmembran lokalisierten Mechanismen zur pH-Wert Regulation, wie z. B. der NHE1 oder der $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ - Cotransporter (Müller *et al.*, 2000), wären überflüssig und nicht mehr zu erklären, da durch diese Mechanismen die basolaterale Bereitstellung von Protonen für den Efflux der Fettsäureanionen noch geringer wird, als ohnehin der Fall ist.

5.10.2 Transport der kurzkettigen Fettsäureanionen über einen $\text{SCFA}^- / \text{HCO}_3^-$ Austauscher

Ein weiteres Modell für die Aufnahme der kurzkettigen Fettsäuren in die Pansenepithelzelle ist die Aufnahme der SCFA^- Anionen über einen in der apikalen Zellmembran lokalisierten $\text{SCFA}^-/\text{HCO}_3^-$ Austauscher (Anionexchanger AE2) (sh. Abbildung 66), wobei dieser Mechanismus insbesondere bei hohen ruminalen pH-Werten bedeutsam sein dürfte (Aschenbach *et al.*, 2009). Bilk konnte 2005 zeigen, dass isolierte Pansenepithelzellen mRNA für die Anionentransporter PAT (putative anion transporter), DRA (down regulated in adenoma) und AE2 (anion exchanger) exprimieren (Bilk *et al.*, 2005). Alle diese Transporter tragen zum Chloridtransport durch das Pansenepithel hindurch bei. Für diese Transporter ist allgemein bekannt, dass die Chloridresorption an eine Bikarbonatsekretion gekoppelt stattfindet (Mount und Romero, 2004; Romero *et al.*, 2004).

Gleich Anionenkanälen gelten auch die Anionenaustauscher insgesamt als wenig selektiv (Wright und Diamond, 1977). So kann sowohl die intrazelluläre als auch die extrazelluläre Bindungsstelle des Anionenaustauschers sowohl Chlorid als auch HCO_3^- Anionen binden, so dass die Transportrichtung von Anionenaustauschern im Allgemeinen umkehrbar ist. Ein Transport von Fettsäureanionen wird seit vielen Jahren diskutiert und gilt sowohl am Darm (Mascolo *et al.*, 1991; Vidyasagar *et al.*, 2005; Binder, 2010) als auch mittlerweile am Pansen (Kramer *et al.*, 1996; Aschenbach *et al.*, 2009) als etabliert. Eine Expression von Anionenaustauschern ist auch an der basolateralen Zellmembran wahrscheinlich; so könnten die SCFA^- im Austausch gegen HCO_3^- aus der Zelle ausgeschleust werden. Damit dieses Modell des basolateralen kurzkettigen Fettsäuretransports über den $\text{SCFA}^-/\text{HCO}_3^-$ Austauscher funktionieren kann, muss ein Konzentrationsgefälle für HCO_3^- von basolateral

zum Zytosol vorliegen. Die basolaterale Aufnahme von Bikarbonat hängt daher vom intrazellulären pH-Wert ab. Der Efflux der SCFA^- wird bei einer hohen intrazellulären Bikarbonatkonzentration gehemmt. Dieses Modell ist daher vor allem bei angesäuertem Epithel gut vorstellbar. Da mit HCO_3^- eine Base von basolateral nach apikal transportiert wird, entspricht das Modell quantitativ einem Nettotransfer von Protonen und Fettsäuren aus dem Pansenlumen ins Blut.

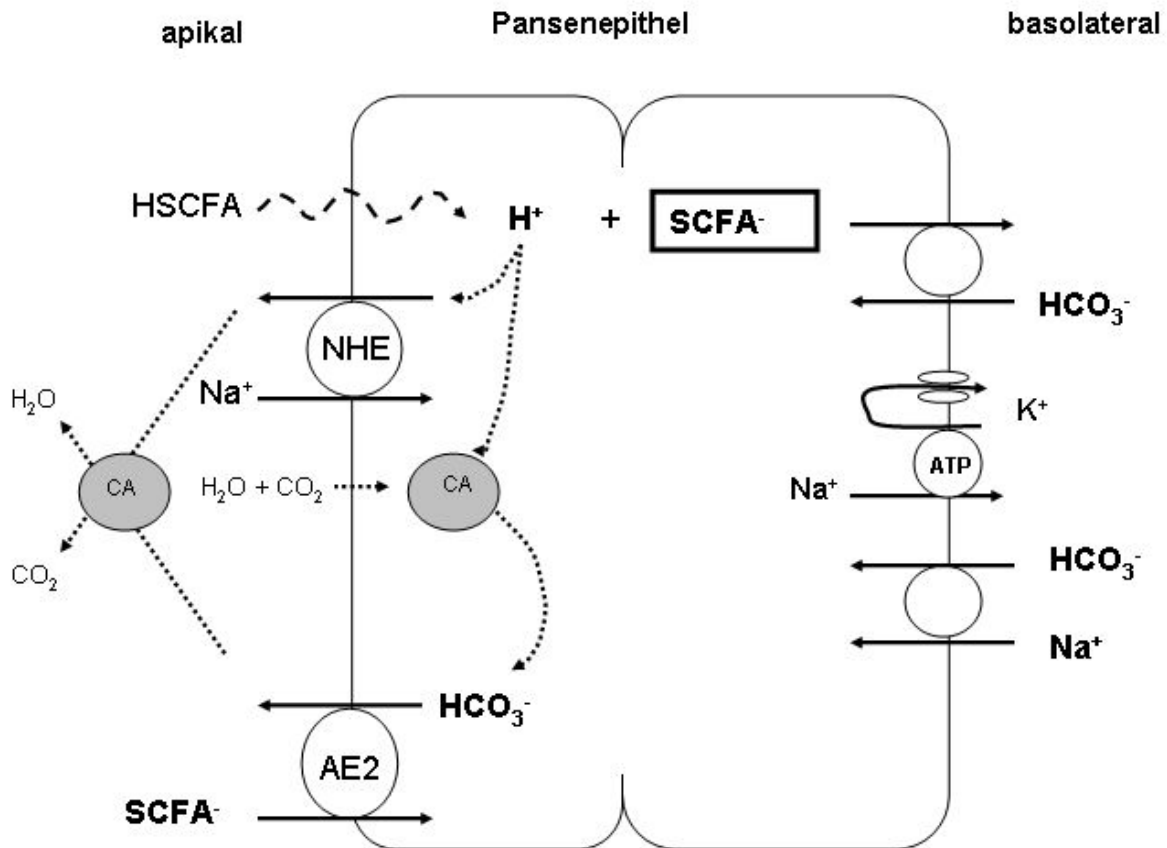


Abbildung 66

Transport der SCFA^- über einen $\text{SCFA}^-/\text{HCO}_3^-$ Austauscher
 CA: (Carboanhydrase), NHE: (Na^+/H^+ -Exchanger), AE2: (Anionexchanger 2)

5.10.3 MCT 1

Ein weiteres Protein, das die Ausschleusung der kurzkettigen Fettsäureanionen ermöglichen könnte, ist der basolateral lokalisierte MCT1. Dieser wurde bereits im Literaturteil detailliert dargestellt. Auch hier werden die SCFA^- zusammen mit einem Proton ausgeschleust (siehe Abbildung 67). Funktionelle und immunhistochemische Studien sprechen für die Expression des im Pansenepithel basolateral lokalisierten MCT1. Einschränkend muss allerdings festgestellt werden, dass der funktionelle Nachweis des MCT1 bisher über die blockierende Wirkung von pCMBs erfolgt ist. Dieser Blocker muss als wenig spezifisch bezeichnet werden;

auch der Maxi-Anionenkanal wird hierdurch gehemmt und entsprechende Daten sind übertragbar (Stumpff *et al.*, 2009) und Ergebnisteil dieser Studie).

Da der MCT1 in der Lage ist, Ketonkörper und Protonen auszuschleusen (Müller *et al.*, 2002; Graham *et al.*, 2007) könnte er ebenfalls an der basolateralen Ausschleusung kurzkettiger Fettsäureanionen beteiligt sein (Kirat und Kato, 2006). Der MCT bindet enzymatisch Protonen, die dann bei neutralem pH-Wert im Cotransport mit einem Anion ausgeschleust werden. Vor allem die Ausschleusung größerer Fettsäureanionen durch den MCT1 wird diskutiert (Müller *et al.*, 2002).

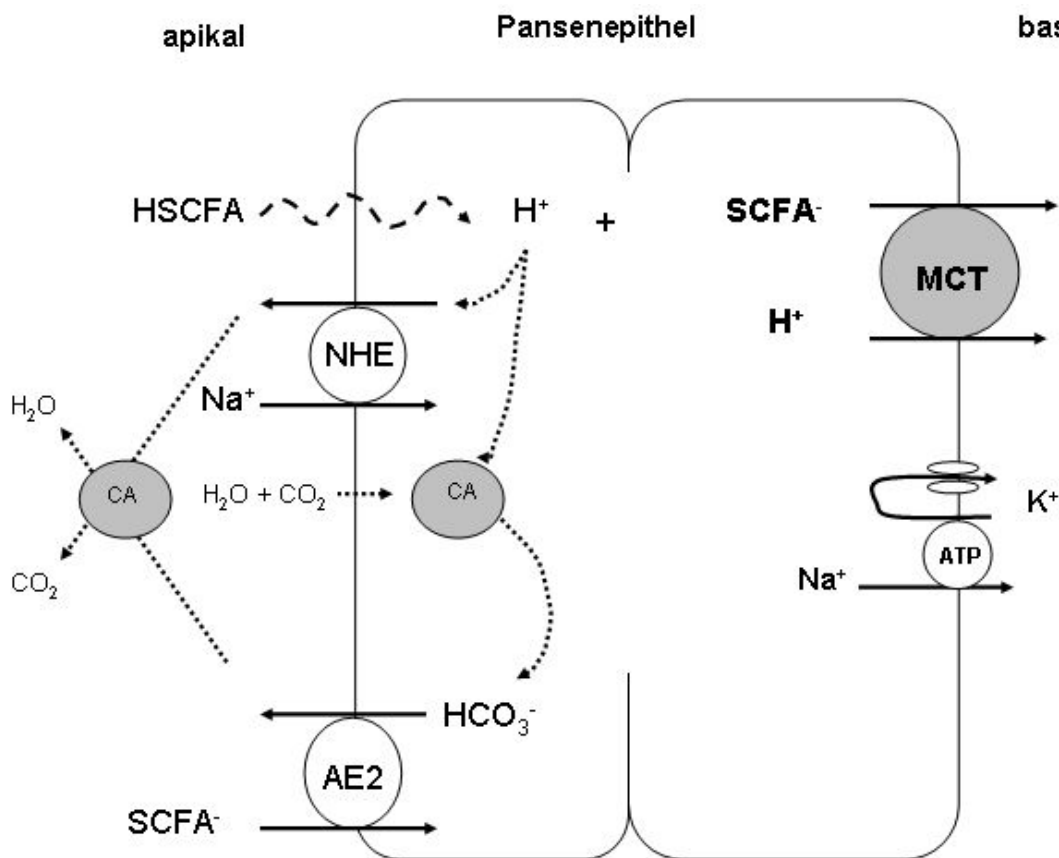


Abbildung 67

Basolaterale Ausschleusung der kurzkettigen Fettsäureanionen gemeinsam mit einem Proton über den MCT1. CA: (Carboanhydrase), NHE: (Na⁺/H⁺-Exchanger), AE2: (Anionexchanger 2).

Beide Transportmodelle für die basolaterale Ausschleusung der kurzkettigen Fettsäureanionen – über den SCFA⁻/HCO₃⁻-Austauscher oder den MCT1 – hängen mit einem Netto-Protonenefflux über das Pansenepithel zusammen. Bei einem neutralem zytosolischen pH-Wert ist eine Akkumulation der SCFA⁻ im Zytosol als Triebkraft für den basolateralen Efflux nötig.

5.11 Bedeutung des Anionenkanals für den Pansen / den Wiederkäuer

Bei den drei dargestellten Transportmechanismen für kurzkettigen Fettsäuren werden die SCFA⁻ zusammen mit einem Proton durch das Epithel hindurch transportiert. Die durch Fermentation produzierten Protonen im Pansen werden jedoch durch das mit dem Speichel in den Pansen gelangende Phosphat und Bikarbonat abgepuffert, wobei mindestens 40 % der anfallenden Säure neutralisiert wird (Allen, 1997; Aschenbach *et al.*, 2009; Aschenbach *et al.*). Weiterhin gelangen große Mengen an Harnstoff aus dem Blut, in den Pansen (ca. 10 mol·d⁻¹); dort werden pro Mol Harnstoff 2 Mol NH₃ gebildet. Ammoniak wird im leicht sauren Milieu des Pansens fast vollständig zu Ammonium (NH₄⁺) protoniert; insgesamt werden über die Harnstoffsekretion beim Rind fast 20 mol·d⁻¹ an Protonen gepuffert (Abdoun *et al.*, 2010; Aschenbach *et al.*, 2010 (submitted)). Schließlich wird bei der Fermentation von organischen Substraten, die an starke Kationen wie K⁺ oder Na⁺ gebunden sind, kein Proton frei. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass in der Regel ein überwiegender Teil der produzierten Protonen lokal abgepuffert werden; stattdessen sind Na⁺, K⁺ und NH₄⁺ die wichtigsten Kationen im Pansenlumen.

Würden alle SCFA⁻ gemeinsam mit einem Proton über das Pansenepithel zur Blutseite transportiert, müsste es im Pansenlumen also zu einer Alkalose kommen und für die Resorption der starken Kationen Na⁺ und K⁺ fehlte ein Anion. Dies stimmt aber nicht mit den Beobachtungen der Klinik überein. Somit müssen weitere Mechanismen an dem Transport der kurzkettigen Fettsäureanionen beteiligt sein.

