

1	EINLEITUNG UND LITERATUR	11
1.1	ALLGEMEINE EINLEITUNG	11
1.2	MORPHOLOGISCH-HISTOLOGISCHE ADAPTATION	13
1.2.1	Anatomisch-histologische Übersicht über den Aufbau des Pansens	13
1.2.2	Mikrobielle Stoffwechselprozesse im Pansen (schematische Darstellung)	17
1.2.3	Allgemeine Einführung in die Adaptationsprozesse der inneren ruminalen Oberfläche	18
1.2.4	Fütterungsabhängige Entwicklung des Vormagensystems beim neugeborenen Kalb	19
1.2.5	Morphologisch-anatomische Adaptation des Pansenepithels	19
1.2.6	Histologische Adaptation des Pansenepithels	21
1.3	ADAPTATION AUF FUNKTIONELLER EBENE	28
1.3.1	Grundlagen der nervösen und vaskulären Versorgung des Pansens	28
1.3.2	Grundlagen der Transportphysiologie des Pansens	28
1.3.3	Beeinflussung der Transportprozesse am Pansenepithel	37
1.3.4	Erläuterung der gewählten Stimulationskriterien	42
1.3.5	Übersicht zu den biochemischen und molekularbiologischen Charakteristika der einzelnen Transporter	47
2	MATERIAL UND METHODEN	57
2.1	USSING-KAMMER-METHODE	57
2.1.1	Versuchstiere und Fütterungsregime	57
2.1.2	Entnahme und Präparation der Schleimhäute	57
2.1.3	Allgemeiner Versuchsaufbau	57
2.1.4	Elektrische Messungen	58
2.1.5	Ionenfluxmessungen für Natrium	59
2.1.6	Berechnungen	59
2.2	ZELLKULTURVERFAHREN	60
2.2.1	Kultivierung von REC	60
2.3	STIMULATIONSVERSUCHE	62
2.4	ISOLIERUNG DER GESAMT-RNA AUS TIERISCHEN ZELLEN	64

2.4.1	Stabilisierung der Proben-RNA	64
2.4.2	Aufarbeitung der stabilisierten Gewebeproben	64
2.4.3	Photometrische Bestimmung des RNA-Gehaltes	65
2.5	KONVENTIONELLE PCR	66
2.5.1	PCR und RT-PCR allgemein	66
2.5.2	Recherche und Herstellung synthetischer Oligonucleotide für die konventionelle PCR	66
2.5.3	Protokoll der RT-PCR	67
2.5.4	DNA-Gelelektrophorese	67
2.5.5	PCR zur Vermehrung eines PCR-Produktes (Massen-PCR)	67
2.5.6	Aufreinigung eines PCR-Produktes	68
2.5.7	Extraktion einer DNA-Bande aus einem Elektrophoresegel	68
2.6	KLONIERUNG VON PLASMIDEN	69
2.6.1	Klonierung von DNA in Plasmiden allgemein	69
2.6.2	Anfügen von Adenosin-Überhängen	69
2.6.3	Ligationsprotokoll	69
2.6.4	Transformationsprotokoll	70
2.6.5	Selektion plasmidtragender Bakterien	71
2.6.6	Präparation von Plasmid-DNA aus kleinen Bakterienkulturen	71
2.6.7	Prüfen auf das Vorhandensein des Inserts im Plasmid durch Restriktionsverdau	72
2.6.8	Vermehrung von Plasmiden im mittleren Maßstab (Midi-Prep-Verfahren)	72
2.6.9	Herstellung von LB (Luria / Miller) Agarplatten	74
2.6.10	Herstellung von LB-Medium	74
2.7	QUANTITATIVE PCR	75
2.7.1	Allgemeines	75
2.7.2	cDNA-Synthese	76
2.7.3	Protokoll der qPCR	76
2.7.4	Etablierungsverfahren	77
2.7.5	Referenzgene	78
2.7.6	Kontrollen	79
2.7.7	Auswertung der qPCR-Ergebnisse	79

