

3. MATERIAL UND METHODEN:

3.1. Versuchstiere:

Bei den Tieren handelte es sich um institutseigene Schafe unterschiedlicher Herkunft, die nach erfolgter Aufstallung mindestens 3-8 Wochen unter kontrollierten Bedingungen am Institut für Veterinär-Physiologie gehalten und gefüttert worden sind.

Bei der Schlachtung waren die Schafe durchschnittlich 6 – 12 Monate alt und zwischen 30 – 50 kg schwer. Überwiegend handelte es sich um Tiere der Rasse Deutsches Milchschaaf.

Die Gruppe der mit Heu gefütterten Tiere erhielt Heu ad libitum (1,5 kg/Tier und Tag). Sie hatten jederzeit Zugang zu frischem Trinkwasser und Salzlecksteinen. Frisches Heu wurde immer um 7 und 15 Uhr aufgefüllt, so dass die Tiere gleichmäßig fressen konnten.

Die Gruppe der mit Kraftfutter gefütterten Tiere wurde nochmals in 6 Untergruppen eingeteilt. Diese Gruppen erhielten für zwei Tage, vier Tage bzw. für eine, zwei, vier und sechs Wochen zusätzlich zum Heu Kraftfutter (dies entspricht Kraftfutterfütterung; KF).

Tab. 4 Experimentelle Tiergruppen, die in dieser Arbeit verwendet wurden und die Anzahl der Tiere, die in die molekularbiologischen Versuche einbezogen wurden.
KF = Kraft Futter

Basis	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5	Gruppe 6
Heu	2 Tage KF	4 Tage KF	1 Wo. KF	2 Wo. KF	4 Wo. KF	6 Wo. KF
7 Tiere	3 Tiere	5 Tiere	6 Tiere	5 Tiere	5 Tiere	4 Tiere

Die Kraftfuttergabe erfolgte in definierter Menge (800 g Milch-Leistungsfutter (MLE) II pro Tag mit einem Energiegehalt von 6,7 NEL= ca. 10,41 MJ ME/kg Trockenmasse) in zwei gleichgroßen Portionen (7 Uhr und 15 Uhr). Allen Tiere stand zusätzlich 1 kg Heu/Tag zur Verfügung.

Evtl. vorhandene Reste wurden vor der nächsten Fütterung entfernt und zurückgewogen, so dass bei jedem Tier die genaue Futtermenge bekannt war. Alle Tiere hatten die gesamte Zeit freien Zugang zu Trinkwasser und Salzlecksteinen.

Ziel dieser Arbeit war es unter anderem festzustellen, ob die Umstellung von einem raufaserreichen-energiearmen Futter auf eine raufaserarme-energiereiche Diät einen Einfluss auf die Expression der untersuchten Transportproteine und Enzyme auf mRNA-Ebene hat.

3.2. Gewinnung der Epithelien:

Die Tiere wurden geschlachtet (d.h. Entbluten nach Betäubung) und direkt im Anschluss wurde die Bauchhöhle eröffnet. Die Vormägen wurden entnommen, der Blättermagen aufgesucht und im Ganzen abgetrennt. Die Eröffnung des Psalters erfolgte entlang der Psalterrinne, die größeren Psalterblätter wurden mit einer gebogenen Schere wandnah abgeschnitten und zuerst mit kalter Pufferlösung abgespült und so grob von Futterpartikeln gereinigt. Anschließend wurden die Epithelien in körperwarmer Pufferlösung weiter gespült bis die Lösung klar blieb. Die Separierung der Doppelschicht der einzelnen Blätter erfolgte stumpf, beginnend am proximalen Teil (ausgehend von der Seite, die am Ostium reticulomasicum positioniert war), so dass die serosale Seite freigelegt wurde.

Die so isolierten Epithelien wurden, um die Vitalität zu gewährleisten, für die Dauer des Transportes ins Labor in körperwarmer Pufferlösung (Transportpuffer; siehe Kap. 9.1) inkubiert und mit einem Gasgemisch von 95% O₂ und 5% CO₂ (Carbogen) durchperlt. Diese Begasung oxygenierte den Transportpuffer und sorgte zusammen mit dem im Puffer enthaltenem Bikarbonat auch für einen stabilen, physiologischen pH von 7,4.

Von der Schlachtung bis zum Einspannen der Epithelien in die Ussing-Kammern vergingen durchschnittlich 30 – 40 min.

Pro Versuchstag standen drei Ussing-Kammern mit dazugehörigen Titratoren zur Verfügung, so dass pro Tier und Versuchstag maximal drei Epithelien untersucht werden konnten.

Nach dem Einspannen wurden die Epithelien unter Standardbedingungen (Puffer 1 – 3; siehe Kap. 9.1) 10 – 15 Minuten inkubiert, um eine Äquilibration an die veränderten Verhältnisse zu erreichen. Erst dann wurde das Epithel kurzgeschlossen. Anschließend erfolgte nochmals eine Äquilibrationsphase von durchschnittlich 10 Minuten, bevor die Titratoren eingeschaltet wurden und die Bestimmung der HCO₃⁻-Transportraten begann.

Nach jeder Manipulation der Versuchsbedingungen (Pufferwechsel, Zugabe von Hemmstoffen o.ä.) wurde bei der Berechnung der Transportraten wieder eine weitere Äquilibrationszeit von 30 Minuten einbezogen, so dass sich die in Tab. 5 dargestellte Aufteilung der Versuchszeit ergibt. Dieser zeitliche Verlauf wurde in allen Versuchen beibehalten. Wenn aus versuchstechnischen Gründen dennoch davon abgewichen werden musste, wird dies explizit in der Beschreibung erwähnt.

Tab. 5 Schematische Darstellung des Versuchsablauf

Versuchszeitraum	Bezeichnung	Begründung
0 – 30 Minuten	Vorlauf 1	Zeit vom Beginn der Messung bis zum Erreichen des Steady State, meist charakterisiert durch überproportionale Transportraten. Bei der Berechnung nicht berücksichtigt.
31 – 90 Minuten	Flux 1	Messperiode 1, Kontrollbedingungen bei allen Epithelien, alle 60 Messwerte (1 Messwert/min) werden gemittelt.
90 Minuten	Behandlung	Je nach Versuchsansatz: Zugabe von Hemmstoff oder Pufferwechsel.
91 – 120 Minuten	Vorlauf 2	Zeit von der Behandlung bis zum erneuten Erreichen des Steady State, wird ebenfalls bei der Berechnung nicht mit einbezogen, meist gekennzeichnet durch einen mehr oder weniger starken Abfall der Transportraten bei den Versuchsepithelien.
121 – 180 Minuten	Flux 2	Messperiode 2, alle 60 Messwerte (1 Wert/min) werden gemittelt.
181 – 240 Minuten	Flux 3	Messperiode 3, alle 60 Messwerte (1 Wert/min) werden gemittelt.

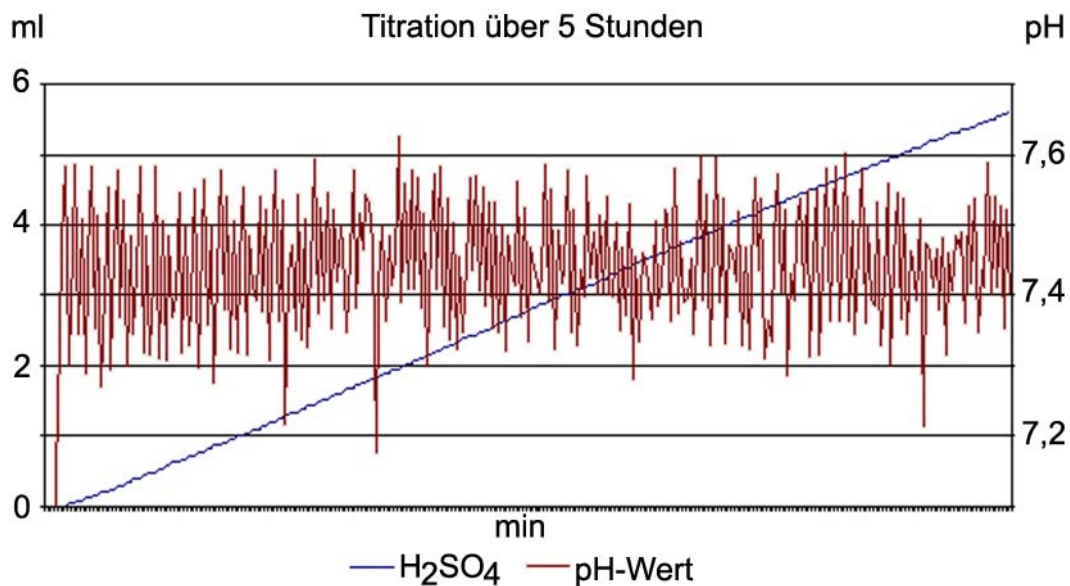


Abb. 2 Darstellung einer Titration über 5 Std. Es werden die Schwankungen des pH-Wertes (rechte Y-Achse) und die Summe der zugegebenen 0,01 molaren H_2SO_4 (linke Y-Achse) dargestellt. Vorgegeben war ein pH-Wert von $7,4 \pm 0,2$. Die Alkalisierung der serosalen Pufferlösung durch den HCO_3^- -Transport verursacht einen Anstieg des pH-Wertes, der durch die Zugabe der Säure kompensiert wird. Die Schwankungen des pH-Wertes ergeben sich durch das ungepufferte System, werden jedoch in den vorgegebenen Grenzen von etwa $\pm 0,2$ gehalten.

In der Abb. 2 werden die Rohdaten, wie sie vom Titrator (Titroline Alpha, Firma Schott) ermittelt wurden, graphisch kumulativ dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass der pH-Wert eine gewisse Streuung aufwies. Die Zugabe der Schwefelsäure erfolgte relativ gleichmäßig und nahm daher mit der Zeit nahezu linear zu. Daraus kann abgeleitet werden, dass der Transport ebenfalls sehr gleichmäßig erfolgte und auch bis zu fünf Stunden stabil ist.