Als noch gravierender muss die Situation am Psalter betrachtet werden. Da die Fermentationsprozesse hier überwiegend abgeschlossen sind, gelangen mit den bereits gepufferten Ingesta nur geringste Mengen an Protonen in den Psalter. Stattdessen werden sowohl im Pansen als auch im Psalter zusammen mit SCFA große Mengen an Natrium resorbiert (Edrison *et al.*, 1986; Gäbel *et al.*, 1991a; Sehested *et al.*, 1999a; Ali *et al.*, 2006).

5.12 Zusammenfassung und Zellmodell

Neben der klassischen Lipiddiffusion, unter der man die passive Diffusion der protonierten, undissoziierten Form der kurzkettigen Fettsäuren durch die zelluläre Lipidmembran versteht, gibt es am Pansen auch den proteinvermittelten Transport über den apikal lokalisierten SCFA/HCO₃⁻-Austauscher. Beide Aufnahmemechanismen finden elektroneutral statt und führen zur parallelen Aufnahme eines Protons und eines Fettsäureanions in die

Panseneithelzelle. Die Protonen werden apikal über den NHE im Austausch mit Na^+ wieder in das Pansenlumen ausgeschleust, wodurch es zur Stimulation des Natriumtransportes über das Epithel kommt (Gäbel *et al.*, 1991a; Sehested *et al.*, 1999a; Abdoun *et al.*, 2005; Ali *et al.*, 2006) (sh. Abbildung 68).

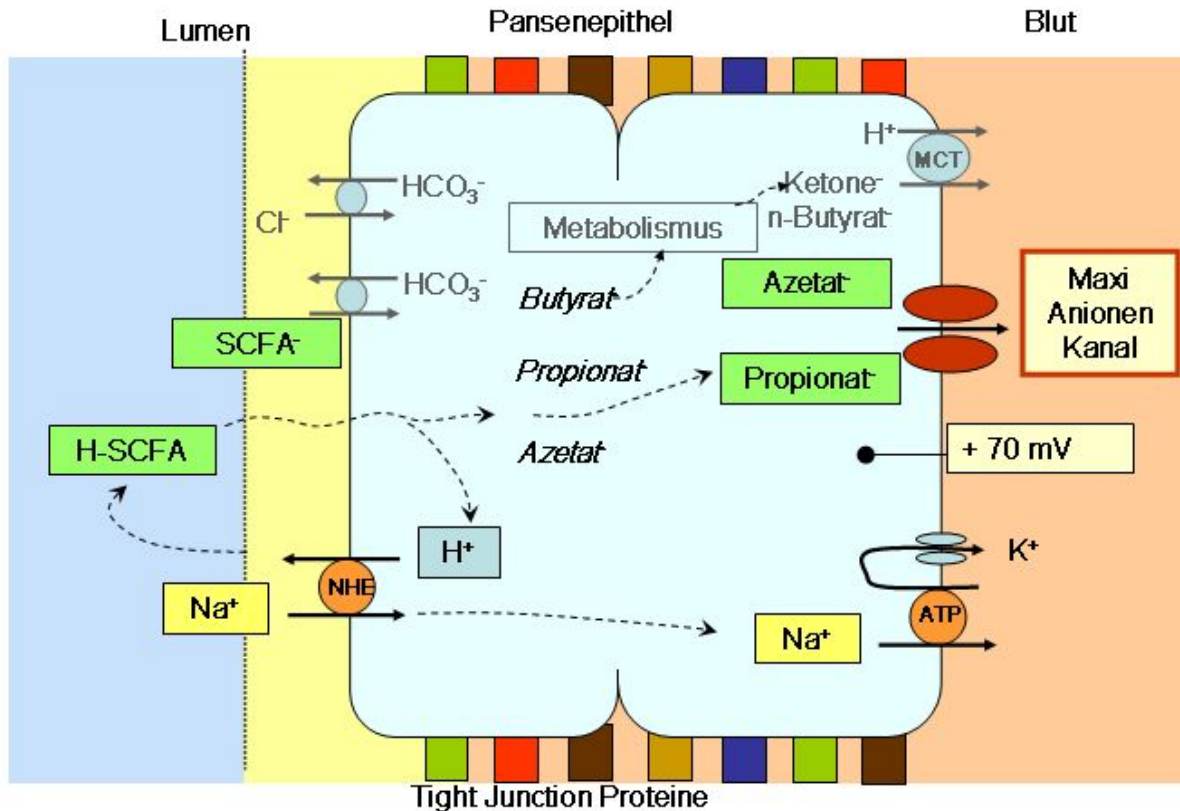


Abbildung 68

Zellmodell mit dem basolateralen Maxi-Anionenkanal.

Apikal werden kurzkettige Fettsäuren in der protonierten Form über Lipiddiffusion in die Zelle aufgenommen. Zusätzlich gibt es für die apikale Aufnahme der kurzkettigen Fettsäureanionen den proteinvermittelten Transport über den SCFA/HCO₃⁻-Austauscher. Im Zellinneren dissoziieren über 95 % der HSCFA in Protonen und SCFA⁻. Die Protonen werden apikal über den NHE gegen Na^+ wieder aus dem Zytosol entfernt. Längerkettige Fettsäureanionen wie Butyrat werden intrazellulär metabolisiert. Deren Abbauprodukte wie Ketonkörper werden basolateral über den MCT1 ausgeschleust. Fettsäureanionen wie Azetat und Propionat werden kaum intrazellulär metabolisiert, sie verlassen das Zytosol hauptsächlich über basolaterale Anionenkanäle. Das über den NHE aufgenommene Natrium wird basolateral über die Na⁺/K⁺-ATPase ausgeschleust. Ein dichtes Netzwerk aus Tight Junction Proteinen im Epithel des Pansens aber auch des Psalters verhindert den parazellulären Transport größerer Moleküle.

Intrazellulär werden große kurzkettige Fettsäureanionen wie z. B. Butyrat zu Ketonkörpern metabolisiert, welche basolateral über den MCT1 ausgeschleust werden können (Müller *et al.*, 2002; Kirat und Kato, 2006). Kurzkettige Fettsäureanionen kürzerer Kettenlänge werden hingegen kaum metabolisiert (Masson und Phillipson, 1951; Kristensen und Harmon, 2004)

und verlassen das Epithel zusammen mit dem apikal aufgenommen Natrium (Gäbel *et al.*, 1991a; Sehested *et al.*, 1996; Sehested *et al.*, ; Ali *et al.*, 2006). Durch Aufrechterhaltung des negativen Membranpotentials durch die Na^+/K^+ -ATPase, ermöglichen basolateral lokalisierte Anionenkanäle den Efflux der kurzkettigen Fettsäureanionen (Sehested *et al.*, 1996; Abdoun *et al.*, 2005; Leonhard-Marek *et al.*, 2006; Stumpff *et al.*, 2009).

Zusammenfassend lässt sich aus diesem Modell folgern, dass beim Wiederkäuer die Pufferung der mit den kurzkettigen Fettsäuren entstehenden Protonen überwiegend durch den Speichel im Pansenlumen selbst erfolgen muss. Kurzkettige Fettsäureanionen wie Azetat und Propionat werden durch das Epithel hindurch transportiert und basolateral über einen Kanal ins Blut ausgeschleust, während das größere Butyratanion überwiegend intrazellulär verstoffwechselt wird.

6 Zusammenfassung

Charakterisierung eines nicht selektiven Anionenkanals an kultivierten Pansen- und Psalterepithelzellen des Schafes

Der Pansen der Wiederkäuer ist der wichtigste Produktionsort für kurzkettige Fettsäuren (short chain fatty acids, SCFA). Um ein optimales Milieu für die Mikroorganismen im Pansen zu gewährleisten, steht die Produktion der kurzkettigen Fettsäuren in engem Zusammenhang mit deren Resorption aus dem Pansenumen durch das Pansenepithel (Bergman, 1990; Gäbel *et al.*, 2002). Bei nicht ausreichender Pufferung des Panseninhaltes durch den Speichel verbunden mit unzureichender Adaptation des Pansenepithels kommt es zu einer Entgleisung der Homöostase des Panseninhaltes mit Azidose und ansteigender Osmolarität (Kleen *et al.*, 2003; Krause und Oetzel, 2005). Das Pansenepithel wird geschädigt und Mikroorganismen und Toxine können in den Blutkreislauf gelangen und führen zu gesundheitlichen Schäden, die bis hin zum Tode des Tieres führen können. Die Leistungseinbußen führen zu großen wirtschaftlichen Verlusten.

Der aktuelle Wissenstand über die genauen Transportmechanismen für kurzkettige Fettsäuren am Vormagenepithel der Wiederkäuer ist unvollständig. Da die protonierte Form der kurzkettigen Fettsäuren (HSCFA) lipophil ist, kann diese Form über Diffusion die Zellmembran passieren. Daneben exprimiert das Pansenepithel einen apikalen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher, dessen physiologische Funktion angesichts der niedrigen Chloridkonzentrationen im Pansenumen lange Zeit unklar war. Aktuelle Studien zeigen, dass über diese Anionenaustauscher auch kurzkettige Fettsäureanionen (SCFA^-) im Austausch gegen HCO_3^- in die Zelle aufgenommen werden können. Beide Transportmechanismen führen zu einer Ansäuerung des Zytosols mit Stimulation des apikal lokalisierten NHE (Na^+/H^+ -Austauschers), der Natrium in die Zelle hinein- und Protonen aus der Zelle hinausschleust. Hierdurch wird der intrazelluläre pH-Wert neutral gehalten und Natrium aus dem Pansenumen resorbiert, welches sowohl für die Reduktion der Osmolarität des Panseninhaltes als auch für die Speichelresekretion bedeutsam ist. Während Butyrat größtenteils intrazellulär verstoffwechselt wird, gelangen insbesondere Azetat und Propionat in großen Mengen über die basolaterale Membran ins Portalblut und dienen so der Versorgung des gesamten Tieres mit Energie.

Der basolaterale Ausschleusungsmechanismus für die kurzkettigen Fettsäureanionen ist jedoch bisher unklar. Aktuelle Daten sprechen dafür, dass in Analogie zum apikalen Anionenaustauscher auch die basolaterale Leitfähigkeit für Chlorid wenig selektiv ist und

auch Azetat als Substrat akzeptiert (Stumpff *et al.*, 2009). Der Transport von Azetat könnte so in Analogie zum klassischen Chloridtransport über resorbierende Epithelien erfolgen, welches auch am Pansenepithel etabliert ist. Dabei erfolgt die apikale Aufnahme des Anions über einen Anionenaustauscher, während die basolaterale Abgabe über einen Kanal erfolgt (Schmidt *et al.*, 2004). Ein entsprechender großer Anionenkanal mit Permeabilität nicht nur für Chlorid, sondern auch für das Anion des Azetats konnte bereits an isolierten Zellen des Pansenepithels nachgewiesen werden (Stumpff *et al.*, 2009).

Im Vergleich zum Pansen liegen über transportphysiologische Funktionen des Psalters nur wenige Erkenntnisse vor. Beobachtungen *in vivo* und *in vitro* belegen, dass Na^+ , Cl^- , HCO_3^- und kurzkettige Fettsäuren transportiert werden. Fortschritte im Verständnis der Transportmechanismen sind durch das Fehlen eines Zellkulturmodells behindert worden.

Ziel der vorliegenden Studie war es, mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik die Leitfähigkeit isolierter Pansen- und Psalterepithelzellen für Propionat sowie für weitere kurzkettige Fettsäuren und Halide zu untersuchen und die Wirkung entsprechender Blocker zu ermitteln. Folgende Ergebnisse wurden in dieser Studie zusammengestellt:

- Die Etablierung einer neuen Methode zur Isolierung von Psalterepithelzellen. Durch die in dieser Studie neu konzipierte Zellisolationskammer zur Isolierung von Psalterepithelzellen war es zum ersten Mal möglich, Zellen des Psalters in Kultur anzuzüchten und so Patch-Clamp-Experimente an isolierten Psalterepithelzellen durchzuführen. Die Isolierung von Pansenepithelzellen konnte durch diese neue Methode ebenfalls verbessert werden.

- Die immunhistochemische Charakterisierung des Epithels und der daraus isolierten Zellen. Es wurden durch immunhistochemische Färbungen Zytokeratine und die Tight Junction Proteine Occludin, Claudin 1, 4 und 7 am frischen Pansen- und Psalterepithel dargestellt. Diese Proteine konnten auch an isolierten und kultivierten Pansen- und Psalterepithelzellen nachgewiesen werden. Dadurch wurde der epitheliale Ursprung der kultivierten Zellen belegt.

- Der Nachweis eines für große Anionen durchlässigen Kanals an isolierten Pansen- und Psalterepithelzellen. An beiden Präparaten konnte eine Leitfähigkeit für Anionen nachgewiesen werden, die in der Reihenfolge Chlorid > Azetat > Propionat > Butyrat abnahm. Isolierte Pansenepithelzellen wiesen ebenfalls eine gewisse Leitfähigkeit für Laktat auf. Alle Anionenleitfähigkeiten ließen sich durch den Anionenkanalblocker DIDS reversibel hemmen. Die Propionatleitfähigkeit war reversibel pCMBs- und NPPB-sensitiv. Der Blocker des CFTR Glibenclamid hatte keinen Effekt. Die Halidsequenz entsprach mit

$F^- \approx Cl^- \approx Br^- > I^-$ am ehesten einer Eisenmann 1 Sequenz. Die durch Einzelkanalmessungen ermittelte Einzelkanalleitfähigkeit für Pansen- und Psalterepithelzellen beträgt ca. 350 pS für Chlorid, 140 pS für Azetat (Stumpff *et al.*, 2009) und ca. 100 pS für Propionat.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass isolierte Pansen- und Psalterepithelzellen einen großen Anionenkanal mit einer Leitfähigkeit für das kurzkettige Fettsäureanion Propionat exprimieren, welcher auch für andere Anionen in unterschiedlichem Maße permeabel ist. Ein Transportmodell für Fettsäuren über die Vormagenepithelien wird vorgeschlagen mit basolateraler Expression des Kanals. Die auf diesem Wege resorbierten Fettsäureanionen werden von dem von der Na^+K^+ -ATPase herrührenden Potential ins Blut getrieben. Die zugehörigen Protonen verbleiben im Pansenlumen und müssen dort durch den Speichel abgepuffert oder auf anderem Wege aus dem Pansen entfernt werden. Beim Versagen dieser Mechanismen kommt es zur Pansenazidose.