2.7.8	Relative Quantifizierung (ddCT-Methode)	80
3	ERGEBNISSE	82
3.1	ERGEBNISSE DER USSING-KAMMER-VERSUCHE	83
3.1.1	Tiere	83
3.1.2	Elektrophysiologische Parameter	83
3.1.3	Gewebegewicht	84
3.1.4	Natriumtransportraten	85
3.2	QUALITATIVER NACHWEIS DER TRANSPORTPROTEINE	87
3.3	KLONIERUNGS- UND SEQUENZIERUNGSERGEBNISSE	88
3.4	ERGEBNISSE DER RELATIVEN QUANTIFIZIERUNG	93
3.4.1	Etablierung der Assays mittels Regressionsanalyse	93
3.4.2	Beurteilung und Berechnung der Ergebnisse	94
3.4.3	Relative Expressionsraten an Pansenepithelgeweben	94
3.4.4	Relative Expressionsraten nach Stimulationsversuchen an PEZ	96
3.4.5	Zusammenfassung der Ergebnisse der relativen Quantifizierung	110
4	DISKUSSION	112
4.1	VERSUCHSKRITIK	112
4.1.1	Statistische Auswertung	112
4.1.2	RNA-Stabilität	113
4.1.3	RNA-Qualitätskontrolle	113
4.1.4	Referenzgen (β -Aktin)	113
4.2	DISKUSSION DER USSING-KAMMER-VERSUCHE	115
4.2.1	Zeitlicher Verlauf der Pansenadaptation	115
4.2.2	Schleimhautoberfläche und Transportaktivität des Pansenepithels	117
4.2.3	Regulation des Adaptationsprozesses am Pansenepithel	119
4.2.4	Leitfähigkeit (G_t)	120
4.2.5	Kurzschlussstrom (I_{sc})	121
4.2.6	Zusammenfassung	121
4.3	GENEXPRESSIONSPROFILE IN PANSENEPITHELGEWEBEN	123
4.4	GENEXPRESSIONSPROFILE IN PANSENEPITHELZELLEN	125
4.4.1	Butyrat und Laktat	125

4.4.2	CO ₂	126
4.4.3	IGF1 (insulin-like growth factor 1)	126
4.4.4	EGF (Epidermal growth factor)	128
4.4.5	cAMP und PGE2	128
5	ZUSAMMENFASSUNG	131
6	SUMMARY	132
7	LITERATURVERZEICHNIS	133
8	ANHANG	153
8.1	USSING-KAMMER-VERSUCHE	153
8.1.1	Fütterungsregime	153
8.1.2	Entnahme und Präparation der Schleimhäute	153
8.1.3	Allgemeiner Versuchsaufbau und elektrische Messungen	153
8.1.4	Ionenfluxmessungen für Natrium	154
8.2	ZELLKULTURVERFAHREN	154
8.2.1	Kultivierung von REC	154
8.3	STIMULATIONSVERSUCHE	155
8.3.1	Verwendete Chemikalien	155
8.3.2	Verwendete Utensilien	155
8.4	ISOLIERUNG DER GESAMT-RNA AUS TIERISCHEN ZELLEN	155
8.4.1	Stabilisierung der Proben-RNA	155
8.4.2	Aufarbeitung der stabilisierten Gewebeproben	156
8.4.3	Photometrische Bestimmung des RNA-Gehaltes	156
8.5	KONVENTIONELLE PCR	156
8.5.1	Recherche und Herstellung synthetischer Oligonucleotide	156
8.5.2	Protokoll der RT-PCR	157
8.5.3	DNA-Gelelektrophorese	157
8.5.4	PCR zur Vermehrung eines PCR-Produktes (Massen-PCR)	158
8.5.5	Aufreinigung eines PCR-Produktes	158
8.5.6	Gelextraktion von DNA	158
8.6	KLONIERUNG VON PLASMIDEN	159
8.6.1	Anfügen von Adenosin-Überhängen	159

8.6.2	Ligation	159
8.6.3	Transformationsprotokoll	159
8.6.4	Vermehrung der monoklonalen, plasmidtragenden Bakterien in kleinem Maßstab (Mini-Prep-Verfahren)	160
8.6.5	Prüfung auf das Vorhandensein des Inserts im Plasmid durch Restriktionsverdau	160
8.6.6	Vermehrung von Plasmiden im mittleren Maßstab (Midi-Prep-Verfahren)	161
8.6.7	Herstellung von LB-Agar und LB-Medium	161
8.7	QUANTITATIVE PCR	162
8.7.1	cDNA-Synthese	162
8.7.2	Protokoll der qPCR	163
8.7.3	Recherche und Herstellung synthetischer Oligonucleotide für die qPCR	163
8.8	WEITERE VERWENDETE UTENSILIEN UND GERÄTE	164
8.9	NATRIUMFLUXDATEN, LEITFÄHIGKEITSWERTE UND KURZ-SCHLUßSTROMWERTE	164
8.10	SEQUENZEN VERWENDETER PRIMER	166
8.11	C _T -WERTE REC, CO ₂	167
8.12	C _T -WERTE REC, IGF1	167
8.13	C _T -WERTE REC, EGF	167
8.14	C _T -WERTE REC, CYCLO-AMP	167
8.15	C _T -WERTE REC, PGE2	168
8.16	C _T -WERTE REC, BUTYRAT	168
8.17	C _T -WERTE REC, LAKTAT	168
8.18	C _T -WERTE PANSENEPITHELGEWEBE	168