3.3. Messmethode/ Prinzip:

Die Untersuchungen erfolgten mit einer modifizierten Ussing-Kammer-Technik. Dabei wurde die pH-Stat-Methode mit der Ussing-Kammer kombiniert.

3.3.1. Ussing-Kammer:

Bei der hier vorliegenden Untersuchung wurde das klassische Ussing-Kammer-Prinzip abgewandelt. Dies war notwendig, da es sich bei HCO_3^- um ein elektroneutral transportiertes Molekül handelt und es sich durch seine Eigenschaft, immer in einem Gleichgewicht mit dem flüchtigen CO_2 zu stehen, auch nicht mit der sonst angewandten Isotopentechnik untersuchen lässt.

Die Inkubation der Epithelien wurde gegenüber den konventionellen Ussing-Kammer-Bedingungen leicht modifiziert. Üblicherweise ist bei den klassischen Ussing-Kammer-Experimenten, wie sie Ussing und Zerahn (1951) beschrieben haben und die später von Ferreira und Stevens (Ferreira *et al.*, 1966; Stevens, 1964) modifiziert genutzt wurde, die Inkubationslösung auf beiden Seiten des Epithels in der Zusammensetzung der Ionen gleich. Von diesem Prinzip, das als Voraussetzung für Versuche angesehen werden muss, in denen insbesondere geprüft werden soll, ob aktive oder passive Transportmechanismen vorliegen, wurde in den vorliegenden Versuchen abgewichen.

Die Absicht des gewählten Versuchsansatzes war primär, den Transport von HCO_3^- unter den *in vivo* gegebenen Ionengradienten zu bestimmen. Die Ussing-Kammer-Bedingungen (Kurzschluss) dienten daher nur der Kontrolle des elektrischen Gradienten und der Bestimmung der üblichen elektrophysiologischen Parameter wie Kurzschlussstrom (I_{sc}), und Gewebeleitfähigkeit (G_T), die primär zur Vitalitäts-Kontrolle eingesetzt wurden.

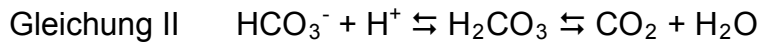
Eine weitere Besonderheit der gewählten Versuchsbedingungen bestand darin, dass auf der einen Seite des Epithels (meist serosal) eine ungepufferte Lösung vorgegeben wurde, um so den speziellen Bedürfnissen der pH-Stat-Methode gerecht zu werden.

Dies bedeutet, dass eine Seite des Epithels in der Ussing-Kammer mit einer gepufferten HCO_3^- -haltigen Pufferlösung gefüllt ist und mit Carbogen (5 oder 10% CO_2 und 95 oder 90% O_2) begast wird und die andere Seite eine HCO_3^- -freie, ungepufferte Elektrolytlösung enthält, und mit reinem Sauerstoff (100% O_2) begast wird.

3.3.2. pH-Stat:

Diese Methode ist in der oben beschriebenen Weise mit der Ussing-Kammer-Technik kombiniert worden. Damit ist eine Möglichkeit gegeben, den Transport von HCO_3^- , das sich der klassischen Messung mit radioaktiv markierten Elementen entzieht, direkt zu messen.

Bei der Messung mit Isotopen muss es eine feste, definierbare Bezugsgröße geben. Dies ist jedoch bei HCO_3^- , das immer in einem Gleichgewicht zwischen gasförmiger Phase und gelöster Phase steht, nicht gegeben:



Die pH-Stat-Messung wurde ursprünglich dafür eingesetzt, um z.B. die Pufferkapazität von Proben (Bodenproben, Blut, Abfallproben o.ä.) feststellen zu können.

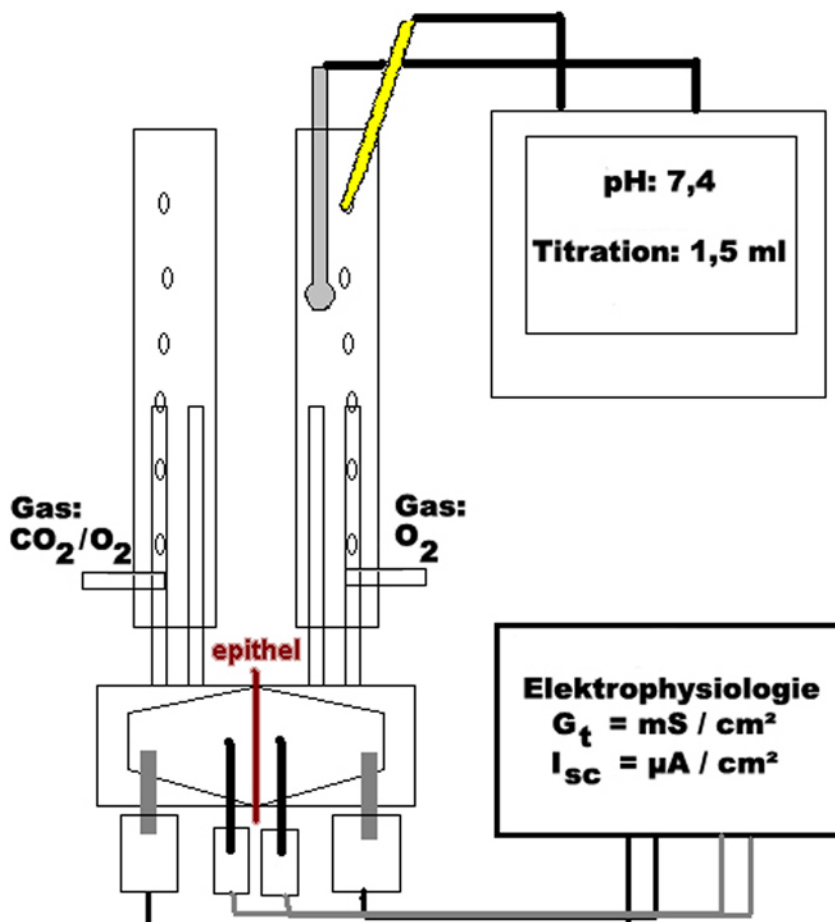


Abb. 3 In der Abbildung wird die pH-Stat-Methode dargestellt. Die pH-Elektrode ist in der Vorratssäule auf der ungepufferten Epithelseite eingehängt, ebenso die Bürette, über die die Säure zutitriert wird. Die Kammer wird zur Kontrolle der elektrophysiologischen Parameter (Ussing-Kammer-Methode) mit den üblichen KCl/Agargel-Elektroden betrieben.

Die pH-Stat-Methode ist dem Prinzip nach eine kontinuierliche pH-Wert-Messung mit angeschlossener vollautomatischer Titration. Dabei wird ein ungepuffertes System durch Zugabe einer Säure auf einem vorher eingestellten Niveau gehalten (bei dieser Untersuchung ist dies $\text{pH } 7,4 \pm 0,2$).

Die Titration erfolgt mit 0,01 molarer H_2SO_4 , der ansonsten die gleichen Elektrolyte zugesetzt sind, wie sie in der Kammer zu finden sind, damit sich die Osmolarität und Ionenzusammensetzung nicht während der Zeit der Titration verändert.

3.3.3. Berechnung der Transportraten:

Die Messung des pH-Wertes erfolgte kontinuierlich und wurde jede Minute automatisch gespeichert, so dass sich auch Transportraten für jede Minute errechnen ließen. Der Übersichtlichkeit halber und damit vorhergehende überproportional hohe Transporte die Messung nicht verfälschen, werden jedoch die Werte in den vorher bestimmten Zeiträumen auf Null gesetzt, und nur der aktuell betrachtete Zeitraum wird zusammengefasst und ein Mittelwert mit Standardfehler daraus gebildet (siehe Tab. 5).

Wenn im Folgenden von Fluxperiode gesprochen wird, so ist der Mittelwert aller Messungen (Minutenwerte) eines bestimmten Zeitraumes gemeint. Die Zeiträume entsprechen den in Tab. 5 definierten Fluxperioden.

3.4. Inkubationstechnik:

Bei der Inkubation der Epithelien während des Versuchs wurde die oben beschriebene Modifikation der klassischen Ussing-Kammer-Methode verwendet. Dabei wurden unterschiedliche Konzentrationen für Cl^- und HCO_3^- vorgegeben, um so den Einfluss der passiven chemischen Triebkräfte für den Transport von HCO_3^- messen zu können.

Unter Standardbedingungen wurde daher für HCO_3^- ein Gradient von mukosal nach serosal und für Cl^- ein Gradient von serosal nach mukosal etabliert. Auf mögliche Ausnahmen wird entsprechend hingewiesen.

Da die pH-Stat-Methode in einem gepufferten System nicht anwendbar ist, müssen die Ionenverhältnisse auf der Epithelseite, auf der die Messung stattfindet, so gewählt werden, dass keine Artefakte durch andere, puffernde oder den pH-Wert beeinflussende Zusätze entstehen.

Wie bei der klassischen Ussing-Kammer wird jedoch auch hier das Epithel kurzgeschlossen, d.h. es wird ein Strom eingespeist, der die sich infolge des elektrogenen Ionentransports natürlich aufbauende transepitheliale Potentialdifferenz (PDt) des Epithel kompensiert, so dass es zu einer Aufhebung der PDt kommt. Damit werden die elektrischen Triebkräfte für

den Ionentransport aufgehoben und man kann sicher sein, dass alle gemessenen Effekte allein auf die chemischen Gradienten oder auf aktiven Transport zurückzuführen sind.

3.5. Grundlagen der Berechnung der Transportraten:

Bei der Berechnung der Transportraten wird vorausgesetzt, dass in einem ungepufferten System jeder Transport von Bikarbonat zu einer Alkalisierung des Systems führt. Dieser pH-Anstieg kann mit einer üblichen pH-Elektrode gemessen werden, um so die entsprechende Menge an Säure zugeben zu können. Als Kontrolle wird wieder der pH-Wert genutzt, der so ständig in einem definierten Bereich gehalten wird (Titrationsbereich).