7 Summary

Characterization of an unselective anion-channel in cultured ovine ruminal and omasal epithelial cells

The rumen is the most important site of short chain fatty acid (SCFA) production in cows and sheep and absorption must increase in synchrony with production to ensure an optimal environment for ruminal microbes. Insufficient salivary buffering of the ruminal content in conjunction with inadequate adaptation of the epithelium leads to a breakdown of ruminal homeostasis with acidosis and rising osmolarity (Kleen *et al.*, 2003; Krause und Oetzel, 2005). Ruminal microbes and toxins can pass through the damaged epithelium into the blood system of the animal causing severe illness that may be fatal (Krause 2005, Owens 1998). The concomitant decrease in animal productivity leads to large economic losses.

However, our current understanding of the mechanisms of transcellular absorption of short chain fatty acids (SCFA) through forestomach epithelia is incomplete. Since the protonated form (HSCFA) is lipophilic, this form can simply diffuse across the lipid bilayer. In addition, the ruminal epithelium expresses an apical $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -exchanger, the physiological function of which has long been unclear since ruminal chloride concentrations are relatively low. Recent research suggests that this anion exchanger may mediate the cellular uptake of short chain fatty acid anions (SCFA^-) in exchange for HCO_3^- . Both pathways acidify the cytosol and drive the apical uptake of Na^+ in exchange for protons via NHE (Na^+/H^+ -exchange). The pH of the cytosolic compartment is thus maintained at neutral values while the absorption of sodium from the ruminal fluid is important both for the reduction of ruminal osmolarity and for the provision of sodium for resecretion with saliva. While butyrate is mostly metabolized intracellularly, large quantities of acetate and propionate cross the basolateral membrane and pass into the portal blood, thus providing energy for the animal as a whole.

However, the mechanism for the basolateral extrusion of SCFA has not yet been clarified. A recent study suggests that, as it is the case for the apical anion exchanger, the basolateral conductance for chloride is poorly selective and accepts acetate as a substrate (Stumpff *et al.*, 2009). The transport of acetate could thus follow the classical model of chloride transport across absorbing epithelia, which has also been established for the rumen. In this model, the apical uptake of the anions occurs through an anion exchanger, while the basolateral extrusion occurs via an ion channel (Schmidt *et al.*, 2004). A corresponding large anion channel with permeability not only for chloride, but also for the anions of acetate has recently been characterized in isolated cells of the ruminal epithelium (Stumpff *et al.*, 2009).

Compared to the numerous studies on ruminal tissue, only little research has been done to clarify the transport physiology of the omasal epithelium. Observations *in vivo* and *in vitro* support the notion that the tissue transports Na^+ , Cl^- , HCO_3^- and short chain fatty acids. Progress in understanding the underlying transport mechanisms has been hampered by the lack of a suitable cell culture model.

The goal of the current study was to use the patch-clamp-technique on isolated ruminal and omasal epithelial cells to investigate the conductance for propionate and for other SCFA and for the halides and to study the effects of corresponding blockers. The following results were obtained:

- The establishment of a new method for the isolation of cells from the omasal epithelium. The development of a new cell isolation chamber allows the isolation and cultivation of cells from the omasum for the first time, allowing patch-clamp-experiments to be performed on isolated cells of the omasum. The isolation of ruminal epithelial cells could also be improved via this method.
- The immunohistochemical characterization of the epithelium and the cells isolated from it. Immunohistochemical staining was used to demonstrate the expression of cytokeratins and of the tight junction proteins occludin, claudin 1, 4 and 7 in fresh ruminal and omasal tissues. These proteins could also be detected in cultured ruminal and omasal cells. The epithelial origin of the cultured cells was thus confirmed.
- The demonstration of a channel permeable to large anions in isolated cells of the rumen and the omasum. In both preparations, a conductance could be demonstrated with permeability decreasing in the order chloride > acetate > propionate > butyrate. Isolated ruminal epithelial cells also showed a certain conductance for lactate. All conductances were sensitive to the anion channel blocker DIDS. The conductance for propionate was reversibly sensitive to pCMBs und NPPB. The blocker of the CFTR channel glibenclamide had no effect. The halide sequence of the channel was $\text{F}^- \approx \text{Cl}^- \approx \text{Br}^- > \text{I}^-$ and thus resembles an Eisenman sequence I. The single channel conductance of the channel was determined in ruminal and omasal cells and corresponds to 350 pS for chloride, 140 pS for acetate (Stumpff *et al.*, 2009) and about 100 pS for propionate.

In summary, it could be shown that isolated cells of the rumen and the omasum express a large anion channel with a conductance for the anion of propionate. The channel is also

permeable to other anions, albeit to differing degrees. A transport model for SCFA across forestomach epithelia is proposed with a basolateral expression of the channel. The short chain fatty acid anions that are absorbed via this pathway enter the blood driven by the potential generated by the $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$. Protons remain in the ruminal lumen and have to be buffered by saliva or removed via alternate mechanisms. When these mechanisms break down, ruminal acidosis follows.

8 Literaturverzeichnis

- ABDOUN, K.; STUMPF, F.; RABBANI, I. und MARTENS, H. (2009)
Modulation of Urea Transport Across Sheep Rumen Epithelium in vitro by SCFA and CO₂.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol
- ABDOUN, K.; STUMPF, F.; RABBANI, I. und MARTENS, H. (2010)
Modulation of urea transport across sheep rumen epithelium in vitro by SCFA and CO₂.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **298**(2): S. G190-202
- ABDOUN, K.; STUMPF, F.; WOLF, K. und MARTENS, H. (2005)
Modulation of electroneutral Na transport in sheep rumen epithelium by luminal ammonia.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **289**(3): S. G508-20
- ADACHI, S.; UCHIDA, S.; ITO, H.; HATA, M.; HIROE, M.; MARUMO, F. und SASAKI, S. (1994)
Two isoforms of a chloride channel predominantly expressed in thick ascending limb of Henle's loop and collecting ducts of rat kidney.
J Biol Chem **269**(26): S. 17677-83
- ALEXANDRE, M. D.; LU, Q. und CHEN, Y. H. (2005)
Overexpression of claudin-7 decreases the paracellular Cl⁻ conductance and increases the paracellular Na⁺ conductance in LLC-PK1 cells.
J Cell Sci **118**(Pt 12): S. 2683-93
- ALI, O.; SHEN, Z.; TIETJEN, U. und MARTENS, H. (2006)
Transport of acetate and sodium in sheep omasum: mutual, but asymmetric interactions.
J Comp Physiol [B] **176**(5): S. 477-87
- ALLEN, M. S. (1997)
Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber.
J Dairy Sci **80**(7): S. 1447-62
- AMASHEH, S.; SCHMIDT, T.; MAHN, M.; FLORIAN, P.; MANKERTZ, J.; TAVALALI, S.; GITTER, A. H.; SCHULZKE, J. D. und FROMM, M. (2005)
Contribution of claudin-5 to barrier properties in tight junctions of epithelial cells.
Cell Tissue Res **321**(1): S. 89-96
- AMEEN, N.; ALEXIS, J. und SALAS, P. (2000a)
Cellular localization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in mouse intestinal tract.
Histochem Cell Biol **114**(1): S. 69-75
- AMEEN, N. A.; MARTENSSON, B.; BOURGUINON, L.; MARINO, C.; ISENBERG, J. und MCLAUGHLIN, G. E. (1999)
CFTR channel insertion to the apical surface in rat duodenal villus epithelial cells is upregulated by VIP in vivo.
J Cell Sci **112** (Pt 6): S. 887-94

- AMEEN, N. A.; VAN DONSELAAR, E.; POSTHUMA, G.; DE JONGE, H.; MCLAUGHLIN, G.; GEUZE, H. J.; MARINO, C. und PETERS, P. J. (2000b)
Subcellular distribution of CFTR in rat intestine supports a physiologic role for CFTR regulation by vesicle traffic.
Histochem Cell Biol **114**(3): S. 219-28
- ANNISON, E. F.; HILL, K. J. und LEWIS, D. (1957)
Studies on the portal blood of sheep. II. Absorption of volatile fatty acids from the rumen of the sheep.
Biochem J **66**(4): S. 592-9
- ASCHENBACH, J. R.; BILK, S.; TADESSE, G.; STUMPF, F. und GABEL, G. (2009)
Bicarbonate-dependent and bicarbonate-independent mechanisms contribute to nondiffusive uptake of acetate in the ruminal epithelium of sheep.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **296**(5): S. G1098-107
- ASCHENBACH, J. R.; PENNER, G. B.; STUMPF, F. und GÄBEL, G. (2010 (submitted))
Role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH.
J Anim Sci
- ASH, R. W. und DOBSON, A. (1963)
The Effect of Absorption on the Acidity of Rumen Contents.
J Physiol **169**: S. 39-61
- BALDWIN, R. L. T. und JESSE, B. W. (1992)
Developmental changes in glucose and butyrate metabolism by isolated sheep ruminal cells.
J Nutr **122**(5): S. 1149-53
- BANKS, W. J. (2001)
Applied Veterinary Histology: Mosby C. V.
- BARCROFT, R.; MCANNALLY, R. und PHILIPSON, A. (1944)
Absorption of volatile fatty acids from the alimentary tract of sheep and other animals.
J Exp Biol(20): S. 120-129
- BARRY, P. H. und LYNCH, J. W. (1991)
Liquid junction potentials and small cell effects in patch-clamp analysis.
J Membr Biol **121**(2): S. 101-17
- BEN-ZE'EV, A. (1984)
Inhibition of vimentin synthesis and disruption of intermediate filaments in simian virus 40-infected monkey kidney cells.
Mol Cell Biol **4**(9): S. 1880-9
- BERGMAN, E. N. (1990)
Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species.
Physiol Rev **70**(2): S. 567-90
- BERGMAN, E. N.; REID, R. S.; MURRAY, M. G.; BROCKWAY, J. M. und WHITELAW, F. G. (1965)
Interconversions and production of volatile fatty acids in the sheep rumen.
Biochem J **97**(1): S. 53-8

- BILK, S. (2008)
Mechanismen der anionischen SCFA-Resorption im Pansen des Schafes
Diss., Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig, Leipzig,
- BILK, S.; HUHN, K.; HONSCHA, K. U.; PFANNKUCHE, H. und GABEL, G. (2005)
Bicarbonate exporting transporters in the ovine ruminal epithelium.
J Comp Physiol [B] **175**(5): S. 365-74
- BINDER, H. J. (2010)
Role of colonic short-chain fatty acid transport in diarrhea.
Annu Rev Physiol **72**: S. 297-313
- BLAIR, K. L.; GEARY, T. G.; MENSCH, S. K.; VIDMAR, T. J.; LI, S. K.; HO, N. F. und THOMPSON, D. P. (2003)
Biophysical characterization of a large conductance anion channel in hypodermal membranes of the gastrointestinal nematode, *Ascaris suum*.
Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol **134**(4): S. 805-18
- BODEKER, D.; WINKLER, A. und HOLLER, H. (1990)
Ammonia absorption from the isolated reticulo-rumen of sheep.
Exp Physiol **75**(4): S. 587-95
- BORON, W. F. und BOULPAEP, E. L. (2003)
Medical Physiology
Philadelphia: Saunders
- BOWMAN, G. R.; BEAUCHEMIN, K. A. und SHELFORD, J. A. (2003)
Fibrolytic enzymes and parity effects on feeding behavior, salivation, and ruminal pH of lactating dairy cows.
J Dairy Sci **86**(2): S. 565-75
- BRAMLEY, E.; LEAN, I. J.; FULKERSON, W. J.; STEVENSON, M. A.; RABIEE, A. R. und COSTA, N. D. (2008)
The definition of acidosis in dairy herds predominantly fed on pasture and concentrates.
J Dairy Sci **91**(1): S. 308-21
- BRINKMANN, I. (2006)
Charakterisierung eines nicht selektiven Kationenkanals in Epithelzellen des Pansens von Schafen
Diss., Institut für Veterinär-Physiologie, Berlin, Free University of Berlin,
- BRITTON, R. und KREHBIEL, C. (1993)
Nutrient metabolism by gut tissues.
J Dairy Sci **76**(7): S. 2125-31
- BROWNLEE, A. und ELLIOT, J. (1960)
Studies on the normal and abnormal structure and function of the omasum of domestic cattle.
British veterinary journal **116**((12)): S. 467-473
- BUGAUT, M. (1987)
Occurrence, absorption and metabolism of short chain fatty acids in the digestive tract of mammals.
Comp Biochem Physiol B **86**(3): S. 439-72

