

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Ag/AgCl-Elektroden und Agarbrücken	Eigenbau
Cycler (GeneAmp PCR System)	Perkin Elmer, Langen
Elektrophorese-Gelkammern	Biorad, München
Heizblock	Fa. Th. Karow, Berlin
Hybridisierungsöfen	Biometra, Göttingen
KCl-Kalomelelektroden	Fa. Ingold, Steinbach (Bezugselektrode Typ 303)
Lumineszenzbild Analysator (LAS 1000)	FUJI, Tokyo, Japan
Messkammer	Forschungswerkstatt des Klinikums
RNA/DNA Calculator Gene Quant II	Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Bucks, United Kingdom
Spannungsklemmeinrichtung CVC-8	Fa. Fiebig, Berlin
Ultra Turrax Homogenisator	Janke & Kunkel, Staufen
UV-Crosslinker	Hoefer Pharmacia, San Francisco, CA, USA
UV-Licht-Visualisierer	MS Laborgeräte, Heidelberg
Wärmetauscher	Glasbläserwerkstatt des Klinikums
Wasserbad	Julaba, Seelbach, sowie Haake, Berlin
Wippe	Biometra, Göttingen
Zentrifuge	Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA

#### 2.1.2 Chemikalien

Agarose	Life Technologies/ Gibco BRL, Paisley, United Kingdom
Aldosteron	Sigma, Taufkirchen
Amilorid	Sigma, Taufkirchen

Antikörper-Lösung (Anti-Digoxigenin AP)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Blockierungslösung	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Detektionslösung (CDP Star)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Ethanol	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederland
Formaldehyd	Calbiochem, La Jolla, CA, USA
Sonde	Dig. Labeling Kit Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Glycin	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Herring Sperm DNA	Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, USA
Isopropanol	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederland
Natronlauge	Merck, Darmstadt
PD98059	Calbiochem, Merck, Darmstadt
QuikHyb-Lösung	Stratagene, La Jolla, CA, USA
RNA Probenpuffer	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
RNAzol	WAK-Chemie, Bad Soden/ Taunus
SB202190	Calbiochem, Merck, Darmstadt
SDS	Merck, Darmstadt
SSC	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
TPA	Sigma, Taufkirchen
U0126	Calbiochem, Merck, Darmstadt sowie Promega, Madison, WI, USA
Waschpuffer	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
1 ´ MOPS=10x Formaldehyde Gel Buffer	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg

### 2.1.3 Materialien

Gel Blotting-Papier (Whatman)	Schleicher&Schuell, Dassel
Nylon-Membran	Boehringer, Mannheim
Parafilm	American National Can, Neenah, WI,

	USA
Reaktionsgefäß 12 ml	Plastibrand, Wertheim
Reaktionsgefäß 50 ml	Nunc, Wiesbaden
Reaktionsgefäß PCR	Perkin Elmer, Langen

#### 2.1.4 Tierisches Material zur Gewebegewinnung

Wistar-Ratten (männlich)	Zentrale Versuchstierzucht, Bundesgesundheitsamt, Berlin
Rattenfutter	Fa. Altromin, Lange/Lippe

#### 2.1.5 Lösungen

Badlösung nach Schulzke et al. (1986)	hergestellt im Labor von Prof. Dr. M. Fromm, enthält (in mmol/l): Na 140; Cl 123,8; K 5,4; Ca 1,2; Mg 1,2; HPO <sub>4</sub> 2,4; H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,6; HCO <sub>3</sub> 21,0; sowie D(+)-Glucose 10,0; β-OH-Butyrat 0,5; Glutamin 2,5; D(+)-Mannose 10,0; Azlozillicin 50mg/l, Tobramycin 4 mg/l. Osmolalität 290 mosm/kg, pH-Wert bei Begasung mit 95% O <sub>2</sub> und 5% CO <sub>2</sub> 7,4.
---------------------------------------	---

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Prinzip der Versuche**

Die Versuche sahen einen mehrstufigen Ansatz vor. Es wurden zunächst Kolon-Epithelien von zuvor getöteten männlichen Wistar-Ratten gewonnen und für in-vitro-Versuche in Ussing-Kammern verwendet. Nach achtstündiger Inkubation mit Aldosteron und den unten angegebenen Aktivatoren oder Inhibitoren der MAP-Kinase wurde der elektrogene Natriumtransport nach Applikation von Amilorid bestimmt. Im nächsten Schritt wurde das Gewebe den Ussing-Kammern entnommen und für die Detektion der ENaC-Untereinheiten-mRNA aufgearbeitet. Diese wurde durch Northern Blots durchgeführt.