Grundlage dabei ist die Henderson-Hasselbalch-Gleichung:

$$\text{Gleichung III} \quad \text{pH} = \text{pK} + \log \left(\frac{c[\text{Base}]}{c[\text{Säure}]} \right)$$

$c[]$ = Konzentration des in Klammern angebenen Stoffes

Hierbei fungiert das CO_2 als Säure und das HCO_3^- als Base. Dies bedeutet, dass die zugegebene Menge an Schwefelsäure bei dem eingestellten pH-Wert von $7,4 \pm 0,2$ direkt proportional ist zu der transportierten Menge an Bikarbonat (Formel siehe Kap. 9.5).

3.6. Chemikalien/Transportpuffer:

Die Inkubationslösungen wurden wenige Tage vor dem Versuch mit Chemikalien der Firmen Merck® und Carl Roth® hergestellt. Die Osmolarität wurde mit einem Osmomat 030-D® der Firma gonotec® überprüft und - sofern nötig - auf $300 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ mit Mannit korrigiert. Anschließend wurden bedarfsgerechte Portionen (250ml) bei -18°C eingefroren.

Am Tag vor dem Versuch wurden die jeweils benötigten Mengen aufgetaut. Kurz vor dem Versuch wurde die ungepufferte Elektrolytlösung bei 37°C und O_2 Begasung auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Die Zusammensetzung des Standard-(Bikarbonat)-Puffers bedingt, dass sich unter Begasung mit Carbogen ein pH-Wert von 7,4 einstellt. Dies wurde stichprobenweise mit einer pH-Sonde kontrolliert.

Die Zusammensetzungen der einzelnen Puffer werden im Anhang (Kap. 9.1) aufgeführt.

3.7. Statistik:

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistik Programm SPSS 12.0 (Brosius, 2002). Zur zusammenfassenden quantitativen Beschreibung der Ergebnisse in den einzelnen Versuchen werden arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler (= S.E.M. = standard error of mean) angegeben und graphisch dargestellt. Die Lage und der Verlauf der Einzelergebnisse werden durch Streudiagramme graphisch veranschaulicht. Gemittelt wurde jeweils über die Epithelien aller Tiere, die einer bestimmten Bedingung ausgesetzt waren. Die Bezeichnung "N" steht hierbei für die Anzahl der Versuchstiere und "n" für die Anzahl der untersuchten Gewebe.

Da sich in Vorversuchen gezeigt hatte, dass die Transportraten teilweise starke individuelle Streuungen aufweisen und so eine Analyse erschwert wird, andererseits die Werte über die Zeit einen relativ stabilen und vor allem gleichmäßigen Abfall erfahren, werden bei fast allen Versuchen für die weitere statistische Auswertung sowohl die absoluten Transportraten direkt miteinander in Bezug gesetzt als auch die Differenzen der Transportraten der Fluxe 2 und 3 mit der des Flux 1. Die Differenzen sowie der prozentuale Anteil der Fluxe 2 und 3 an Flux 1, die immer als Basis (bzw. Nullwert) dient, wurden als Mittelwerte mit Standardfehler in Tabellenform angegeben. Dieses Vorgehen berücksichtigt die Schwankungen der einzelnen Epithelien und ermöglicht den Vergleich miteinander, ohne dass eventuelle Behandlungseffekte von den starken Größenunterschieden der absoluten Transportraten verdeckt werden. Auch die zeitliche Komponente ließ sich so auf einfache Weise mit in die Berechnung einbeziehen.

Die Differenzen von Flux 2 bzw. 3 zu Flux 1 werden varianzanalytisch unter der Annahme ausgewertet, dass die Messungen unter gleichen Bedingungen annähernd normal verteilt sind und keine wesentlichen Streuungsunterschiede über die verschiedenen Bedingungen und Tiere hinweg zeigen. Mit diesem Vorgehen ließen sich die im Mittel vorgefundenen Tier- und Gruppenunterschiede mit Hilfe univarianter Varianzanalysen charakterisieren.

Von einem erkennbaren (signifikanten) Effekt wurde ausgegangen, wenn die Abweichungen des Gruppeneinflusses so weit über die jeweilige Bezugsstreuung (Reststreuung oder zufälliger Effekt der Wechselwirkung) hinausgingen, dass die Wahrscheinlichkeit für ein rein zufällig bedingtes Überschreiten kleiner als 5% ist (das heißt Überschreitungswahrscheinlichkeit $p < 0.05$) (Arndt *et al.*, 1999).

Zur Klärung, ob die für die Varianzanalysen getroffene Annahme gleicher Varianzen verlässlich ist, wurde ein Test der Varianzhomogenität nach LEVENE durchgeführt. Die Hypothese gleicher Varianzen bei den Epithelien der Tiere unter den verschiedenen

Bedingungen ist dabei abzulehnen, wenn die Überschreitungswahrscheinlichkeit p kleiner als ein vorzugebendes Niveau ist. Hier wurde ein Grenzwert von 0.01 gewählt.

Wenn sich Varianzunterschiede zeigen (dies ist bei den Ergebnissen vermerkt), ist dies ein weiterer Hinweis (neben der graphischen Darstellung der Einzelergebnisse und der beschreibenden Statistik), dass die Streuungsverhältnisse bei den Tieren und Bedingungen inhomogen sind. Das Ergebnis der Varianzanalyse ist dann mit Vorsicht zu interpretieren.

Eine Übersicht, wie viele Tiere und Epithelien jeweils unter verschiedenen Bedingungen untersucht wurden, ist im Anhang zu finden, ebenso wie die tabellarische Darstellung der statistischen Auswertungsergebnisse.

Tab. 6 In der Tabelle wird ausgeführt, bei welcher Irrtumswahrscheinlichkeit die Begriffe nicht signifikant, signifikant und hochsignifikant in dieser Arbeit gebraucht werden.

Bezeichnung	Irrtumswahrscheinlichkeit	Markierung
Nicht signifikant	$P > 0,10$	
Gerade nicht mehr signifikant	$P < 0,10$ und $> 0,05$	
Signifikant	$P \leq 0,05$	*
Hochsignifikant	$P \leq 0,01$	**

3.8. Allgemeiner Versuchsaufbau und Auswertung der Ussing-Kammer - Versuche:

3.8.1. Hemmstoffzugabe:

Bei diesen Versuchen wurden pro Hemmstoff durchschnittlich vier Tiere mit je drei Epithelien untersucht, dabei wurde jeweils mindestens ein Epithel über alle drei Fluxperioden den Kontrollbedingungen ausgesetzt und bei mindestens einem Epithel wurde nach der ersten Fluxperiode der Hemmstoff zugesetzt und somit „behandelt“. Das dritte zur Verfügung stehende Epithel wurde pro Versuchstag jeweils abwechselnd entweder als Kontrolle verwendet oder der Versuchsgruppe (Behandlung) zugeordnet.

Hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Messergebnisse lassen sich daher die Faktoren Behandlungsgruppe (Kontrolle und Hemmstoffzugabe) mit systematischen Effekten sowie der Faktor Tier mit zufälligen Effekten bewerten.

Der Faktor Zeit wird durch die Bildung von Differenzen von Flux 1 zu Flux 2 und 3 mit einbezogen.

Das für die Auswertung unterstellte Varianzanalysemodell berücksichtigt folgende Effekte:

Differenz zwischen Flux 1 und Flux 2 oder Flux 3 = Tier + Gruppe + Tier · Gruppe

Dabei kennzeichnet:

Tier den zufälligen Effekt des Faktors Tier.

Gruppe einen systematischen Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen.

Tier - Gruppe den zufälligen Effekt einer Wechselwirkung zwischen Tier und Behandlungsgruppe, das hieße in diesem Fall, dass die Tiere unterschiedlich auf die Hemmstoffzugabe reagieren.

Von einem signifikanten Effekt wird gesprochen, wenn die Überschreitungswahrscheinlichkeit, dass sich die Gruppen unterscheiden, kleiner als $p = 0,05$ ist. Die Wechselwirkungen zwischen Tier und Gruppe sollten dabei nicht größer sein als der Gruppeneffekt.

3.8.2. Variationen in der Konzentration verschiedener Elektrolyte:

Bei diesen Versuchen wird die Wirkung verschiedener Ionengradienten auf den Bikarbonat-Transport geprüft.

Dabei wurden pro Gradient durchschnittlich vier Tiere mit je drei Epithelien untersucht. Es wurde wiederum jeweils mindestens ein Epithel über alle drei Fluxperioden den Kontrollbedingungen ausgesetzt und mindestens ein Epithel als Versuchsepithel gehandhabt. Das dritte wurde bei jedem zweiten Versuchstier alternierend zur Kontrolle oder zum Versuchsepithel.

Bei den Versuchsepithelien wurde nach der ersten Fluxperiode mit Standardpuffer ein Wechsel auf einen Puffer mit der neuen Konzentration des zu untersuchenden Elektrolyts durchgeführt. Bei den Kontrollepithelien wurde zur gleichen Zeit ein „Pufferwechsel“ simuliert, indem der Standardpuffer gegen frischen Standardpuffer ausgetauscht wurde. So wurde sichergestellt, dass die beobachteten Effekte wirklich durch die neue Konzentration des Elektrolyts und nicht durch Veränderungen infolge des Pufferwechsel entstanden waren. Die statistische Analyse erfolgt in gleicher Weise wie sie im Kapitel „Hemmstoffe“ bereits beschrieben worden ist.

Sofern es die neue Konzentration des zu untersuchenden Ions erforderte (bei Veränderung der Bikarbonatkonzentration), wurde gleichzeitig mit dem Pufferwechsel ein Wechsel der Begasung durchgeführt, um weiterhin nach der Henderson-Hasselbalch-Gleichung im Gleichgewicht zu sein und den pH-Wert nicht zu verändern.

Die statistische Analyse erfolgte in gleicher Weise wie sie im Kapitel 3.8.1 bereits beschrieben worden ist.