- CARROLL, E. J. und HUNGATE, R. E. (1954)
The magnitude of the microbial fermentation in the bovine rumen.
Appl Microbiol **2**(4): S. 205-14
- CASSIDA, K. A. und STOKES, M. R. (1986)
Eating and resting salivation in early lactation dairy cows.
J Dairy Sci **69**(5): S. 1282-92
- CHARNEY, A. N.; MICIC, L. und EGNOR, R. W. (1998)
Nonionic diffusion of short-chain fatty acids across rat colon.
Am J Physiol **274**(3 Pt 1): S. G518-24
- CHESLER, M. und KAILA, K. (1992)
Modulation of pH by neuronal activity.
Trends Neurosci **15**(10): S. 396-402
- CHIEN, W. J. und STEVENS, C. E. (1972)
Coupled active transport of Na and Cl across forestomach epithelium.
Am J Physiol **223**(4): S. 997-1003
- COUNOTTE, G. H. und PRINS, R. A. (1981)
Regulation of lactate metabolism in the rumen.
Vet Res Commun **5**(2): S. 101-15
- CRAWFORD, I.; MALONEY, P. C.; ZEITLIN, P. L.; GUGGINO, W. B.; HYDE, S. C.;
TURLEY, H.; GATTER, K. C.; HARRIS, A. und HIGGINS, C. F. (1991)
Immunocytochemical localization of the cystic fibrosis gene product CFTR.
Proc Natl Acad Sci U S A **88**(20): S. 9262-6
- CUMMINGS, J. H.; POMARE, E. W.; BRANCH, W. J.; NAYLOR, C. P. und MACFARLANE,
G. T. (1987)
Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood.
Gut **28**(10): S. 1221-7
- CUPPOLETTI, J.; TEWARI, K. P.; SHERRY, A. M.; KUPERT, E. Y. und MALINOWSKA, D.
H. (2001)
ClC-2 Cl⁻ channels in human lung epithelia: activation by arachidonic acid, amidation,
and acid-activated omeprazole.
Am J Physiol Cell Physiol **281**(1): S. C46-54
- CUPPOLETTI, J.; TEWARI, K. P.; SHERRY, A. M. und MALINOWSKA, D. H. (2000)
Activation of human ClC-2 Cl⁻ channels: implications for cystic fibrosis.
Clin Exp Pharmacol Physiol **27**(11): S. 896-900
- DALEMANS, W.; HINNERSKY, J.; SLOS, P.; DREYER, D.; FUCHEY, C.; PAVIRANI, A. und
PUHELLE, E. (1992)
Immunocytochemical analysis reveals differences between the subcellular localization
of normal and delta Phe508 recombinant cystic fibrosis transmembrane conductance
regulator.
Exp Cell Res **201**(1): S. 235-40
- DANIELLI, J. F.; HITCHCOCK, M. W. S.; MARSHALL, R. A. und PHILLIPSON, A. T. (1945)
The mechanism of absorption from the rumen as exemplified by the behaviour of
acetic, propionic and butyric acid.
J Exp Biol **22**: S. 75-84

- DAWSON, D. C.; SMITH, S. S. und MANSOURA, M. K. (1999)
CFTR: mechanism of anion conduction.
Physiol Rev **79**(1 Suppl): S. S47-75
- DECKER, P.; GAERTNER, K.; HOERNICKE, H. und HILL, H. (1961)
[Continuous measurement of urea formation and urea reflux in the rumen in relation to urine flow with the aid of C-14-labelled urea in goats].
Pflugers Arch Gesamte Physiol Menschen Tiere **274**: S. 289-94
- DENNING, G. M.; OSTEDGAARD, L. S.; CHENG, S. H.; SMITH, A. E. und WELSH, M. J. (1992)
Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in chloride secretory epithelia.
J Clin Invest **89**(1): S. 339-49
- DIENER, M.; PETER, A. und SCHARRER, E. (1994)
The role of volume-sensitive Cl⁻ channels in the stimulation of chloride absorption by short-chain fatty acids in the rat colon.
Acta Physiol Scand **151**(3): S. 385-94
- DIENER, M. und SCHARRER, E. (1995)
Swelling-activated conductances for chloride, potassium and amino acids in the rat colon: a whole-cell study.
Exp Physiol **80**(3): S. 411-28
- 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): S. 755-62
- DIJKSTRA, J.; BOER, H.; VAN BRUCHEM, J.; BRUINING, M. und TAMMINGA, S. (1993)
Absorption of volatile fatty acids from the rumen of lactating dairy cows as influenced by volatile fatty acid concentration, pH and rumen liquid volume.
Br J Nutr **69**(2): S. 385-96
- DIRKSEN, G.; LIEBICH, H. G.; BROSI, G.; HAGEMEISTER, H. und MAYER, E. (1984)
[Morphology of the rumen mucosa and fatty acid absorption in cattle--important factors for health and production].
Zentralbl Veterinarmed A **31**(6): S. 414-30
- DOBSON, M. J.; BROWN, W. C.; DOBSON, A. und PHILLIPSON, A. T. (1956)
A histological study of the organization of the rumen epithelium of sheep.
Q J Exp Physiol Cogn Med Sci **41**(3): S. 247-53
- DOUCET, L.; MENDES, F.; MONTIER, T.; DELEPINE, P.; PENQUE, D.; FEREC, C. und AMARAL, M. D. (2003)
Applicability of different antibodies for the immunohistochemical localization of CFTR in respiratory and intestinal tissues of human and murine origin.
J Histochem Cytochem **51**(9): S. 1191-9
- DOWLAND, L. K.; LUYCKX, V. A.; ENCK, A. H.; LECLERCQ, B. und YU, A. S. (2000)
Molecular cloning and characterization of an intracellular chloride channel in the proximal tubule cell line, LLC-PK1.
J Biol Chem **275**(48): S. 37765-73

- DROOGMANS, G.; PRENEN, J.; EGGERMONT, J.; VOETS, T. und NILIUS, B. (1998)
Voltage-dependent block of endothelial volume-regulated anion channels by calix[4]arenes.
Am J Physiol **275**(3 Pt 1): S. C646-52
- DURAN, C.; THOMPSON, C. H.; XIAO, Q. und HARTZELL, H. C. (2010)
Chloride channels: often enigmatic, rarely predictable.
Annu Rev Physiol **72**: S. 95-121
- DUTTA, A. K.; SABIROV, R. Z.; URAMOTO, H. und OKADA, Y. (2004)
Role of ATP-conductive anion channel in ATP release from neonatal rat cardiomyocytes in ischaemic or hypoxic conditions.
J Physiol **559**(Pt 3): S. 799-812
- EDRISE, B. M. und SMITH, R. H. (1979)
Absorption and secretion in the omasum of the young steer.
Ann Rech Vet **10**(2-3): S. 354-5
- EDRISE, B. M.; SMITH, R. H. und BUTTLE, H. L. (1977)
Exchanges of digesta components in different compartments of the stomach of the young steer.
Proc Nutr Soc **36**(1): S. 8A
- EDRISE, B. M.; SMITH, R. H. und HEWITT, D. (1986)
Exchanges of water and certain water-soluble minerals during passage of digesta through the stomach compartments of young ruminating bovines.
Br J Nutr **55**(1): S. 157-68
- EGAN, M.; FLOTTE, T.; AFIONE, S.; SOLOW, R.; ZEITLIN, P. L.; CARTER, B. J. und GUGGINO, W. B. (1992)
Defective regulation of outwardly rectifying Cl⁻ channels by protein kinase A corrected by insertion of CFTR.
Nature **358**(6387): S. 581-4
- EKMAN, J. und SPERBER, I. (1953)
The distribution of concentrations of bicarbonate (including carbon dioxide) and chloride in the omasum of cows.
Lantbr Högsk Ann **19**: S. 227-231
- ELLENBERGER, W. (1981)
Zur Anatomie und Physiologie des dritten Magens der Wiederkäuer.
Archiv f wissenschaft u prakt Tierheilk **7**(1 und 2)
- EMANOVIC, D.; HARRISON, F. A.; KEYNES, R. D. und RANKIN, J. C. (1976)
The effect of acetazolamide on ion transport across isolated sheep rumen epithelium.
J Physiol **254**(3): S. 803-12
- ENEMARK, J. M. (2008)
The monitoring, prevention and treatment of sub-acute ruminal acidosis (SARA): a review.
Vet J **176**(1): S. 32-43
- ERDMAN, R. (1988)
Dietary Buffering Requirements of the Lactating Dairy Cow: A Review.
J. Dairy Sci. **71**: S. 3246-3266.

- ETSCHMANN, B.; HEIPERTZ, K. S.; VON DER SCHULENBURG, A. und SCHWEIGEL, M. (2006)
A vH⁺-ATPase is present in cultured sheep ruminal epithelial cells.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **291**(6): S. G1171-9
- EURELL, J. A. (2006)
Dellmanns Textbook of Veterinary Histology: Blackwell Publishing
- FAHEY, J. R. und BERGER, L. L. (1988)
Carbohydrate nutrition of ruminants in: The Ruminant Animal. Digestive Physiology and Nutrition
Englewood Cliffs, New Jersey: Church DC, Hrsg
- FATEHI, M. und LINSDELL, P. (2008)
State-dependent access of anions to the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel pore.
J Biol Chem **283**(10): S. 6102-9
- FAVILLI, N. (1937)
Struktur und Tätigkeit des dritten Magens (Blättermagen oder Psalter) bei den Hauswiederkäuern.
Deutsche Tierärztliche Wochenschrift: S. 592 - 594.
- FERREIRA, H. G.; HARRISON, F. A.; KEYNES, R. D. und NAUSS, A. H. (1966)
Observations on the potential across the rumen of the sheep.
J Physiol **187**(3): S. 615-30
- FERREIRA, H. G.; HARRISON, F. A.; KEYNES, R. D. und ZURICH, L. (1972)
Ion transport across an isolated preparation of sheep rumen epithelium.
J Physiol **222**(1): S. 77-93
- FRANKE, W. W.; SCHILLER, D. L.; MOLL, R.; WINTER, S.; SCHMID, E.; ENGELBRECHT, I.; DENK, H.; KREPLER, R. und PLATZER, B. (1981)
Diversity of cytokeratins. Differentiation specific expression of cytokeratin polypeptides in epithelial cells and tissues.
J Mol Biol **153**(4): S. 933-59
- GÄBEL, G. (1988)
Natrium- und Chloridtransport im Pansen von Schafen: Mechanismen und ihre Beeinflussung durch intraruminale Fermentationsprodukte
Diss., Tierärztliche Hochschule Hannover,
- GÄBEL, G. und ASCHENBACH, J. R. (2006)
Ruminal SCFA absorption: channeling acids without harm. In Ruminant physiology: Digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress
Wageningen: Academic Publishers
- GÄBEL, G.; ASCHENBACH, J. R. und MULLER, F. (2002)
Transfer of energy substrates across the ruminal epithelium: implications and limitations.
Anim Health Res Rev **3**(1): S. 15-30

- 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.
Zentralbl Veterinarmed A **38**(7): S. 523-9
- 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): S. 333-45
- GÄBEL, G.; MARTENS, H.; SUENDERMANN, M. und GALFI, P. (1987a)
The effect of diet, intraruminal pH and osmolarity on sodium, chloride and magnesium absorption from the temporarily isolated and washed reticulo-rumen of sheep.
Q J Exp Physiol **72**(4): S. 501-11
- GÄBEL, G. und SEHESTED, J. (1997)
SCFA transport in the forestomach of ruminants.
Comp Biochem Physiol A Physiol **118**(2): S. 367-74
- GÄBEL, G.; SUENDERMANN, M. und MARTENS, H. (1987b)
The influence of osmotic pressure, lactic acid and pH on ion and fluid absorption from the washed and temporarily isolated reticulo-rumen of sheep.
Zentralbl Veterinarmed A **34**(3): S. 220-6
- 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): S. 419-26
- GABRIEL, S. E.; CLARKE, L. L.; BOUCHER, R. C. und STUTTS, M. J. (1993)
CFTR and outward rectifying chloride channels are distinct proteins with a regulatory relationship.
Nature **363**(6426): S. 263-8
- GADSBY, D. C. und NAIRN, A. C. (1999)
Control of CFTR channel gating by phosphorylation and nucleotide hydrolysis.
Physiol Rev **79**(1 Suppl): S. S77-S107
- GALFI, P.; NEOGRADY, S. und KUTAS, F. (1981)
Culture of epithelial cells from bovine ruminal mucosa.
Vet Res Commun **4**(4): S. 295-300
- GALIETTA, L. J. und MORAN, O. (2004)
Identification of CFTR activators and inhibitors: chance or design?
Curr Opin Pharmacol **4**(5): S. 497-503
- GANDHI, R.; ELBLE, R. C.; GRUBER, A. D.; SCHREUR, K. D.; JI, H. L.; FULLER, C. M. und PAULI, B. U. (1998)
Molecular and functional characterization of a calcium-sensitive chloride channel from mouse lung.
J Biol Chem **273**(48): S. 32096-101
- GENZ, A. K.; V ENGELHARDT, W. und BUSCHE, R. (1999)
Maintenance and regulation of the pH microclimate at the luminal surface of the distal colon of guinea-pig.
J Physiol **517** (Pt 2): S. 507-19

- GEORGI, M. I.; ENDERS, J.; MUNDHENK, L.; MARTENS, H. und STUMPF, F. (2010a)
Isolation and Characterization of Cells of the Omasum.
in: Proc. Fachgruppe Physiologie und Biochemie der DVG,
Hannover
- GEORGI, M. I.; MARTENS, H. und STUMPF, F. (2010b)
Cells of the rumen and the omasum express a conductance permeable to the anions
of SCFA.
in: Proc. Fachgruppe Physiologie und Biochemie der DVG,,
Hannover Verlag der DVG,
S. 42
- GEORGI, M. I.; STUMPF, F. und MARTENS, H. (2010c)
Isolated Ruminant Epithelial Cells of the Sheep Express a Channel Permeable to the
Anions of SCFA.
in: Proc Soc Nutr Physiol,
Göttingen
19S. 125
- GIESECKE, D. und ENGELHARDT, W. V. (1975)
[Functions of the omasum in small domestic ruminants. II. Fermentation rate and
DNA content].
Zentralbl Veterinarmed A **22**(3): S. 177-86
- GOOSEN, P. C. (1976)
Metabolism in rumen epithelium oxidation of substrates and formation of ketone
bodies by pieces of rumen epithelium.
Z Tierphysiol Tierernahr Futtermittelkd **37**(1): S. 14-25
- 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): S. R997-1007
- GRAHAM, C. und SIMMONS, N. L. (2005)
Functional organization of the bovine rumen epithelium.
Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **288**(1): S. R173-81
- GRAY, F. V.; PILGRIM, A. F. und WELLER, R. A. (1954)
Functions of the omasum in the stomach of the sheep.
Journal of exp. Biol. **31**: S. 49-55
- GRUBER, A. D.; ELBLE, R. C.; JI, H. L.; SCHREUR, K. D.; FULLER, C. M. und PAULI, B. U.
(1998)
Genomic cloning, molecular characterization, and functional analysis of human
CLCA1, the first human member of the family of Ca²⁺-activated Cl⁻ channel proteins.
Genomics **54**(2): S. 200-14
- HAMILL, O. P.; MARTY, A.; NEHER, E.; SAKMANN, B. und SIGWORTH, F. J. (1981)
Improved patch-clamp-techniques for high-resolution current recording from cells and
cell-free membrane patches.
Pflügers Arch(391): S. 85-100