3.8.3. Umkehrung der Gradientenrichtungen:

Bei diesem Versuchsansatz wurden sechs Gruppen gebildet. Bei zwei mit Heu gefütterten Gruppen wurde eine Gruppe mit $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ HCO}_3^-$ mukosal und die andere mit $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ HCO}_3^-$ mukosal inkubiert. Die restlichen vier Gruppen wurden zwei, vier, acht Tage oder zwei bzw. mehr als drei Wochen mit Krafffutter gefüttert und alle mit $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ HCO}_3^-$ mukosal inkubiert.

Wie bei allen Versuchen wurde mindestens jeweils ein Epithel den Kontrollbedingungen [mukosal HCO_3^- , serosal kein HCO_3^- (Puffer 2 und 3)] und ein Epithel den Versuchsbedingungen [serosal HCO_3^- , mukosal HCO_3^- -frei (ebenfalls Puffer 2 und 3, jedoch jeweils auf der entgegengesetzten Seite)] ausgesetzt. Das dritte zur Verfügung stehende Epithel war wiederum abwechselnd Kontroll- oder Versuchsepithel.

Da sich in den Vorversuchen gezeigt hatte, dass ein Wechsel der Puffer nach der ersten Fluxperiode eine zu große Störung verursacht und die Epithelien danach eine zu lange Erholungsphase zur erneuten Äquibrierung benötigen, wurde hier von dem üblichen Versuchsansatz, wie er in Kap. 3.3.3. beschrieben wurde, abgewichen.

Die Versuchsepithelien wurden von Beginn an den Versuchsbedingungen ausgesetzt.

Daher kann keine sinnvolle Differenz zwischen Flux1 und den Fluxen 2 & 3 gebildet werden, so dass hier vorwiegend beschreibend ausgewertet wurde. Es wurden die Mittelwerte mit Standardfehler ermittelt und die Fluxperioden jeweils getrennt analysiert. Es wurde der Prozentsatz der unphysiologischen Transportrichtung (J_{sm} ; Sekretion) an der physiologischen Transportrichtung (J_{ms} ; Resorption) ermittelt und zusätzlich wurden die absoluten Transportraten varianzanalytisch ausgewertet. In Liniendiagrammen wurde der Verlauf der Transportraten über die steigende KF-Gabe graphisch veranschaulicht.

Auch wenn der Transport in umgekehrter Richtung (von serosal nach mukosal) erfolgte, kann nicht von einem „echten“ (im Sinne der klassischen Ussing-Kammer-Versuche) J_{sm} -Transport gesprochen werden. Und daher auch kein „netto“ Transport angegeben werden.

Das Analysemodell wurde folgendermaßen angepasst:

Jede Fluxperiode und jede Fütterungsgruppe wurde einzeln analysiert.

Hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Messergebnisse lassen sich wiederum die Faktoren Behandlungsfolge (Kontrolle und Umkehr der Gradienten) mit systematischen Effekten, sowie der Faktor Tier mit zufälligen Effekten bewerten. Der zeitliche Faktor ist dadurch berücksichtigt, dass jede Fluxperiode einzeln analysiert und varianzanalytisch betrachtet worden ist.

Das für die Auswertung unterstellte Varianzanalysemodell berücksichtigt folgende Effekte:

Messwert = Tier + Gruppe + Tier · Gruppe

Dabei kennzeichnet:

Tier den zufälligen Effekt des Faktors Tier.

Gruppe einen systematischen Unterschied zwischen den beiden Behandlungsfolgen für jede Fluxperiode getrennt.

Tier · Gruppe den zufälligen Effekt einer Wechselwirkung zwischen Tier und Behandlungsgruppe, das hieße in diesem Fall, dass die Tiere unterschiedlich auf die Umkehrung des Gradienten reagieren.

Von signifikantem Effekt wird gesprochen, wenn die Überschreitungswahrscheinlichkeit der Gruppenunterschiede kleiner als $p = 0,05$ ist.

3.8.4. Zusammenfassende Auswertung der unterschiedlichen Gradienten- und Fütterungsgruppen:

Hierfür werden alle mit Standardpuffer (Puffer Nr.: 1-3, siehe Kap. 9.1) inkubierten Epithelien, die als Kontrollepithel keiner sonstigen Behandlung ausgesetzt worden sind, zusammengefasst, um eine größere Anzahl an Epithelien betrachten zu können.

Es wurden folgende Gruppen gebildet:

- ◇ Vergleich der Epithelien von mit Heu gefütterten Tieren. Die Inkubation erfolgte mit $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ HCO}_3^-$ und mit $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ HCO}_3^-$ (Puffer 1+3 mukosal; Puffer 2 Serosal).
- ◇ Vergleich der Epithelien von mit Heu gefütterten Tieren gegen mit KF gefütterte Tieren. Die Inkubation erfolgte jeweils mit $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ HCO}_3^-$ (Puffer 3 mukosal und Puffer 2 serosal).

Zur statistischen Auswertung wurde ein ungepaarter T-Test mit den absoluten Transportraten durchgeführt, um den Einfluss der Fütterung bzw. des HCO_3^- -Gradienten zu testen. Auch hier wurde eine Überschreitungswahrscheinlichkeit von $< 5 \%$ als signifikant bezeichnet.

3.9. Molekularbiologische Untersuchungen:

3.9.1. Übersicht

Das Ziel der molekularbiologischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit bestand in der Quantifizierung von Boten-RNA (messenger RNA, mRNA) bestimmter Gene in biologischen Proben (Psaltergewebe), um Informationen über die transkriptionelle Regulation (Genregulation) der betreffenden Gene in diesen Proben zu erhalten (Genexpressionsprofil, gene expression profile). Um zu ermitteln, ob und in welcher relativen Menge die mRNA eines Gens in den Proben vorhanden ist, musste zunächst eine Isolierung der RNA aus den Proben erfolgen (siehe Kap. 3.9.2). Anschließend war eine reverse Transkription der RNA (RT, siehe Kap. 3.9.3) in copy DNA (cDNA) erforderlich. Die cDNA wurde in der Folge durch quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) qualitativ und quantitativ nachgewiesen. Die Kombination aus reverser Transkription und Polymerasekettenreaktion wird als RT-PCR bezeichnet. Für die PCR sind synthetisch hergestellte Oligonukleotide (Primer, siehe Kap.3.9.5.4) notwendig, welche für das zu untersuchende Gen (gene of interest, GOI) spezifisch sind. Die Quantifizierung der mRNA des zu untersuchenden Gens durch qRT-PCR erfolgte unter Einbezug eines Referenzgens (siehe Kap. 3.9.5.2) das dazu dient zu bestimmen ob die Varianz durch eine veränderte Expression entsteht oder nicht. Das Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchungen war die Erkenntnis, ob mRNA eines bestimmten Gens in einer Probengruppe, im Vergleich zu einer anderen Probengruppe, vermehrt oder vermindert enthalten ist.

3.9.2. RNA-Isolierung und RNA-Qualitätskontrolle

3.9.2.1. Stabilisierung der Proben-RNA

Zur Vermeidung von RNA-Abbau wurden die Psalterepithel-Proben sofort nach der Gewinnung stabilisiert. Dazu wurde jede Probe (ein ca. 0,5 x 1 cm großes Epithelstück) im zehnfachen Volumen (10 ml / g) RNA-Stabilisationsmedium (RNA-Later, Fa. Qiagen) aufgenommen und schnellstmöglich (innerhalb von maximal 24 Stunden) bei – 20 °C eingelagert. Diese Behandlung gewährleistet die Stabilität der enthaltenen RNA über einen unbegrenzten Zeitraum (Mutter *et al.*, 2004).

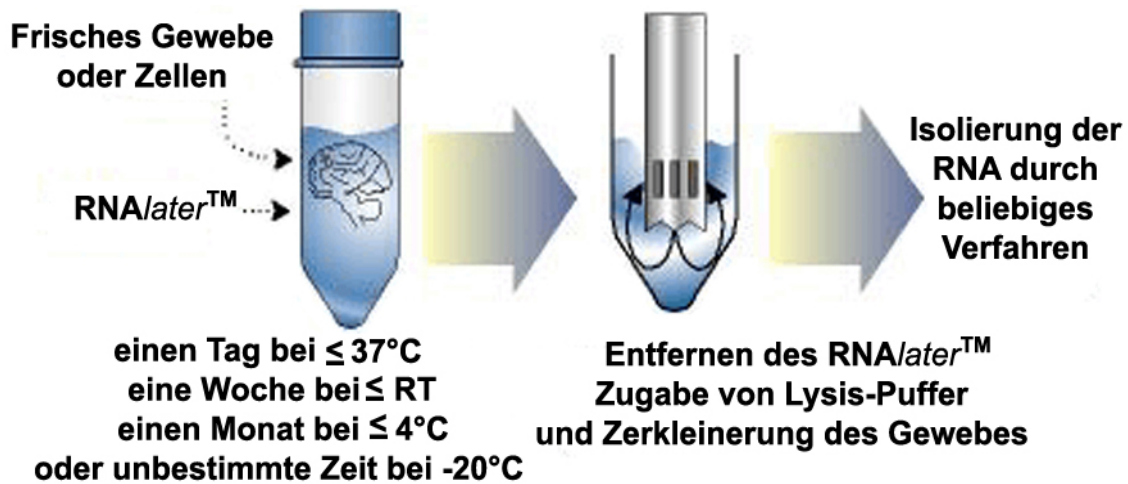


Abb. 4 Die Abbildung zeigt schematisch den Ablauf der Gewebekonservierung mit RNAlater®. Quelle: <http://www.ambion.com/>.