- HANSSON, A.; BLOOR, B. K.; SARANG, Z.; HAIG, Y.; MORGAN, P. R.; STARK, H. J.; FUSENIG, N. E.; EKSTRAND, J. und GRAFSTROM, R. C. (2003)
Analysis of proliferation, apoptosis and keratin expression in cultured normal and immortalized human buccal keratinocytes.
Eur J Oral Sci **111**(1): S. 34-41
- HARMEYER, J. und MARTENS, H. (1980)
Aspects of urea metabolism in ruminants with reference to the goat.
J Dairy Sci **63**(10): S. 1707-28
- HARRISON, F. A. (1971)
Ion transport across rumen and omasum epithelium.
Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **262**(842): S. 301-5
- 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): S. 669-77
- HAUFFE, R. und ENGELHARDT, W. (1975)
[Functions of the omasum of small ruminants. III. Absorption of water].
Zentralbl Veterinarmed A **22**(4): S. 283-95
- HAYDEN, U. L. und CAREY, H. V. (1996)
Cellular localization of cystic fibrosis transmembrane regulator protein in piglet and mouse intestine.
Cell Tissue Res **283**(2): S. 209-13
- HEITMANN, R. N.; DAWES, D. J. und SENSENIG, S. C. (1987)
Hepatic ketogenesis and peripheral ketone body utilization in the ruminant.
J Nutr **117**(6): S. 1174-80
- HELBIG, H.; KORBMACHER, C.; STUMPF, F.; COCA-PRADOS, M. und WIEDERHOLT, M. (1989)
Role of HCO₃⁻ in regulation of cytoplasmic pH in ciliary epithelial cells.
Am J Physiol **257**(4 Pt 1): S. C696-705
- HILLE, B. (2001)
Ion Channels of Excitable Membranes
Sunderland, Mass: Sinauer Associates
- HOFFMANN, E. K. (1992)
Cell swelling and volume regulation.
Can J Physiol Pharmacol **70 Suppl**: S. S310-3
- HOFMANN, R. R. und SCHNORR, B. (1982)
Die funktionelle Morphologie des Wiederkäuer-Magens
Stuttgart: R. R. Hofmann und B. Schnorr (Hrsg.)
- HOUPT, T. R. und HOUPT, K. A. (1968)
Transfer of urea nitrogen across the rumen wall.
Am J Physiol **214**(6): S. 1296-303
- HUG, M. J.; TAMADA, T. und BRIDGES, R. J. (2003)
CFTR and bicarbonate secretion by [correction of to] epithelial cells.
News Physiol Sci **18**: S. 38-42

- ILLEK, B.; TAM, A. W.; FISCHER, H. und MACHEN, T. E. (1999)
Anion selectivity of apical membrane conductance of Calu 3 human airway epithelium.
Pflugers Arch **437**(6): S. 812-22
- ISMAILOV, II; AWAYDA, M. S.; JOVOV, B.; BERDIEV, B. K.; FULLER, C. M.; DEDMAN, J. R.; KAETZEL, M. und BENOS, D. J. (1996)
Regulation of epithelial sodium channels by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.
J Biol Chem **271**(9): S. 4725-32
- JACKSON, B. R. (1974)
Adenomas of the colon and rectum: histopathology and management.
Dis Colon Rectum **17**(5): S. 656-67
- JENTSCH, T. J.; MARITZEN, T. und ZDEBIK, A. A. (2005a)
Chloride channel diseases resulting from impaired transepithelial transport or vesicular function.
J Clin Invest **115**(8): S. 2039-46
- JENTSCH, T. J.; NEAGOE, I. und SCHEEL, O. (2005b)
CLC chloride channels and transporters.
Curr Opin Neurobiol **15**(3): S. 319-25
- JENTSCH, T. J.; STEIN, V.; WEINREICH, F. und ZDEBIK, A. A. (2002)
Molecular structure and physiological function of chloride channels.
Physiol Rev **82**(2): S. 503-68
- JENTSCH, T. J.; STEINMEYER, K. und SCHWARZ, G. (1990)
Primary structure of Torpedo marmorata chloride channel isolated by expression cloning in Xenopus oocytes.
Nature **348**(6301): S. 510-4
- KARP, G. (1996)
Diffusion von Substanzen durch Membranen In: Molekulare Zellbiologie
Berlin, Heidelberg
- KEREM, B.; ROMMENS, J. M.; BUCHANAN, J. A.; MARKIEWICZ, D.; COX, T. K.; CHAKRAVARTI, A.; BUCHWALD, M. und TSUI, L. C. (1989)
Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis.
Science **245**(4922): S. 1073-80
- KEW, J. (2006)
Ion Channels: From Structure to Function. -1st: Oxford Univ Pr
- KIDDLE, P.; MARSHALL, R. A. und PHILLIPSON, A. T. (1951)
A comparison of the mixtures of acetic, propionic and butyric acids in the rumen and in the blood leaving the rumen.
J Physiol **113**(2-3): S. 207-17
- KIEFERLE, S.; FONG, P.; BENS, M.; VANDEWALLE, A. und JENTSCH, T. J. (1994)
Two highly homologous members of the CIC chloride channel family in both rat and human kidney.
Proc Natl Acad Sci U S A **91**(15): S. 6943-7

- KIRAT, D. und KATO, S. (2006)
Monocarboxylate transporter 1 (MCT1) mediates transport of short-chain fatty acids in bovine caecum.
Exp Physiol **91**(5): S. 835-44
- KIRAT, D.; MASUOKA, J.; HAYASHI, H.; IWANO, H.; YOKOTA, H.; TANIYAMA, H. und KATO, S. (2006)
Monocarboxylate transporter 1 (MCT1) plays a direct role in short-chain fatty acids absorption in caprine rumen.
J Physiol **576**(Pt 2): S. 635-47
- KIRAT, D.; MATSUDA, Y.; YAMASHIKI, N.; HAYASHI, H. und KATO, S. (2007)
Expression, cellular localization, and functional role of monocarboxylate transporter 4 (MCT4) in the gastrointestinal tract of ruminants.
Gene **391**(1-2): S. 140-9
- KLEEN, J. L.; HOOIJER, G. A.; REHAGE, J. und NOORDHUIZEN, J. P. (2003)
Subacute ruminal acidosis (SARA): a review.
J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med **50**(8): S. 406-14
- KNICKELBEIN, R.; ARONSON, P. S.; SCHRON, C. M.; SEIFTER, J. und DOBBINS, J. W. (1985a)
Sodium and chloride transport across rabbit ileal brush border. II. Evidence for Cl-HCO₃ exchange and mechanism of coupling.
Am J Physiol **249**(2 Pt 1): S. G236-45
- KNICKELBEIN, R. G.; ARONSON, P. S. und DOBBINS, J. W. (1985b)
Substrate and inhibitor specificity of anion exchangers on the brush border membrane of rabbit ileum.
J Membr Biol **88**(2): S. 199-204
- KOHN, R. A. und DUNLAP, T. F. (1998)
Calculation of the buffering capacity of bicarbonate in the rumen and in vitro.
J Anim Sci **76**(6): S. 1702-9
- KOLB, E. (1989)
Lehrbuch der Physiologie der Haustiere
- KRAMER, T.; MICHELBERGER, T.; GURTLER, H. und GABEL, G. (1996)
Absorption of short-chain fatty acids across ruminal epithelium of sheep.
J Comp Physiol [B] **166**(4): S. 262-9
- KRAUSE, K. M. und OETZEL, G. R. (2005)
Inducing subacute ruminal acidosis in lactating dairy cows.
J Dairy Sci **88**(10): S. 3633-9
- KRISTENSEN, N. B.; DANFAER, A. und AGERGAARD, N. (1998)
Absorption and metabolism of short-chain fatty acids in ruminants.
Arch Tierernahr **51**(2-3): S. 165-75
- KRISTENSEN, N. B.; GABEL, G.; PIERZYNOWSKI, S. G. und DANFAER, A. (2000a)
Portal recovery of short-chain fatty acids infused into the temporarily-isolated and washed reticulo-rumen of sheep.
Br J Nutr **84**(4): S. 477-82

- KRISTENSEN, N. B. und HARMON, D. L. (2004)
Splanchnic metabolism of volatile fatty acids absorbed from the washed reticulorumen of steers.
J Anim Sci **82**(7): S. 2033-42
- KRISTENSEN, N. B.; PIERZYNOWSKI, S. G. und DANFAER, A. (2000b)
Net portal appearance of volatile fatty acids in sheep intraruminally infused with mixtures of acetate, propionate, isobutyrate, butyrate, and valerate.
J Anim Sci **78**(5): S. 1372-9
- KRISTENSEN, N. B.; PIERZYNOWSKI, S. G. und DANFAER, A. (2000c)
Portal-drained visceral metabolism of 3-hydroxybutyrate in sheep.
J Anim Sci **78**(8): S. 2223-8
- KUNZELMANN, K. (2001)
CFTR: interacting with everything?
News Physiol Sci **16**: S. 167-70
- LANGBEIN, L.; GRUND, C.; KUHN, C.; PRAETZEL, S.; KARTENBECK, J.; BRANDNER, J. M.; MOLL, I. und FRANKE, W. W. (2002)
Tight junctions and compositionally related junctional structures in mammalian stratified epithelia and cell cultures derived therefrom.
Eur J Cell Biol **81**(8): S. 419-35
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. und COX, J. V. (2001)
Prinzipien der Biochemie
- LEO, A.; HANSCH, C. und ELKINS, D. (1971)
Partition coefficients and their use.
Chemical Reviews **71**: S. 525-616
- 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): S. 265-71
- 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): S. G246-52
- LEONHARD-MAREK, S.; HEMPE, J.; SCHROEDER, B. und BREVES, G. (2009)
Electrophysiological characterization of chloride secretion across the jejunum and colon of pigs as affected by age and weaning.
J Comp Physiol B **179**(7): S. 883-96
- LEONHARD-MAREK, S. und MARTENS, H. (1996)
Effects of potassium on magnesium transport across rumen epithelium.
Am J Physiol **271**(6 Pt 1): S. G1034-8
- LEONHARD-MAREK, S.; STUMPF, 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 Gastrointest Liver Physiol **288**(4): S. G630-45

- LI, C. und NAREN, A. P. (2005)
Macromolecular complexes of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and its interacting partners.
Pharmacol Ther **108**(2): S. 208-23
- LINSDALL, P. und HANRAHAN, J. W. (1996)
Disulphonic stilbene block of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channels expressed in a mammalian cell line and its regulation by a critical pore residue.
J Physiol **496** (Pt 3): S. 687-93
- LOPEZ, S.; HOVELL, F. D. und MACLEOD, N. A. (1994)
Osmotic pressure, water kinetics and volatile fatty acid absorption in the rumen of sheep sustained by intragastric infusions.
Br J Nutr **71**(2): S. 153-68
- LUCAS, M. L.; SCHNEIDER, W.; HABERICH, F. J. und BLAIR, J. A. (1975)
Direct measurement by pH-microelectrode of the pH microclimate in rat proximal jejunum.
Proc R Soc Lond B Biol Sci **192**(1106): S. 39-48
- MANOLOPOULOS, V. G.; VOETS, T.; DECLERCQ, P. E.; DROOGMANS, G. und NILIUS, B. (1997)
Swelling-activated efflux of taurine and other organic osmolytes in endothelial cells.
Am J Physiol **273**(1 Pt 1): S. C214-22
- MARTENS, H. und GABEL, G. (1988)
Transport of Na and Cl across the epithelium of ruminant forestomachs: rumen and omasum. A review.
Comp Biochem Physiol A Comp Physiol **90**(4): S. 569-75
- 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**(1): S. 103-14
- MASCOLO, N.; RAJENDRAN, V. M. und BINDER, H. J. (1991)
Mechanism of short-chain fatty acid uptake by apical membrane vesicles of rat distal colon.
Gastroenterology **101**(2): S. 331-8
- 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): S. 189-206
- MC SWEENEY, C. S. (1986)
An omaso-abomasal cannula used to asses efflux from the omasum of sheep.
Aust. Vet. J **63**(11): S. 332-334
- MCANALLY, R. A. (1942)
Digestion of straw by the ruminant.
Biochem J **36**(3-4): S. 392-9