3.9.2.2. Isolierung der Gesamt-RNA aus stabilisierten Proben

Aus den eingelagerten, stabilisierten Proben wurde die Gesamt-RNA mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Systems (Nucleospin RNA II Kit, Fa. Macherey & Nagel) isoliert. Dazu wurden die bei -20°C gelagerten Proben aufgetaut und durch Skalpellenschnitte zerkleinert. Jeweils 100 mg der zerkleinerten Proben wurden in 700 μl Lysispuffer (RA1-Puffer) mit 7 μl β -Merkaptoethanol (Fa. Roth) aufgenommen und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Probengefäße mit jeweils 2 Stahlkugeln (Durchmesser 5 mm; Fa. Qiagen) beschickt und durch dreimaliges Rütteln in einem Rüttelgerät (Retschmühle, Fa. Retsch) für 120 Sekunden bei einer Frequenz von 20 Rüttelvorgängen pro Sekunde mechanisch zerkleinert. Zwischen den Rüttelschritten wurden die Proben jeweils 15 Minuten auf Eis inkubiert. Durch die Kombination aus mechanischer Zerkleinerung und Lysis der Zellen durch den Lysispuffer wurde die RNA in Lösung gebracht. Nach Zentrifugation zur Sedimentation der Zellreste (10 Sekunden bei 5000 g) wurde 700 μl des Überstands in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 700 μl Phenol-Chloroform (Fa. Roth) überschichtet, gründlich gemischt (Vortex Genie, Fa. Roth) und für 10 Minuten bei 4°C und 14000 g zentrifugiert. Die Nukleinsäuren wurden durch diesen Arbeitsschritt in die obere, wässrige Phase extrahiert, während Proteine und Lipide in den unteren, organischen Phasen gesammelt wurden. 500 μl der oberen wässrigen Phase wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 200 μl Lysispuffer auf 700 μl aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben durch eine poröse Säule (Nucleospin filter column) filtriert und mit 700 μl Ethanol (Fa. Roth) überschichtet. In dieser Form wurde die RNA an die in der Säule enthaltenen Silicamembran gebunden (Nucleospin RNA II column) und mit 700 μl Entsalzungspuffer (MDB Buffer) entsalzen. Genomische DNA (gDNA), welche in der RNA-Präparation als Kontamination enthalten sein kann, wurde durch 15-minütige

Inkubation der Membran mit 95 µl DNase-Lösung (DNase I reaction mixture) hydrolysiert. Nach mehreren Waschschriften und Trocknen der Säule durch Zentrifugation (5 Minuten bei 14000 g) wurde die RNA in 50 µl RNase-freiem Wasser aus der Säule eluiert. Als Endprodukt des Verfahrens stand gereinigte RNA in wässriger Lösung zu Verfügung.

3.9.2.3. Bestimmung der RNA-Konzentration

Nach jeder RNA-Isolierung (siehe Kap. 3.9.2.2) wurde die Konzentration der Probe in einem Spektralphotometer (BioPhotometer, Fa. Eppendorf) bestimmt, wobei 1 OD₂₆₀ 40 µg/ml RNA entspricht. Entsprechend dem Ergebnis wurden die Proben anschließend auf 100 ng/µl verdünnt und bis zur Weiterverarbeitung (RIN-Bestimmung, cDNA-Synthese, One-Step RT-PCR und No RT-Control) bei -70 °C gelagert.

Bei der photometrischen Messung wurde auch eine grobe Klassifizierung der Probenreinheit durch Prüfung der Extinktionsverhältnisse bei verschiedenen Wellenlängen vorgenommen: OD-Verhältnisse von 260 : 280 \geq 1,8 in Wasser (ungepuffert) und 260 : 230 $>$ 1,8 wurden als überwiegend Nukleinsäure-haltige Lösungen (proteinfrei und lösungsmittelfrei) interpretiert. Jede RNA erhielt eine fortlaufende Nummer, die mit den zugehörigen Informationen (Datum Probennahme, Datum RNA-Isolierung, Name Präparator, Spezies, Behandlung des Gewebes bzw. Versuchsablauf, Probenkennzeichnung, Menge in µl, RIN) in eine für alle Labornutzer verfügbare Datenbank eingegeben wurde.

3.9.2.4. Bestimmung der RNA-Integrität

Da RNA labil gegen den Abbau durch RNAsen ist, wurde die RNA-Integrität durch miniaturisierte Kapillarelektrophorese (Lab-on-a-chip-Verfahren) mit einem kommerziell erhältlichen System (RNA 6000 Nano Kit, Fa. Agilent) nach Angaben des Herstellers in einem entsprechenden Gerät (Bioanalyzer 2100, Fa. Agilent) untersucht. Bei diesem Verfahren wird die RNA der Probe elektrophoretisch aufgetrennt und fluorometrisch detektiert. Anhand des entstehenden Elektropherogramms wird durch die Geräte-Software (Agilent Expert 2100, Fa. Agilent) ein Maß für die RNA-Integrität (RNA integrity number, RIN) berechnet. Die RIN kann zwischen 0 und 10 liegen, wobei die RNA-Integrität umso größer ist, je höher die RIN ist. Die RINs der eingesetzten Proben sind im Anhang (Kap.: 9.3) gegeben. Basierend auf Empfehlungen der Literatur wurden Proben mit einer RIN $<$ 5 aus den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen (Schroeder *et al.*, 2006).

3.9.3. Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Vor der PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion; siehe Kap.3.9.4) musste die isolierte Proben-RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden (Reverse Transkription, RT, cDNA Synthese). Für diesen Arbeitsschritt wurde ein kommerziell erhältliches System (iScript cDNA synthesis kit, Fa. Biorad) verwendet, welches Random-Hexamer-Nukleotide und Oligo-dT-Nukleotide als Startpunkte für die Reverse Transkription beinhaltet. So wurden rRNA, tRNA und mRNA revers transkribiert. In der vorliegenden Arbeit wurden pro Probe 100 ng Gesamt-RNA für die cDNA Synthese verwendet.

Tab. 7 Reaktionsansatz cDNA-Synthese

Substanz	Menge (µl)
iScript Reaktions-Mix	4
iScript Reverse Transcriptase	1
Nuclease-freies Wasser	14
RNA – Probe (100ng/µl)	1
Summe	20

In einem zyklisch programmierbaren Thermoblock (Thermocycler; Techne cyclone 25, Fa. PeqLab) wurde die reverse Transkription nach 5 Minuten Vorinkubation bei 25 °C durch anschließende 30-minütige Inkubation bei 42 °C vorgenommen. Nach der reversen Transkription wurde die RNA-abhängige DNA-Polymerase durch 5-minütige Inkubation bei 85 °C inaktiviert. Anschließend wurde die cDNA mit 180 µl Wasser auf 200 µl Endvolumen verdünnt und bei -20 °C gelagert. Die qualitative (enthaltenen Sequenzen) und quantitative (Kopienzahl) Zusammensetzung der cDNA spiegelt die entsprechende Zusammensetzung der eingesetzten RNA-Probe wider (Ginzinger, 2002). Die cDNA erhielt die gleiche Nummer wie die Mutter-RNA und wurde in vergleichbarer Art und Weise in die Datenbank eingespeist, wobei der Zusatz Punkt-Zahl sie als cDNA kennzeichnete und die Zahl für den Synthesedurchgang stand (cDNA-Proben im Anhang sind entsprechend bezeichnet).

3.9.4. Qualitativer Nachweis der „Genes of interest“ (GOIs):

In vielen Fällen ist in der Literatur keine Angabe zu finden, ob ein bestimmtes Gen in einem definierten Gewebe einer bestimmten Spezies transkribiert wird. Zum Nachweis der gesuchten GOIs im Psalter des Schafes wurden die Targets zunächst in einer längeren Sequenz mittels konventioneller PCR (kPCR) untersucht.

3.9.4.1. kPCR (One-Step RT-PCR)

Die kPCR wird ebenso wie die qPCR (quantitative PCR) für die Amplifizierung spezifischer DNA-Stücke verwendet. Synthetisch hergestellte Oligonukleotide (Primer siehe Tab. 10) binden an den zu amplifizierenden Einzelstrang (Template) und dienen einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase als Startpunkt. Die DNA-Polymerase synthetisiert dann den komplementären Strang zur Template-DNA. Wiederholte Zyklen von Primeranlagerung (Annealing), Neustrangsynthese (Elongation) und Trennung des Doppelstrangs in Einzelstränge (Denaturierung) führen zu einer exponentiellen Vermehrung des von den Primern flankierten Bereichs der Template-DNA. Als Endprodukt wird in vielfacher Kopie doppelsträngige lineare DNA spezifischer Sequenz gebildet, deren Länge in der DNA-Gelelektrophorese beurteilt werden kann.

Bei der One-Step RT-PCR wird in einem Ansatz reverse Transkription und kPCR durchgeführt. Die Reverse Transkriptase (Reverse-iT™ One-Step RT-PCR-Kit, Fa. Abgene) synthetisiert zunächst die cDNA bei 47 °C, danach erfolgt eine Temperaturerhöhung auf 94 °C, bei der die Reverse Transkriptase inaktiviert und gleichzeitig die DNA-Polymerase aktiviert wird.

Tab. 8 Reaktionsansatz Protokoll der One-Step RT-PCR

Zyklusanzahl	Bezeichnung	Programm
1 Zyklus	cDNA-Synthese	30 min bei 47°C
1 Zyklus	RT-Inaktivierung, DNA-Polymerase-Aktivierung und initiale Denaturierung	1 min 94°C
35 Zyklen	Denaturierung Annealing Elongation	20 sek 94°C 30 sek (meist 55°C) 1 min 72°C
1 Zyklus	Finale Elongation	5 min mit 72°C

Tab. 9 Protokoll Reaktionsansatz der zur One-Step RT-PCR.

Substanz	Menge (µl)
Reverse-iT-Mix	12,5
Reverse-iT RTase Blend	0,5
Sense Primer	1
Antisense Primer	1
Nuclease-freies Wasser	9
RNA – Probe (100ng/µl)	1
Summe	25

Das Endprodukt wird mittels Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und die Länge der Amplifikate (entsprechend der gewählten Primer, siehe Tab. 10) gegen einen Größenstandard verglichen (siehe Kap.: 3.9.6.1).

Als Annealing-Temperatur wurde für die kPCR zunächst eine Temperatur 4-5°C unter der von Primer3 (Internet-Freeware zum Primerdesign) angegebenen Schmelztemperatur (T_m), also zumeist 55°C, angenommen. Nur in den Fällen, in denen kein Amplifikat mit der erwarteten Länge oder mehr als ein Amplifikat bei der Gelelektrophorese detektiert wurde, wurde die Annealing-Temperatur variiert. Die kPCR diente lediglich dem qualitativen Nachweis der GOIs.

Tab. 10 Primer, die für die kPCR verwendet wurden; cds = Coding Sequence (Kodierende Sequenz)

Target	T_m in C°	Start und Ende in der cds	Sense Primer 5'-3'	erwartete Produktlänge	Quelle der cds
			Antisense Primer 5'-3'		
AE2	59,96	2442-2459	cct ggt ccg ctt cgt tct	758	gi:76616144
	59,90	3184 - 3200	gtc act cac gcc aac gc		
CA 1	60,07	4 - 23	gca agt cct gac tgg gga ta	615	gi:57526335
	59,98	599 - 618	ctc acc ctc ctc ttc acg ag		
CA 2	60,52	38 - 58	ccg aac act ggc ata agg ac	430	gi:31340697
	59,99	445 - 467	gtg atg ctg cta acc cag ccc t		
CFTR	59,96	2483 - 2502	cga cat cca cac gaa aaa tg	676	gi:57526398
	59,97	3140 - 3158	tgg tct ccg ttt tac aac c		
DRA	59,89	7 - 27	gag ccc att ggg aat cag ta	322	gi:76615149
	59,73	310 - 329	tac ggg cta tat gca gcc tt		

3.9.5. Quantitative PCR

3.9.5.1. Überblick

Für die Erstellung von Genexpressionsprofilen wird die Kopienzahl der gesuchten mRNA-Sequenz relativ quantifiziert. Dies erfolgte in der vorliegenden Arbeit durch reverse Transkription und anschließende quantitative PCR.

Die quantitative oder „real-time“ PCR (qPCR) repräsentiert eine spezifische und sensitive Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren (Bustin, 2000). Im Gegensatz zur Endprodukt-PCR (konventionelle PCR, kPCR), bei der PCR-Produkte erst nach Beendigung aller Amplifikationszyklen durch Gelelektrophorese (siehe Kap. 3.9.6.1) nachgewiesen werden, ermöglicht es die qPCR, bei welcher nach jedem Amplifikationszyklus (siehe Kap. 3.9.5.6) der Gehalt an doppelsträngiger DNA (dsDNA) gemessen wird, Aussagen über die Kopienzahl einer bestimmten DNA-Sequenz in der Probe zu treffen (Higuchi *et al.*, 1993). Bei der qPCR wird ein Thermocycler (iQCycler, Fa. Biorad) eingesetzt, der eine Vorrichtung zur Messung der Fluoreszenz eines Farbstoffs enthält (Bustin, 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde das Fluorophor SybrGreen eingesetzt (Bustin, 2000). Dieser Cyanin-Farbstoff bindet ausschließlich an doppelsträngige (ds) DNA und fluoresziert im gebundenen Zustand nach Anregung mit Licht. Durch Messung der Fluoreszenzintensität während jedem PCR-Zyklus konnte jeweils die Menge an PCR-Produkten bestimmt werden. Nach Beendigung des gesamten qPCR-Experiments ergibt die Aneinanderreihung der einzelnen photometrischen Fluoreszenzwerte durch die angeschlossene Geräte-Software (iCycler iQ Optical System Software (Version 3.1), Fa. BioRad) eine Amplifikationskurve, die typischerweise einen sigmoiden Verlauf zeigt. Während der ersten Amplifikationszyklen sind der Gehalt an PCR-Produkten und damit die resultierende Fluoreszenz noch unterhalb der Nachweisgrenze, weshalb die Amplifikationskurve in diesem Abschnitt eine Steigung von null besitzt (Basislinie, baseline). Nach Eintritt in den detektierbaren Bereich wird (bei einer maximalen PCR-Effizienz; siehe Kap. 3.9.5.5) in jedem PCR-Zyklus eine Verdoppelung der Menge an PCR-Produkt registriert, was sich als exponentieller Anstieg der Amplifikationskurve darstellt. Durch Substratverbrauch sinkt die Vermehrungsrate im späteren Verlauf der Reaktion bis auf null ab, was zu einer Abflachung der Amplifikationskurve führt.

Zur Quantifizierung muss der Verlauf der Amplifikationskurve auf einen Zahlenwert (cycle threshold value; C_T -Wert; siehe Kap. 3.9.5.7) reduziert werden. Der C_T -Wert entspricht der Zykluszahl, bei welcher die Amplifikationskurve beim Übergang in die exponentielle Amplifikation einen Fluoreszenzschwellenwert (cycle threshold) überschreitet und welcher in der vorliegenden Arbeit auf einen Wert von 100 RFU (relative fluorescence units)

festgelegt wurde. Die C_T -Werte einer cDNA-Sequenz in verschiedenen Proben stellen die Basis für die Berechnung der relativen Expression der korrespondierenden mRNA-Sequenz in den entsprechenden Proben dar (Livak und Schmittgen, 2001).

Da das Fluorophor SybrGreen unspezifisch an doppelsträngige DNA bindet, ist keine Unterscheidung zwischen Fluoreszenzsignalen, welche vom spezifischen PCR-Produkt verursacht werden und anderen doppelsträngigen DNA-Molekülen (dsDNA) möglich (Bustin, 2000). Während es sich bei diesen Kontaminationen um verschiedene Sorten von dsDNA handeln kann, stellen Amplifikationsprodukte aneinander gelagerter Primer (Primerdimere) die häufigste Form dar. Zur Differenzierung zwischen spezifischem Produkt und Primerdimeren wurde jede Probe daher im Anschluss an die qPCR einer allmählichen Temperaturerhöhung ausgesetzt, wobei die Fluoreszenz ständig kontrolliert wurde (Schmelzkurvenanalyse). Im Verlauf einer solchen Schmelzkurvenanalyse wird für jede Spezies an dsDNA (PCR-Produkt, Primerdimer) ein produktspezifischer Schmelzpunkt erreicht. Der Schmelzpunkt eines qPCR-Produkts beschreibt die Temperatur des sprunghaften Fluoreszenzsignalverlusts in der Schmelzkurve, was auf die Trennung der Doppelstränge und damit verbundener Freisetzung des interkalierten Farbstoffs (SybrGreen) zurückzuführen ist.

3.9.5.2. Referenzgen (housekeeping gene)

Zur Normalisierung der Daten aus qPCR-Experimenten wurde in der vorliegenden Arbeit die Expressionsrate eines Referenzgens in den entsprechenden Proben in die Auswertung einbezogen. Als Referenzgen werden Gene verwendet, die in vielen Geweben transkribiert werden und deren Expression nur wenig von äußeren Bedingungen abhängt (Radonic *et al.*, 2004). Sie werden im Gegensatz zu gewebsspezifischen, stark regulierten Genen (Luxusgenen) auch als Haushaltsgene (housekeeping genes) bezeichnet. Da sich in vorangegangenen Untersuchungen gezeigt hat, dass β -Aktin diesen Anforderungen in vielen experimentellen Systemen genügt, wurde in der vorliegenden Arbeit β -Aktin zur Normalisierung eingesetzt (Kreuzer *et al.*, 1999).

3.9.5.3. Negativ- / Positiv-Kontrollen

No RT-Control

Bei der Präparation von RNA besteht trotz DNase-Behandlung die Möglichkeit einer Verunreinigung durch genomische DNA (Bustin, 2002). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit in jeder RNA-Probe untersucht, ob genomische DNA (gDNA) des β -Aktin-Gens zu finden ist. Zu diesem Zweck wurden 2,5 ng RNA jeder Probe ohne vorherige reverse Transkription in qPCR-Experimenten eingesetzt (No RT-Control, NRC). Das Ergebnis dieser Untersuchung (C_T -Wert dieser qPCR) wurde durch relative Quantifizierung mit dem C_T -Wert von β -Aktin-cDNA - hergestellt aus 2,5 ng RNA - verglichen. Lag die relative Menge an β -Aktin-Sequenzen in der RNA-Probe bei $< 4\%$ der Menge an β -Aktin-Sequenzen in der entsprechenden cDNA-Probe, wurde eine ausreichende Reinheit der RNA-Probe in Bezug auf genomische DNA angenommen.

No template control

Zur Prüfung der qPCR-Spezifität wurde in jedem qPCR-Experiment eine Negativkontrolle mitgeführt, bei welcher keine Probe (5 μ l Wasser statt 5 μ l cDNA) eingesetzt wurde (no template control, NTC). Experimente, bei denen in der Negativkontrolle eine Amplifikation des spezifischen PCR-Produkts zu beobachten war, wurden wiederholt.

Positiv-cDNA

In jedem qPCR-Experiment wurde eine cDNA-Probe eingesetzt, für welche durch vorangegangene Untersuchungen bekannt war, dass das zu untersuchende Gen (GOI) durch qPCR sicher nachweisbar war (Positiv-cDNA). Experimente, in welchen der Nachweis des GOI in der Positiv-cDNA nicht gelang, wurden wiederholt.

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten qPCR-Untersuchungsmethoden (qPCR-Assays) wurden in Vorversuchen bezüglich ihrer Spezifität und Effizienz untersucht und bewertet. Für den Einsatz in den qPCR-Experimenten wurden nur qPCR-Assays verwendet, die in den Vorversuchen als tauglich bewertet wurden.