- MCCARTY, N. A.; MCDONOUGH, S.; COHEN, B. N.; RIORDAN, J. R.; DAVIDSON, N. und LESTER, H. A. (1993)
Voltage-dependent block of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel by two closely related arylaminobenzoates.
J Gen Physiol **102**(1): S. 1-23
- MCDONALD, I. W. (1948)
The absorption of ammonia from the rumen of the sheep.
Biochem J **42**(4): S. 584-7
- MCSWEENEY, C. S. (1988)
A comparative study of the anatomy of the omasum in domesticated ruminants.
Aust Vet J **65**(7): S. 205-7
- MEIER, P. J.; KNICKELBEIN, R.; MOSELEY, R. H.; DOBBINS, J. W. und BOYER, J. L. (1985)
Evidence for carrier-mediated chloride/bicarbonate exchange in canalicular rat liver plasma membrane vesicles.
J Clin Invest **75**(4): S. 1256-63
- MITCHELL, C. H. und JACOB, T. J. (1996)
A nonselective high conductance channel in bovine pigmented ciliary epithelial cells.
J Membr Biol **150**(1): S. 105-11
- MOHAMMAD-PANAH, R.; ACKERLEY, C.; ROMMENS, J.; CHOUDHURY, M.; WANG, Y. und BEAR, C. E. (2002)
The chloride channel ClC-4 co-localizes with cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and may mediate chloride flux across the apical membrane of intestinal epithelia.
J Biol Chem **277**(1): S. 566-74
- MOLL, R.; FRANKE, W. W.; SCHILLER, D. L.; GEIGER, B. und KREPLER, R. (1982)
The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells.
Cell **31**(1): S. 11-24
- MORGANTE, M.; STELLETTA, C.; BERZAGHI, P.; GIANESELLA, M. und ANDRIGHETTO, I. (2007)
Subacute rumen acidosis in lactating cows: an investigation in intensive Italian dairy herds.
J Anim Physiol Anim Nutr (Berl) **91**(5-6): S. 226-34
- MORRIS, A. A. (2005)
Cerebral ketone body metabolism.
J Inherit Metab Dis **28**(2): S. 109-21
- MOSIMANN, W. und KOHLER, T. (1990)
In: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere
Berlin und Hamburg: Verlag Paul Parey
- MOUNT, D. B. und ROMERO, M. F. (2004)
The SLC26 gene family of multifunctional anion exchangers.
Pflugers Arch **447**(5): S. 710-21

- MÜLLER, F.; ASCHENBACH, J. R. und GÄBEL, G. (2000)
Role of Na⁺/H⁺ exchange and HCO₃⁻ transport in pH_i recovery from intracellular acid load in cultured epithelial cells of sheep rumen.
J Comp Physiol [B] **170**(4): S. 337-43
- MÜLLER, F.; HUBER, K.; PFANNKUCHE, H.; ASCHENBACH, J. R.; BREVES, G. und GABEL, G. (2002)
Transport of ketone bodies and lactate in the sheep ruminal epithelium by monocarboxylate transporter 1.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **283**(5): S. G1139-46
- NAGARAJA, T. G. und TITGEMEYER, E. C. (2007)
Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook.
J Dairy Sci **90 Suppl 1**: S. E17-38
- NAGEL, W. und KATZ, U. (1997)
Effects of NEM on voltage-activated chloride conductance in toad skin.
J Membr Biol **159**(2): S. 127-35
- NAKHOUL, N. L.; LOPES, A. G.; CHAILLET, J. R. und BORON, W. F. (1988)
Intracellular pH regulation in the S3 segment of the rabbit proximal tubule in HCO₃⁻ - free solutions.
J Gen Physiol **92**(3): S. 369-93
- NEHER, E. und SAKMANN, B. (1976)
Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres.
Nature **260**(5554): S. 799-802
- NEVES JDE, S.; AGUILAR-NASCIMENTO, J. E.; GOMES-DA-SILVA, M. H.; CAVALCANTI, R. N.; BICUDO, A. S.; NASCIMENTO, M. und NOCHI, R. J., JR. (2006)
Glutamine alone or combined with short-chain fatty acids fails to enhance gut adaptation after massive enterectomy in rats.
Acta Cir Bras **21 Suppl 4**: S. 2-7
- NICKEL, R.; SCHUMMER, A. und SEIFERLE, E. (1999)
Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. -8
Berlin und Hamburg
- NILIUS, B. und DROOGMANS, G. (2003)
Amazing chloride channels: an overview.
Acta Physiol Scand **177**(2): S. 119-47
- NOCEK, J. E. (1997)
Bovine acidosis: implications on laminitis.
J Dairy Sci **80**(5): S. 1005-28
- NUMBERGER, M. und DRAGHUN, A. (1996)
Patch-Clamp-Technik: Spektrum, Akad. Verl.
- OWENS, F. N.; SECRIST, D. S.; HILL, W. J. und GILL, D. R. (1998)
Acidosis in cattle: a review.
J Anim Sci **76**(1): S. 275-86
- OYAERT, W. und BOUCKAERT, J. H. (1961)
A study of passage of fluid through the sheep's omasum.
Res vet Sci **2**: S. 41 - 52

- PENNER, G. B.; TANIGUCHI, M.; GUAN, L. L.; BEAUCHEMIN, K. A. und OBA, M. (2009)
Effect of dietary forage to concentrate ratio on volatile fatty acid absorption and the expression of genes related to volatile fatty acid absorption and metabolism in ruminal tissue.
J Dairy Sci **92**(6): S. 2767-81
- PETERS, J. P.; SHEN, R. Y. und CHESTER, S. T. (1990)
Propionic acid disappearance from the foregut and small intestine of the beef steer.
J Anim Sci **68**(11): S. 3905-13
- PETERS, J. P.; SHEN, R. Y. und ROBINSON, J. A. (1992)
Disappearance of acetic acid from the bovine reticulorumen at basal and elevated concentrations of acetic acid.
J Anim Sci **70**(5): S. 1509-17
- PFANDER, W. H. und PHILLIPSON, A. T. (1953)
The rates of absorption of acetic, propionic and n-butyric acids.
J Physiol **122**(1): S. 102-10
- PHILLIPSON, A. und MCANNALLY, R. (1942)
Studies on the fate of Carbohydrates in the Rumen of Sheep.
J Exp Biol(19): S. 99
- PHILLIPSON, A. T. (1949)
Absorption of acetate from the rumen of sheep.
J Physiol **109**(1-2): S. Proc, 31
- PICOLLO, A. und PUSCH, M. (2005)
Chloride/proton antiporter activity of mammalian CLC proteins CIC-4 and CIC-5.
Nature **436**(7049): S. 420-3
- PLAIZIER, J. C.; KRAUSE, D. O.; GOZHO, G. N. und MCBRIDE, B. W. (2008)
Subacute ruminal acidosis in dairy cows: the physiological causes, incidence and consequences.
Vet J **176**(1): S. 21-31
- POWELL, D. W. (1981)
Barrier function of epithelia.
Am J Physiol **241**((4)): S. G275-88
- PUSCH, M. und NEHER, E. (1988)
Rates of diffusional exchange between small cells and a measuring patch pipette.
Pflugers Arch **411**(2): S. 204-11
- PUSCH, M.; STEINMEYER, K. und JENTSCH, T. J. (1994)
Low single channel conductance of the major skeletal muscle chloride channel, CIC-1.
Biophys J **66**(1): S. 149-52
- PUSCH, M.; STEINMEYER, K.; KOCH, M. C. und JENTSCH, T. J. (1995)
Mutations in dominant human myotonia congenita drastically alter the voltage dependence of the CIC-1 chloride channel.
Neuron **15**(6): S. 1455-63

- QU, Z. und HARTZELL, C. (2004)
Determinants of anion permeation in the second transmembrane domain of the mouse bestrophin-2 chloride channel.
J Gen Physiol **124**(4): S. 371-82
- RADOJA, N.; GAZEL, A.; BANNO, T.; YANO, S. und BLUMENBERG, M. (2006)
Transcriptional profiling of epidermal differentiation.
Physiol Genomics **27**(1): S. 65-78
- RAYMOND, W. A. und LEONG, A. S. (1989)
Co-expression of cytokeratin and vimentin intermediate filament proteins in benign and neoplastic breast epithelium.
J Pathol **157**(4): S. 299-306
- RECHKEMMER, G.; GÄBEL, G.; DIERNAES, L.; SEHESTED, J.; MOLLER, P. D. und VON ENGELHARDT, W. (1995)
Transport of short chain fatty acids in the forestomach and hindgut. In Ruminant Physiology: digestion, metabolism, growth and reproduction
Stuttgart: Enke Verlag
- REMOND, D.; CHAISE, J. P.; DELVAL, E. und PONCET, C. (1993)
Net flux of metabolites across the ruminal wall of sheep fed twice a day with orchardgrass hay.
J Anim Sci **71**(9): S. 2529-38
- REMOND, D.; ORTIGUES, I. und JOUANY, J. P. (1995)
Energy substrates for the rumen epithelium.
Proc Nutr Soc **54**(1): S. 95-105
- REYNOLDS, C. K.; HUNTINGTON, G. B.; TYRRELL, H. F. und REYNOLDS, P. J. (1988)
Net metabolism of volatile fatty acids, D-beta-hydroxybutyrate, nonesterified fatty acids, and blood gasses by portal-drained viscera and liver of lactating Holstein cows.
J Dairy Sci **71**(9): S. 2395-405
- REYNOLDS, P. J. und HUNTINGTON, G. B. (1988)
Net portal absorption of volatile fatty acids and L(+)-lactate by lactating Holstein cows.
J Dairy Sci **71**(1): S. 124-33
- RICHARD, M. H.; VIAC, J.; REANO, A.; GAUCHERAND, M. und THIVOLET, J. (1990)
Vimentin expression in normal human keratinocytes grown in serum-free defined MCDB 153 medium.
Arch Dermatol Res **282**(8): S. 512-5
- RIORDAN, J. R.; ROMMENS, J. M.; KEREM, B.; ALON, N.; ROZMAHEL, R.; GRZELCZAK, Z.; ZIELENSKI, J.; LOK, S.; PLAVSIC, N.; CHOU, J. L. und ET AL. (1989)
Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA.
Science **245**(4922): S. 1066-73
- RITZHAUPT, A.; ELLIS, A.; HOSIE, K. B. und SHIRAZI-BEECHEY, S. P. (1998)
The characterization of butyrate transport across pig and human colonic luminal membrane.
J Physiol **507** (Pt 3): S. 819-30

- ROBINSON, A. M. und WILLIAMSON, D. H. (1980)
Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues.
Physiol Rev **60**(1): S. 143-87
- ROMERO, M. F.; FULTON, C. M. und BORON, W. F. (2004)
The SLC4 family of HCO₃⁻ transporters.
Pflugers Arch **447**(5): S. 495-509
- ROMMENS, J. M.; IANNUZZI, M. C.; KEREM, B.; DRUMM, M. L.; MELMER, G.; DEAN, M.;
ROZMAHEL, R.; COLE, J. L.; KENNEDY, D.; HIDAKA, N. und ET AL. (1989)
Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping.
Science **245**(4922): S. 1059-65
- ROOS, A. (1975)
Intracellular pH and distribution of weak acids across cell membranes. A study of D-
and L-lactate and of DMO in rat diaphragm.
J Physiol **249**(1): S. 1-25
- SABIROV, R. Z.; SHEIKO, T.; LIU, H.; DENG, D.; OKADA, Y. und CRAIGEN, W. J. (2006)
Genetic demonstration that the plasma membrane maxianion channel and voltage-
dependent anion channels are unrelated proteins.
J Biol Chem(281): S. 1897-1904
- SARKADI, B. und PARKER, J. C. (1991)
Activation of ion transport pathways by changes in cell volume.
Biochim Biophys Acta **1071**(4): S. 407-27
- SCHMIDT, A.; LANG, F. und THEWS, G. (2004)
Physiologie des Menschen
Heidelberg: Springer
- SCHNORR, B. und VOLLMERHAUS, B. (1967a)
[The microstructure of the epithelium of the rumen of the goat and ox].
Zentralbl Veterinarmed A **14**(9): S. 789-818
- SCHNORR, B. und VOLLMERHAUS, B. (1967b)
[The surface relief of the ruminal mucosa in the ox and goat].
Zentralbl Veterinarmed A **14**(2): S. 93-104
- SCHWEIGEL, M.; LANG, I. und MARTENS, H. (1999)
Mg²⁺ transport in sheep rumen epithelium: evidence for an electrodiffusive uptake
mechanism.
Am J Physiol **277**(5 Pt 1): S. G976-82
- SCHWEIGEL, M. und MARTENS, H. (2003)
Anion-dependent Mg²⁺ influx and a role for a vacuolar H⁺-ATPase in sheep ruminal
epithelial cells.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **285**(1): S. G45-53
- SCHWIEBERT, E. M.; BENOS, D. J.; EGAN, M. E.; STUTTS, M. J. und GUGGINO, W. B.
(1999)
CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel.
Physiol Rev **79**(1 Suppl): S. S145-66

- SCHWIEBERT, E. M.; MILLS, J. W. und STANTON, B. A. (1994)
Actin-based cytoskeleton regulates a chloride channel and cell volume in a renal cortical collecting duct cell line.
J Biol Chem **269**(10): S. 7081-9
- SCOTT, A. (1971)
The surface of the ovine omasum as seen with the scanning electron microscope.
Z.Morph.Tiere **70**: S. 229-237
- SCOTT-WARD, T. S.; LI, H.; SCHMIDT, A.; CAI, Z. und SHEPPARD, D. N. (2004)
Direct block of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl(-) channel by niflumic acid.
Mol Membr Biol **21**(1): S. 27-38
- SEAL, C. J. und PARKER, D. S. (1994)
Effect of intraruminal propionic acid infusion on metabolism of mesenteric- and portal-drained viscera in growing steers fed a forage diet: I. Volatile fatty acids, glucose, and lactate.
J Anim Sci **72**(5): S. 1325-34
- SEHESTED, J.; DIERNAES, L.; MOLLER, P. D. und SKADHAUGE, E. (1993)
Interaction between absorption of sodium and acetate across the rumen epithelium of cattle.
Acta Vet Scand Suppl **89**: S. 107-8
- 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): S. 79-94
- SEHESTED, J.; DIERNAES, L.; MOLLER, P. D. und SKADHAUGE, E. (1999a)
Ruminal transport and metabolism of short-chain fatty acids (SCFA) in vitro: effect of SCFA chain length and pH.
Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol **123**(4): S. 359-68
- SEHESTED, J.; DIERNAES, L.; MOLLER, P. D. und SKADHAUGE, E. (1999b)
Transport of butyrate across the isolated bovine rumen epithelium--interaction with sodium, chloride and bicarbonate.
Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol **123**(4): S. 399-408
- SEIFTER, J. L. und ARONSON, P. S. (1984)
Cl- transport via anion exchange in Necturus renal microvillus membranes.
Am J Physiol **247**(6 Pt 2): S. F888-95
- SELLIN, J. H. (1999)
SCFAs: The Enigma of Weak Electrolyte Transport in the Colon.
News Physiol Sci **14**: S. 58-64
- SELLIN, J. H.; DESOIGNIE, R. und BURLINGAME, S. (1993)
Segmental differences in short-chain fatty acid transport in rabbit colon: effect of pH and Na.
J Membr Biol **136**(2): S. 147-58
- SHEPPARD, D. N. und WELSH, M. J. (1999)
Structure and function of the CFTR chloride channel.
Physiol Rev **79**(1 Suppl): S. S23-45