3.9.5.4. qPCR Primer

Für das Anlagern der Taq-Polymerase im Verlauf der qPCR werden je zwei sequenzspezifische Oligonukleotide (sense und antisense Primer) benötigt, die mit der Komplementärsequenz der cDNA hybridisieren und so das PCR-Produkt von beiden Seiten begrenzen (Lehninger *et al.*, 2001). Die Sequenzen der verwendeten Primer (Primersequenz) legen durch ihr sequenzspezifisches Hybridisierungsverhalten fest, welche cDNA-Sequenz im Verlauf eines qPCR-Experiments amplifiziert wird. Daher ist die Bestimmung geeigneter Primersequenzen die zentrale Voraussetzung für die Etablierung einer qPCR-Untersuchungsmethode (qPCR-Assay). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten qPCR-Primer wurden entweder von vorangegangenen Dissertationen der Arbeitsgruppe übernommen oder nach einem laboreigenen Standardprotokoll etabliert, wenn die Sequenzen selbst ausgewählt (Primer 3) oder aus der Literatur entlehnt wurden.

Zur Etablierung selbst ausgewählter Primer wurde zunächst die Sequenz des zu untersuchenden Gens (gene of interest, GOI) im Internet (NIH Genebank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>) recherchiert. Die ermittelten Sequenzen wurden gegebenenfalls softwaregestützt in einem Sequenzvergleich (alignment) untersucht (GeneDoc, Version 2.6.002), um Sequenzvariabilitäten und/oder Transkriptvarianten (splicing variants, u. a.) zu beurteilen und als Resultat zu bestimmen, welche Sequenz in der qPCR-Untersuchungsmethode nachgewiesen werden soll (Targetgen). In der Sequenz des Targetgens wurde anschließend der kodierende Sequenzbereich (kodierende Sequenz, coding sequence, cds) softwaregestützt ermittelt (Biowire Jellyfish, Version 1.5).

Bei der Ermittlung der Primersequenzen wurden die Standardparameter (default parameters) der internetbasierten Freeware Primer 3 verwendet (Idealwerte: PCR-Produktlänge = 100; Primerlänge = 20 Nukleotide; Schmelzpunkt (T_m) = 60 °C; GC-Gehalt = 50 %; Selbstkomplementarität = 0; 3'-Komplementarität = 0). Nach der Ermittlung der Sequenz wurden die Nukleotide kommerziell synthetisch hergestellt (Fa. MWG Biotech).

Tab. 11 Primer, die für die qPCR verwendet wurden; cds = Coding Sequence (Kodierende Sequenz)

Target	T _m in C°	Start und Ende in der cds	Sense Primer 5'-3'	erwartete Produktlänge
			Antisense Primer 5'-3'	
AE2	60,18	2968-2985	ccc gtg tgg atg atg gtt	103 bp
	59,39	3053-3071	tcatctccaagaaggagcg	
CA1	60,46	329 – 344	tgg atg gag cca cat ttt ct	73 bp
	59,88	381 – 401	aagtaccccagctttgctga	
CA2	60,03	75 – 95	gag ttt gat gac tcg cag ga	72 bp
	59,99	124 – 146	actggcacttacacattggttc	
CFTR	53,80	2560 – 2578	cgc aag ata ctg gct tgg a	97 bp
	60,18	2637 – 2656	ttttgatgacgtggagagc	
DRA	60,03	168 -188	tcc ttc ccc ata gca tct tg	162 bp
	59,73	310-329	tacgggctatatgcagcctt	
β-Aktin	60,12	549 – 568	cga cct gac cg acta cct ca	90 bp
	59,93	620 – 639	aaatcgtgcgtgacatcaaa	

Für die Etablierung der qPCR-Primer wurde zunächst getestet, ob mit dem laboreigenen Standard-58°C-two step-qPCR-Protokoll (Annealing und Elongation bei 58°C, Denaturierung bei 95°C; siehe Kap.:3.9.5.6) ein gutes Ergebnis erzielt werden konnte. Hintergrund der standardisierten Annealing-Temperatur von 58°C war, möglichst vielen Arbeitsgruppen das gleichzeitige Arbeiten am Light-Cycler zu ermöglichen, was nur durch qPCR-Experimente mit voll belegten 96-well-Platten zu erreichen war. Hierfür war es notwendig, dass alle Primer bei derselben Annealingtemperatur funktionierten.

Für die Prüfung der Funktionalität der Primer bei dieser Temperatur wurden Gradientenläufe durchgeführt, bei denen Annealingtemperaturen von 53,8°C bis 63,6°C (in 1,4 Grad-Schritten, aufsteigend von Reihe A bis H) getestet wurden. Ergab die 58°-Reihe kein deutlich schlechteres Ergebnis als die übrigen Reihen und war das Ergebnis spezifisch (nur eine Bande mit der erwarteten Länge), so wurde in der Folge für dieses Primerpaar die Annealingtemperatur von 58°C angewendet.

Die Funktionstüchtigkeit der eingesetzten Polymerase bei einer Elongationstemperatur von 58°C war in zahlreichen laborinternen Vorversuchen geprüft worden.



Abb. 5 Gelelektrophorese des Gradientenlaufs von DRA (162 bp). A=53,8°C, B=55,2°C, C=56,6°C, D=58°C, E=59,4°C, F=60,8°C, G=62,2°C, H=63,6°C; 100 bp-Ladder

3.9.5.5. Etablierung qPCR-Assay

Die Sensitivität eines qPCR-Assays bezeichnet die geringste Kopienzahl an Targetgen-Sequenz, die in einem qPCR-Experiment noch detektierbar ist, die Effizienz ist ein Maß für die Vervielfachungsrate des qPCR-Produkts in einem Zyklus und die Spezifität beschreibt die Neigung der eingesetzten Primer zur ausschließlichen Bindung an die Targetsequenz. Für die Etablierung der qPCR-Assays wurden jeweils Sensitivität, Effizienz und Spezifität festgestellt.

Zur Bestimmung der Sensitivität wurde für jedes neue Primerpaar bzw. für jedes GOI eine Amplifikation mit einer 7-stufigen \log_{10} -Verdünnungsreihe durchgeführt (von 1 ng/ μ l – 1 fg/ μ l). Hierfür wurden 200 ng des entsprechenden qPCR-Produkts so verdünnt, dass in jeder nächsthöheren Verdünnungsstufe nur noch ein Zehntel der Produktmenge der niedrigeren Verdünnungsstufe enthalten war.

Die verdünnten Proben wurden wiederum in qPCR-Experimenten mit den entsprechenden Primern eingesetzt. Die höchste Verdünnungsstufe, bei der eine Amplifikation zu beobachten ist, stellt die Grenze der Sensitivität des entsprechenden qPCR-Assays dar (Verdünnungsstufe 7 noch detektierbar: Sensitivität von 1 fg). Das Ergebnis kann als Masse (fg) oder als Kopienzahl ausgedrückt werden.

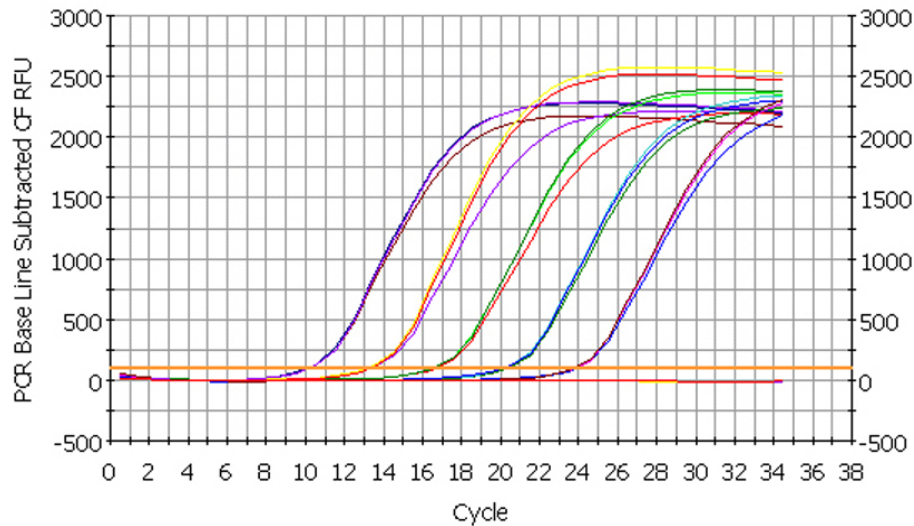


Abb. 6 Darstellung einer Verdünnungsreihe (mit jeweils 3 Proben pro Verdünnungsstufe). Sie zeigt, dass die Verdünnungsstufen exakt 3,3 Zyklen auseinander liegen. Die Negativkontrolle steigt nicht über die Hintergrundfluoreszenz hinaus (Verdünnungsstufen 1+2 ausgeblendet).

Zur Bestimmung der Effizienz wurde eine 6-stufige log₁₀-Verdünnungsreihe aus RNA (1 µg bis 10 pg) revers in cDNA transkribiert (siehe Kap. 3.9.3) und anschließend für jeden qPCR-Assay mit den entsprechenden Primern untersucht. Die Bestimmung der qPCR-Effizienz erfolgte softwaregestützt durch eine Regressionsanalyse. Ergebnis der Untersuchungen war die qPCR-Effizienz, welche in Prozent oder als Steigung der Regressionsgeraden (slope) ausgedrückt werden kann.

$$\text{Gleichung IV} \quad \text{Effizienz} = 10^{\left(-\frac{1}{\text{Slope}}\right)} - 1$$

100 % Effizienz entspricht einer Verdoppelung der Kopienanzahl mit jedem Zyklus bzw. einer Verzehnfachung nach 3,3 Zyklen. In der vorliegenden Arbeit wurden nur qPCR-Assays mit einer Effizienz von > 90 % verwendet.