- SICILIANO-JONES, J. und MURPHY, M. R. (1989)
Production of volatile fatty acids in the rumen and cecum-colon of steers as affected by forage:concentrate and forage physical form.
J Dairy Sci **72**(2): S. 485-92
- SILANIKOVE, N. (1994)
The struggle to maintain hydration and osmoregulation in animals experiencing severe dehydration and rapid rehydration: the story of ruminants.
Exp Physiol **79**(3): S. 281-300
- SMITH, R. H. (1984)
Microbial activity in the omasum.
Proc Nutr Soc **43**(1): S. 63-8
- SPIEGEL, S.; PHILLIPPER, M.; ROSSMANN, H.; RIEDERER, B.; GREGOR, M. und SEIDLER, U. (2003)
Independence of apical Cl-/HCO₃⁻ exchange and anion conductance in duodenal HCO₃⁻ secretion.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **285**(5): S. G887-97
- STEINMEYER, K.; ORTLAND, C. und JENTSCH, T. J. (1991)
Primary structure and functional expression of a developmentally regulated skeletal muscle chloride channel.
Nature **354**(6351): S. 301-4
- STEVENS, C. E. (1964)
Transport of Sodium and Chloride by the Isolated Rumen Epithelium.
Am J Physiol **206**: S. 1099-105
- STEVENS, C. E. und STETTLER, B. K. (1966a)
Factors affecting the transport of volatile fatty acids across rumen epithelium.
Am J Physiol **210**(2): S. 365-72
- STEVENS, C. E. und STETTLER, B. K. (1966b)
Transport of fatty acid mixtures across rumen epithelium.
Am J Physiol **211**(1): S. 264-71
- STOREHEIER, P. V.; SEHESTED, J.; DIERNAES, L.; SUNDSET, M. A. und MATHIESEN, S. D. (2003)
Effects of seasonal changes in food quality and food intake on the transport of sodium and butyrate across ruminal epithelium of reindeer.
J Comp Physiol B **173**(5): S. 391-9
- STUMPF, F.; MARTENS, H.; BILK, S.; ASCHENBACH, J. R. und GABEL, G. (2009)
Cultured ruminal epithelial cells express a large-conductance channel permeable to chloride, bicarbonate, and acetate.
Pflugers Arch **457**(5): S. 1003-22
- STUMPF, F.; MARTENS, H. und GÄBEL, G. (2010)
Ruminal transport of SCFA.
in: Proc. Fachgruppe Physiologie und Biochemie der DVG,
Hannover
S. 36-41

- STUTTS, M. J.; CANESSA, C. M.; OLSEN, J. C.; HAMRICK, M.; COHN, J. A.; ROSSIER, B. C. und BOUCHER, R. C. (1995)
CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels.
Science **269**(5225): S. 847-50
- SUN, X. C.; MCCUTHEON, C.; BERTRAM, P.; XIE, Q. und BONANNO, J. A. (2001)
Studies on the expression of mRNA for anion transport related proteins in corneal endothelial cells.
Curr Eye Res **22**(1): S. 1-7
- SZASZI, K.; GRINSTEIN, S.; ORLOWSKI, J. und KAPUS, A. (2000)
Regulation of the epithelial Na⁽⁺⁾ /H⁽⁺⁾ exchanger isoform by the cytoskeleton.
Cell Physiol Biochem **10**(5-6): S. 265-72
- SZATKOWSKI, M. S. und THOMAS, R. C. (1989)
The intrinsic intracellular H⁺ buffering power of snail neurones.
J Physiol **409**: S. 89-101
- TAMMINGA, S. und VAN VUUREN, A. M. (1988)
Formation and utilization of end products of lignocellulose degradation in ruminants.
Animal and Feed Science Technology **21**: S. 141-159
- THORLACIUS, S. und LODGE, G. (1973)
Absorption of steam-volatile fatty acids from the rumen of the cow as influenced by diet, buffers and pH.
Can J Anim Sci **53**: S. 279-88
- TILLING, C. (1997)
In vitro Untersuchungen zum Chloridionentransport des Blättermagenepithels von Schafen
Diss., Free University, Berlin,
- TOMAKIDI, P.; FUSENIG, N. E.; KOHL, A. und KOMPOSCH, G. (1997)
Histomorphological and biochemical differentiation capacity in organotypic co-cultures of primary gingival cells.
J Periodontal Res **32**(4): S. 388-400
- TOWNE, G. und NAGARAJA, T. G. (1990)
Omasal ciliated protozoa in cattle, bison, and sheep.
Appl Environ Microbiol **56**(2): S. 409-12
- TRAUTMANN, A. und SCHMITT, I. (1935)
Experimentelle Untersuchungen zur Frage der Psalterfunktion.
Dtsch. Tierärztl. Wschr. **105**(7): S. 177-79
- UCHIDA, K.; TAKAHASHI, T.; INOUE, M.; MOROTOMI, M.; OTAKE, K.; NAKAZAWA, M.; TSUKAMOTO, Y.; MIKI, C. und KUSUNOKI, M. (2007)
Immunonutritional effects during synbiotics therapy in pediatric patients with short bowel syndrome.
Pediatr Surg Int **23**(3): S. 243-8
- VALVERDE, M. A.; HARDY, S. P. und DIAZ, M. (2002)
Activation of Maxi Cl⁽⁻⁾ channels by antiestrogens and phenothiazines in NIH3T3 fibroblasts.
Steroids **67**(6): S. 439-45

- VAN DER VELDEN, L. A.; MANNI, J. J.; RAMAEKERS, F. C. und KUIJPERS, W. (1999)
Expression of intermediate filament proteins in benign lesions of the oral mucosa.
Eur Arch Otorhinolaryngol **256**(10): S. 514-9
- VANDEWALLE, A.; CLUZEAUD, F.; BENS, M.; KIEFERLE, S.; STEINMEYER, K. und JENTSCH, T. J. (1997)
Localization and induction by dehydration of ClC-K chloride channels in the rat kidney.
Am J Physiol **272**(5 Pt 2): S. F678-88
- VANDORPE, D.; KIZER, N.; CIAMPOLLILO, F.; MOYER, B.; KARLSON, K.; GUGGINO, W. B. und STANTON, B. A. (1995)
CFTR mediates electrogenic chloride secretion in mouse inner medullary collecting duct (mIMCD-K2) cells.
Am J Physiol **269**(3 Pt 1): S. C683-9
- VASCONCELOS, J. T. und GALYEAN, M. L. (2008)
ASAS Centennial Paper: contributions in the Journal of Animal Science to understanding cattle metabolic and digestive disorders.
J Anim Sci **86**(7): S. 1711-21
- VIDYASAGAR, S.; BARMEYER, C.; GEIBEL, J.; BINDER, H. J. und RAJENDRAN, V. M. (2005)
Role of short-chain fatty acids in colonic HCO₃ secretion.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **288**(6): S. G1217-26
- VON ENGELHARDT, W. und RECHKEMMER, G. (1992)
Segmental differences of short-chain fatty acid transport across guinea-pig large intestine.
Exp Physiol **77**(3): S. 491-9
- WALTER, A. und GUTKNECHT, J. (1986)
Permeability of small nonelectrolytes through lipid bilayer membranes.
J Membr Biol **90**(3): S. 207-17
- WALTER, A.; HASTINGS, D. und GUTKNECHT, J. (1982)
Weak acid permeability through lipid bilayer membranes. Role of chemical reactions in the unstirred layer.
J Gen Physiol **79**(5): S. 917-33
- WEBSTER, P.; VANACORE, L.; NAIRN, A. C. und MARINO, C. R. (1994)
Subcellular localization of CFTR to endosomes in a ductal epithelium.
Am J Physiol **267**(2 Pt 1): S. C340-8
- WEIGAND, E.; YOUNG, J. W. und MCGILLIARD, A. D. (1972a)
Extent of butyrate metabolism by bovine ruminoreticulum epithelium and the relationship to absorption rate.
J Dairy Sci **55**(5): S. 589-97
- WEIGAND, E.; YOUNG, J. W. und MCGILLIARD, A. D. (1972b)
Extent of propionate metabolism during absorption from the bovine ruminoreticulum.
Biochem J **126**(1): S. 201-9
- WEIGAND, E.; YOUNG, J. W. und MCGILLIARD, A. D. (1975)
Volatile fatty acid metabolism by rumen mucosa from cattle fed hay or grain.
J Dairy Sci **58**(9): S. 1294-300

- 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.
Zentralbl Veterinarmed A **36**(10): S. 755-62
- WRIGHT, E. M. und DIAMOND, J. M. (1977)
Anion selectivity in biological systems.
Physiol Rev **57**(1): S. 109-56
- WÜRMLI, R.; WOLFFRAM, S. und SCHARRER, E. (1987)
Inhibition of chloride absorption from the sheep rumen by nitrate.
Zentralbl Veterinarmed A **34**(6): S. 476-9
- YAMAMOTO, Y.; KITAMURA, N.; YAMADA, J.; ANDREN, A. und YAMASHITA, T. (1994)
Morphological study of the surface structure of the omasal laminae in cattle, sheep and goats.
Anat Histol Embryol **23**(2): S. 166-76
- YAMAMOTO, Y.; KITAMURA, N.; YAMADA, J. und YAMASHITA, T. (1991)
Muscular architecture in the omasal laminae of cattle and sheep.
Vet Res Commun **15**(4): S. 249-56
- YANG, M. G. und THOMAS, J. W. (1965)
Absorption and secretion of some organic and inorganic constituents and the distribution of these constituents throughout the alimentary tract of young calves.
J Nutr **87**(4): S. 444-58
- YOSHIKAWA, M.; UCHIDA, S.; YAMAUCHI, A.; MIYAI, A.; TANAKA, Y.; SASAKI, S. und MARUMO, F. (1999)
Localization of rat CLC-K2 chloride channel mRNA in the kidney.
Am J Physiol **276**(4 Pt 2): S. F552-8
- ZHANG, Z. R.; CUI, G.; ZELTWANGER, S. und MCCARTY, N. A. (2004)
Time-dependent interactions of glibenclamide with CFTR: kinetically complex block of macroscopic currents.
J Membr Biol **201**(3): S. 139-55

9 Abkürzungsverzeichnis

AE	Anion Exchanger = Anionenaustauscher
ATP	Adenosintriphosphat
Ca ²⁺	Calcium
CA	Carboanhydrase
cAMP	cyclic Adenosinmonophosphat
Cl ⁻	Chlorid
CLC	Chloridkanal
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CO ₂	Kohlendioxid
DIDS	4,4'-Diisothiocyanostilben-2,2'-Disulfonsäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-Tetraessigsäure
FKS	fetales Kälberserum
HEPES	N-Hydroxethyl-Piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HSCFA	protonierten Form der kurzkettigen Fettsäuren
Mg ²⁺	Magnesium
MCT	Monocarboxylat Transporter
MDBK	Madin-Darby bovine Kidney
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
n	Anzahl der Zellen
Na ⁺	Natrium
NHE	Na ⁺ /H ⁺ - Exchanger = Na ⁺ /H ⁺ - Austauscher
NMDG	N-Methyl-D-glucamin
NPPB	5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoat
O ₂	Oxygen = Sauerstoff
ORCC	Outward Rectifying Chloride Channel
pCMBs	p-Chloromercuribenzoessäure
pH-Wert	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
pK-Wert	negativer Logarithmus der Dissoziationskonstante eines Elektrolyten
SCFA	kurzkettige Fettsäuren (short chain fatty acids)
SCFA ⁻	kurzkettige Fettsäureanionen
SEM	Standard error of mean = Standardfehler des arithmetischen Mittelwertes

10 Anhang

10.1 Protokoll zur Kultivierung von Pansenepithelzellen

10.1.1 Gewinnung des Pansenepithels

Nach der Schlachtung (Töten durch Blutentzug) der Schafe wird der Pansen entnommen. Aus dem Bereich des Pansenvorhofes (Atrium ruminis) werden ca. 5 x 5 cm große Gewebestücke gewonnen.

Pansenstücke mehrmals mit Ca^{2+} - und Mg^{2+} - freier Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)-Lösung mit 4 % Penicillin-Streptomycin waschen

Transport zum Labor bei 4 °C in dieser Lösung

Im Labor (nach spätestens 45 Minuten) Pansenzotten vorsichtig mit einer Metzenbaumschere abschneiden.

Mehrfach in Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freien DPBS mit 4 % Penicillin-Streptomycin waschen

10.1.2 Trypsinierung der Pansenzotten

Pansenzotten mit ca. 50 ml 0,25 %iger-Trypsin-EDTA-Lösung ($2,5 \text{ g l}^{-1}$ Schweinetrypsin und $0,2 \text{ g l}^{-1}$ EDTA, Sigma Aldrich) bei 37 °C kontinuierlich durchmischen

Die Trypsin-EDTA-Lösung alle 30 Minuten abgießen und durch frische Trypsin-EDTA-Lösung ersetzen

Vorgang viermal wiederholen

Zellfraktion (F4) zur Trennung von Geweberesten und Pflanzenteilen durch sterile, vierlagige Gaze filtrieren

In Zentrifugenröhrchen (50 ml, Greiner bio-one GmbH) auffangen

Verbleibende Zotten wieder für 30 Minuten bei 37 °C trypsinieren

Gleiches gilt für die Fraktion F5, F6 und F7

10.1.3 Aussähen der Zellen

Alle Fraktionen für 10 Minuten bei 2 – 5 °C und 1000 UpM kühlzentrifugieren (Kühlzentrifuge Sorvall RC- 5B Refrigerator, Du Pont Instruments)

Überstand absaugen

Zellen mit Ca^{2+} und Mg^{2+} freiem DPBS mit 1 % Penicillin-Streptomycin mischen kühlzentrifugieren

Drei Mal wiederholen

Zellpellet mit Zellkulturmedium M1 (genaue Zusammensetzung siehe TAB.1) suspendieren

In kollagenisierte Zellkulturschalen (Durchmesser 60 mm, Biochrome, Berlin) aussäen

Für 24 Stunden im Brutschrank bei 100 % Wasserdampfsättigung in einem Luft- CO_2 (5 %)-Gemisch bei 38 °C inkubieren

10.1.4 Kollagenisierung der Zellkulturschalen

Zellkulturschalen mit Collagen A Lösung (Biochrom, Berlin) und Ca^{2+} - und Mg^{2+} haltiger DPBS Lösung füllen (1,5 ml Collagen + 1,5 ml DPBS)

20 Minuten im Brutschrank bei 100 % Wasserdampfsättigung in einem Luft- CO_2 (5 %)-Gemisch bei 38 °C inkubieren

Kollagen-DPBS-Gemisch absaugen

Schalen mit Ca^{2+} - und Mg^{2+} haltiger DPBS Lösung spülen

10.1.5 Zellkulturmedien

nach 24 Stunden Zellkulturmedium (M1) entfernen

Am Boden der Zellkulturschale angeheftete Pansenepithelzellen zweimal mit Ca^{2+} und Mg^{2+} freier DPBS spülen

Zellen für weitere 24 bis 48 Stunden im Brutschrank mit dem Zellkulturmedium M2 (genaue Zusammensetzung sh. Tabelle 17) inkubieren.

Tabelle 17 Zusammensetzung der Zellkulturmedien M1 und M2

Substanz	Zellkulturmedium M1	Zellkulturmedium M2
Medium 199 Earle	Basismedium	Basismedium
Fetales Kälberserum 15 %	150 ml/l	100 ml/l
HEPES (1M)	20 ml/l	20 ml/l
Nystatin $2,4 \times 10^5$ U/l	24 ml/l	-
Gentamycin 50 mg/l	50 ml/l	5 ml/l
Kanamycin 100 mg/l	10 ml/l	10 ml/l

10.1.6 Trypsinierung der Pansenepithelzellen

nach ca. 6 Tagen Ausbildung eines Zellrasens

zweimal mit Ca^{2+} - und Mg^{2+} - freiem DPBS spülen

mit 1,5 ml 0,25 %-Trypsin-EDTA-Lösung bedecken

20 Minuten im Brutschrank trypsinieren

Trypsinierungs-Vorgang mit modifiziertem DMEM-Zellkulturmedium (Dulbecco's Modified Earle Medium + 10 % FKS, 5 % HEPES, 2 % Penicillin/Streptomycin, sh. Tabelle 18) anhalten

Tabelle 18 DMEM (PAN-Biotech GmbH)

Substanz		Konzentration
DMEM mit	Basismedium 500 ml	
Glucose		4,5 g/l
L-Glutamin		
Natriumpyruvat		
NaHCO₃		3.7 g/l
Fetales Kälberserum 10 %	50 ml/l	10 %
HEPES (1M)	10 ml/l	2 %
Penicillin/Streptomycin	5 ml/l	1 %

10.1.7 Sterilisieren der Deckgläser

Jeweils vier Deckgläser in Aluminiumfolie einwickeln

Bei 200 °C für 2 h in den Sterilisationsofen

10.1.8 Aussähen der Zellen auf Deckgläser

vier sterile Deckgläser (Durchmesser 13 mm, Menzel, Braunschweig) in eine Zellkulturschale (Durchmesser 35 mm) legen. Einen Tropfen Zellsuspension auf jedes Deckglas (Durchmesser 13 mm, Menzel, Braunschweig) geben und mit DMEM auffüllen

10.2 Übersicht der für die Zellkultur verwendeten MaterialienZellisolierung

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

Zellkultivierung

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
Medium 199	Sigma-Aldrich
Nystatin	Sigma-Aldrich
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA-Lösung (0,25 %)	Sigma-Aldrich
Zellkulturschalen	Biochrom
Deckgläser	Menzel (Braunschweig)

10.3 Detailliertes Protokoll für die Immunhistochemischen Färbungen

Triton-X Lösung (0,1 %): 5 µl auf 5 ml PBS

Puffer: PBS + 2 % BSA (Bovines Serum Albumin Fraktion 5 (Roth))

Blockpuffer: 4 Teile (PBS + 2 % BSA) + 1 Teil Goat Serum

Antikörper ansetzen:

z.B. Mouse Anti Cytokeratin (AE1): 1 % Anti-Cytokeratin in PBS + 2 % BSA

- 1) Zellen auf gekammerte Objektträger aussähen
- 2) dreimal mit PBS-Lösung waschen
- 3) mit 4 %iger Paraformaldehydlösung für 15 Minuten bei -20 °C fixieren
- 4) Zellen dreimal mit PBS-Lösung abspülen
- 5) Mit „Roti“ Liquid Barrier Marker (Art AN 92.1) umranden
- 6) Um die Zellen zu permeabilisieren, ca. 100 µl 0,1 % Triton-X Lösung in jede Kammer geben und 5 Minuten einwirken lassen
- 7) dreimal mit PBS-Lösung waschen
- 8) Blockpuffer hinzugeben und nach 30 Minuten abschütten (waschen nicht nötig)
- 9) auf alle Kammern einen Tropfen entweder:
A: PBS + 2 % BSA + Antikörper
B: PBS + 2 % BSA (Kontrolle)
eine Stunde einwirken lassen
- 10) 5x mit PBS waschen
- 11) sekundärer (fluoreszenzmarkierter) Antikörper 1 % in PBS
- 12) dunkel abdecken und eine Stunde stehen lassen
- 13) mit PBS waschen
- 14) Deckgläschen aufsetzen oder Deckgläschen umdrehen und auf Objektträger setzen
- 15) im Dunkeln stehen lassen bis angetrocknet (kann auch einige Tage später betrachtet werden)

Verwendete Antikörper:

1. Mouse Anti-Cytokeratin (AE1), Firma ZyMED, S. San Francisco, CA, USA

Monoclonal Mouse Anti-Vimentin Clon V9, Dako Cyttoation, Denmark

2. Antikörper: Anti-Mouse IgG FITC Conjugate; Sigma Immuno Chemicals (St.Louis, MO, USA)

10.4 Genaue Zusammensetzung der Bad - und Pipettenlösungen

10.4.1 Ganzzellmessungen

Tabelle 19 Pipettenlösung

mmol·l ⁻¹	NaGlu	KCl	NaH ₂ PO ₄	Hepes	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	MgCl ₂ · 6 H ₂ O	EGTA	NaCl
Na-Gluconat	128,20	5	1	10	0,8	0,9	5	8,8

pH-Wert von 7,2 mit 1 M TRIS (C₄H₁₂NO₃) bei Raumtemperatur eingestellt

Osmolarität von 290 mmol·l⁻¹ mit Mannitol eingestellt

Tabelle 20 Badlösungen

mmol·l ⁻¹	Na ⁺ + Dominierendes Anion	KCl	NaH ₂ PO ₄	Hepes	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	MgCl ₂ · 6 H ₂ O	NaCl
NaCl	128,20	5	1	10	1,7	0,9	8,8
Na-Gluconat	128,20	Idem					
Na-Azetat	128,20	Idem					
Na-Propionat	128,20	Idem					
Na-Butyrat	128,20	Idem					
Na-Laktat	128,20	Idem					
NaCl-Hypo 75%	102,75	Idem					
Na-Iodid	128,20	Idem					
Na-Bromid	128,20	Idem					
Na-Fluorid	128,20	Idem					

pH-Wert von 7,4 mit 1 M TRIS-OH (C₄H₁₁NO₃) bei Raumtemperatur eingestellt

Osmolarität von 290 mmol·l⁻¹ mit äquivalenten Mengen des dominierenden Anions eingestellt

10.4.2 Einzelkanalmessungen

Tabelle 21 Pipettenlösungen

mmol·l ⁻¹	NMDG	KCl	NaH ₂ PO ₄	Hepes	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	MgCl ₂ · 6 H ₂ O	NaCl
NMDG-Propionat	128,20	5	1	10	1,5	1,1	8,8

pH-Wert von 7,4 mit Propionsäure bei Raumtemperatur eingestellt

Osmolarität von 290 mmol·l⁻¹ mit Mannitol eingestellt

Tabelle 22 Badlösungen

mmol·l ⁻¹	NMDG	KCl	NaH ₂ PO ₄	Hepes	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	MgCl ₂ · 6 H ₂ O	NaCl	EGTA
NMDG-Chlorid	128,20	5	1	10	1,5	1,1	8,8	5
NMDG-Propionat	Idem							
NMDG-Gluconat	Idem							

pH-Wert von 7,2 mit Salzsäure/Propionsäure/Essigsäure bei Raumtemperatur eingestellt

Osmolarität 290 mmol·l⁻¹ mit Mannitol eingestellt

11 Publikationsliste

Journal Articles

1. Stumpff, F., Georgi, M.I., Mundhenk, L., Rabbani, I., Fromm, M., Martens, H., Günzel, D. (2011):
Sheep rumen and omasum primary cultures and source epithelia:
Barrier function aligns with expression of tight junction proteins.
J Exp Biol (submitted),

Conference proceedings

1. Stumpff, F., Georgi, M.I., Martens, H., Gäbel, G. (2009):
Ruminal epithelial cells express a conductance for Propionate.
Acta Physiol 195, S. 175
2. Stumpff, F., Georgi, M.I., Martens, H. (2009):
The ruminal anion channel: a pathway for the efflux of SCFA.
XIth International Symposium on Ruminant Physiology, S. 366
3. Georgi, M.I., Stumpff, F., Martens, H. (2010):
Isolated Ruminal Epithelial Cells of the Sheep Express a Channel Permeable to the Anions of SCFA.
Proc Soc Nutr Physiol 19, S. 125
4. Georgi, M.I., Enders, J., Mundhenk, L., Martens, H., Stumpff, F. (2010):
Isolation and Characterization of Cells of the Omasum.
Proc. Fachgruppe Physiologie und Biochemie der DVG 19, S. 82
5. Georgi, M.I., Martens, H., Stumpff, F. (2010):
Cells of the rumen and the omasum express a conductance permeable to the anions of SCFA.
Proc. Fachgruppe Physiologie und Biochemie der DVG 19, S. 42
6. Stumpff, F., Georgi, M.I., Martens, H. (2010):
The permeability of the large conductance anion channel of the ruminal epithelium decreases with increasing chain length.
Acta Physiol 198 (Supp 677), P-Mon-90

7. Stumpff, F., Georgi, M.I., Martens, H. (2010):
Isolated cells of the omasum express tight junction proteins and maxi-anion channels with a conductance for acetate and propionate.
Acta Physiol. 198 (Supp 677), O-Sun-6-8
8. Stumpff, F., Georgi, M.I., Aschenbach, J.R., Martens, H. (2011):
Sizing the pore of the ruminal anion channel.
Acta Physiol 201(Suppl. 682), S. 344
9. Günzel, D., Georgi, M.I., Martens, H., Fromm, M., Stumpff, F. (2011):
Ruminant forestomach primary cultures and source epithelia: barrier function aligns with expression of tight junction proteins.
Acta Physiol 201(Suppl. 682), S. 298

12 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Holger Martens für die Überlassung des Themas und seine jederzeit gewährte Beratung.

Ein ganz großes Dankeschön geht auch an Frau Dr. Friederike Stumpff für die unendliche Geduld, mir das Patchen beizubringen. Danke auch für die einzigartig gute Betreuung. Es hat wirklich viel Spaß gemacht mit Ihnen zusammenzuarbeiten.

Ebenfalls herzlichen Dank an:

Frau PD Dr. Dorothee Günzel aus dem Institut für Klinische Physiologie des Charité Campus Benjamin Franklin für die hervorragende Zusammenarbeit bei den immunhistochemischen Färbungen und Lasermikroskopischen Aufnahmen.

Herrn Dr. Lars Mundhenk und Frau Jana Enders aus dem Institut für Tierpathologie für die gute Zusammenarbeit.

Frau Dr. Gisela Arndt aus dem Institut für Biometrie.

Frau Gaby Kieselowsky für die Hilfe beim Kultivieren der Pansenzellen.

Den Tierpflegern für die Versorgung der Schafe und Hilfe bei den Versuchen.

Alle Doktoranden des Instituts für Veterinär-Physiologie für die lustigen Momente und das Zuhören in schwierigen Phasen.

Alle Mitglieder des Instituts für das nette Arbeitsklima.

Ich danke der H. Wilhelm Schaumann Stiftung, insbesondere Prof. Kalm, für die Bereitstellung des Promotionsstipendiums.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern, meinen Großeltern sowie meiner Familie bedanken, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Gracias mare. Gracias pare. Gracias Maria-Olympia i familia. Gracias Jumbina. Gracias Stefan.

Herrn Dr. Sedlmaier und Michael Feske für die Hilfe bei den verschiedensten Computerproblemen und dem Korrekturlesen.

Ich bedanke mich bei allen Freunden und Kollegen, vor allem Frau Dr. Christine Berger und Herrn Dr. Lothar Jäkel, die an mich geglaubt haben.

13 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur mit den aufgeführten Hilfsmitteln erstellt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 28.03. 2011

Maria-Ifigenia Georgi