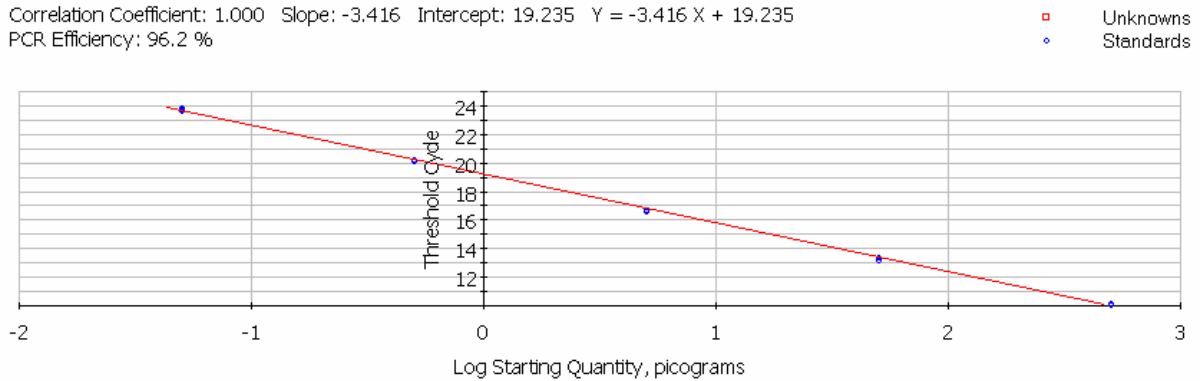


Abb. 7 Darstellung einer Regressionsgeraden mit einer Steigung von -3,416. Aus dieser Steigung ergibt sich eine Effizienz von 96,2 %.

Die Spezifität der qPCR-Assays wurde (a) durch eine Schmelzkurvenanalyse, (b) durch Gelelektrophorese des qPCR-Produkts und (c) durch Sequenzanalyse des qPCR-Produkts (siehe Kap. 3.9.6.3) untersucht. Die Spezifität eines qPCR-Assay wurde angenommen, wenn (a) nur eine Amplitude in der Schmelzkurvenanalyse vorlag, (b) genau eine Bande der erwarteten Größe in der Gelelektrophorese zu finden war (wurde bereits beim Gradientenlauf zur Etablierung der Primer überprüft) und (c) die ermittelte Sequenz mit der erwarteten Sequenz des qPCR-Produkts übereinstimmte.

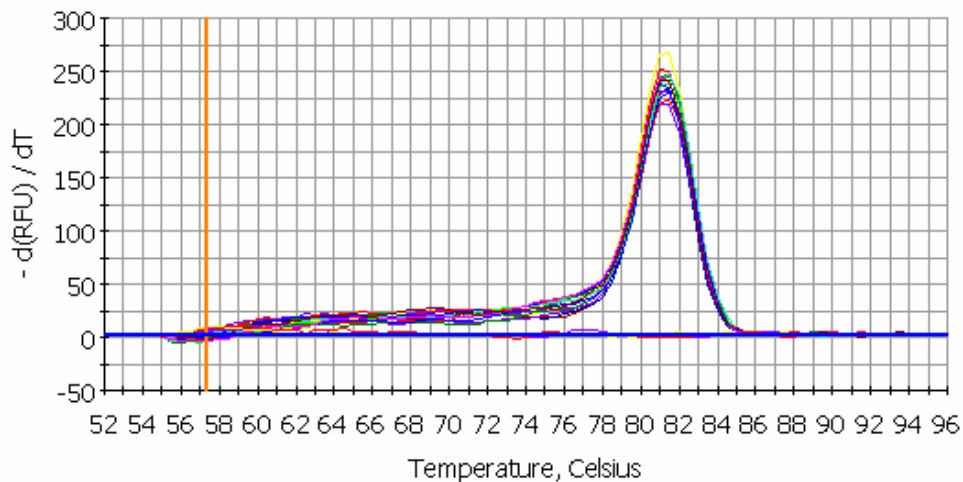


Abb. 8 Darstellung einer Schmelzkurve. Aus dieser Kurve ergibt sich ein produktspezifischer Schmelzpunkt von 81,3°C.

Ergebnis der Etablierungsarbeiten war jeweils eine qPCR-Untersuchungsmethode mit bekannter und qualitätskontrollierter Sensitivität, Effizienz und Spezifität sowie ein Amplifikat-spezifischer Schmelzpunkt, der zum Vergleich mit allen folgenden Experimenten mit diesem Primerpaar herangezogen werden konnte.

3.9.5.6. Protokoll der qPCR

In der vorliegenden Arbeit wurden für jede Probe drei qPCR-Ansätze pro GOI durchgeführt (Triplet-Ansatz) und in Kombination ausgewertet.

Zur Bestimmung der PCR-Amplifikationskurve einer definierten cDNA-Sequenz in einer Probe wurde ein kommerziell erhältliches qPCR-System (iQ SybrGreen Supermix, Fa. BioRad) eingesetzt. Dieses umfasst eine Reaktionslösung, welche die DNA-abhängige DNA-Polymerase (Hot Start Taq-Polymerase), Desoxyribonukleotide (dNTPs), SybrGreen, MgCl₂ (3 mM Endkonzentration) und einen Reaktionspuffer enthält. Für eine Reaktion wurden 5 µl cDNA (hergestellt mit 2,5 ng RNA-Probe), 0,5 µl von Sense- und Antisense-Primer (20 picomolar), 12,5 µl qPCR Reaktionslösung (iQ SybrGreen Supermix) und 6,5 µl Wasser in ein Reaktionsgefäß zusammengeführt und im Thermocycler inkubiert. Für die qPCR wurde ein einheitliches Temperaturprofil verwendet, welches aus einer Aktivierung der Polymerase durch dreiminütige Inkubation bei 95 °C und 35 Amplifikationszyklen mit jeweils 30 Sekunden bei 95 °C (Denaturierung, Denaturation) und 2 Minuten bei 58 °C (Hybridisierung / Neustrangsynthese, Annealing / Elongation) bestand (Zweistufen-Protokoll, two step protocol). Die Fluoreszenz wurde während der Elongation gemessen (Echtzeit-Datenanalyse, real time data analysis). Für die Schmelzkurvenanalyse wurden die Proben anschließend in 80 Stufen von 55 °C auf 95 °C erhitzt. Auf jeder Stufe wurde die Temperatur über 10 Sekunden konstant gehalten und dabei jeweils die Fluoreszenz der Proben gemessen.

Die gemessene Fluoreszenz jeder Probe wurde während der qPCR bezogen auf die Zyklen und während der Schmelzkurvenanalyse bezogen auf die Temperatur aufgezeichnet. Am Ende eines jeden qPCR-Laufs standen für jede Probe drei Amplifikationskurven und drei Schmelzkurven zur Verfügung.

3.9.5.7. Bestimmung der C_T-Werte (cycle threshold values)

Zur Bestimmung der relativen Menge der untersuchten cDNA-Spezies in den verschiedenen Proben wurden die in der qPCR gesammelten Amplifikationsdaten analysiert. Standardmäßig wurde dazu der Threshold manuell auf 100 gesetzt, um Daten miteinander vergleichen zu können. Durch die Geräte-Software wurde anschließend für jede Amplifikationskurve ein C_T-Wert festgestellt, welcher die Amplifikationskurve quantitativ charakterisierte. Die drei C_T-Werte (Triplet-Ansätze), die auf diese Art für jedes GOI in jeder Probe bestimmt wurden, wurden zum arithmetischen Mittelwert verrechnet (Werte im Anhang angegeben). Dabei wurde geprüft, ob zwischen den einzelnen C_T-Werten eines Triplets Abweichungen bestehen. Triplets, deren Einzelwerte um > 0,5 C_T-Werte streuten,

wurden aus der weiteren Auswertung ausgeschlossen und die entsprechenden qPCR-Experimente wurden wiederholt.

3.9.5.8. Schmelzkurvenanalyse

Die Schmelzkurve jeder qPCR wurden mit der Schmelzkurve der Etablierung des entsprechenden qPCR-Assays verglichen. Dabei wurde geprüft, ob der Schmelzpunkt des Produkts eines qPCR-Experiments mit dem Schmelzpunkt aus den entsprechenden Etablierungsversuchen übereinstimmt. Bei Abweichungen im Schmelzpunkt von mehr als $\pm 0,5$ °C wurden die Ergebnisse aus den folgenden Auswertungen ausgeschlossen und die entsprechenden Experimente wiederholt.

3.9.5.9. Darstellung der Ergebnisse

Um einen optischen Eindruck von den Expressionsverhältnissen zu bekommen, werden die C_T -Werte der Targets einzeln nach Tieren und Fütterungsgruppe getrennt den C_T -Werten des Referenzgens (β -Aktin) (Kreuzer *et al.*, 1999) in einem Streudiagramm gegenübergestellt.

C_T -Mittelwerte von Target und Referenzgen sind im Anhang (Kap: 9.3) für jedes untersuchte Tier und für jede Tiergruppe gegeben.

Eine statistische Auswertung erfolgte nicht, da die Tierzahlen pro Fütterungsgruppe zum Teil zu klein für eine aussagekräftige statistische Analyse waren.

3.9.6. Weitere molekularbiologische Verfahren

3.9.6.1. DNA-Gelelektrophorese

Zur qualitativen Untersuchung von PCR-Produkten wurden TAE-Agarosegele in Konzentrationen von 0,5-3% eingesetzt. Proben wurden in Auftragspuffer aufgenommen, in Geltaschen pipettiert und zusammen mit einem Größenstandard (Gemisch aus DNA bekannter Größe, Long Range DNA-Ladder, Firma Roth) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Darstellung der DNA erfolgte durch Ethidiumbromid und anschließender Belichtung auf einem UV-Illuminator (Chemi Imager 5500, Fa. Alpha-Innotech).

3.9.6.2. Aufreinigung eines PCR-Produktes

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten oder anderer kleiner DNA-Mengen aus wässriger Lösung wurde ein kommerziell erhältlicher Säulen-Kit (QIAquick PCR Purification Kit, Fa. Qiagen) nach Vorgaben des Herstellers eingesetzt.

3.9.6.3. Sequenzierung

Zur Sequenzierung der PCR-Produkte wurden die Proben aufgereinigt (siehe Kap. 3.9.6.2) und zusammen mit den entsprechenden Primern in ein kommerzielles Sequenzierungslabor (Fa. SeqLab, Göttingen) gegeben.