### **2.2.2 Tiere und Darmpräparation**

Als Versuchstiere dienten männliche Albino-Wistar-Ratten. Während der Zeitspanne zwischen Lieferung der Tiere und Versuch hatten die Tiere freien Zugang zu Leitungswasser und Standard-Rattenfutter. Am Versuchstag wurden die Ratten durch CO<sub>2</sub>-Inhalation getötet. Anschließend wurde das Abdomen mit einem Medianschnitt vom Sternum bis zur Symphyse eröffnet. Nach Verlagerung des Dünndarmpakets nach extrakorporal und Durchtrennung des Schambeins wurde das distale Kolon abgesetzt, freipräpariert und entnommen.

Das distale Kolon wurde in die drei Abschnitte „frühdistales Kolon“ (early distal colon = EDC), „spätdistales Kolon 1“ (late distal colon 1st segment = LDC-1) und „spätdistales Kolon 2“ (late distal colon 2nd segment = LDC-2) eingeteilt, wie von Fromm et al. (Fromm et al., 1993) publiziert. EDC lag dabei 6 bis 7 cm ab ano. LDC-1 befand sich proximal eines bei ca. 2 cm ab ano konstant vorhandenen Lymphknotens. LDC-2 bezeichnete den Abschnitt zwischen diesem Lymphknoten und dem Anus (siehe Abbildung 1). Für die meisten der nachfolgenden Versuche wurde LDC-2 verwendet. LDC-2 unterschied sich in seinen Transporteigenschaften von dem weiter proximal gelegenen EDC. Der durch Aldosteron geregelte elektrogene Natriumtransport war überwiegend im spätdistalen Kolon lokalisiert, welches insofern funktionell dem menschlichen Rektum entsprach.

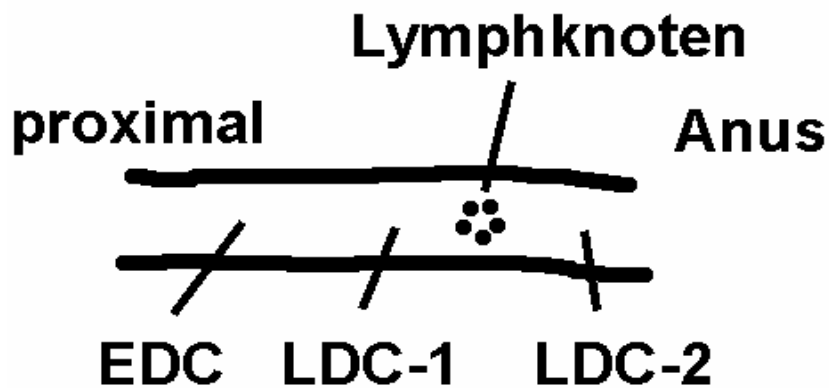


Abbildung 3: Einteilung des distalen Kolons der Ratte; nach Fromm et al. (1993).

Das freipräparierte distale Kolon wurde durch vorsichtige Spülung mit begaster Rin-  
gerlösung von Darminhalt befreit und entlang des Mesenterialansatzes der Länge  
nach aufgeschnitten. Durch die in der Literatur als „totales Strippen“ bezeichnete  
Technik (Schulzke et al., 1989) (Hegel & Fromm, 1990) wurde zunächst die Tunica  
muscularis und anschließend die Lamina muscularis mucosae abpräpariert, so dass  
als zu untersuchendes Gewebe lediglich Lamina epithelialis und Lamina propria mu-  
cosae übrigblieben.

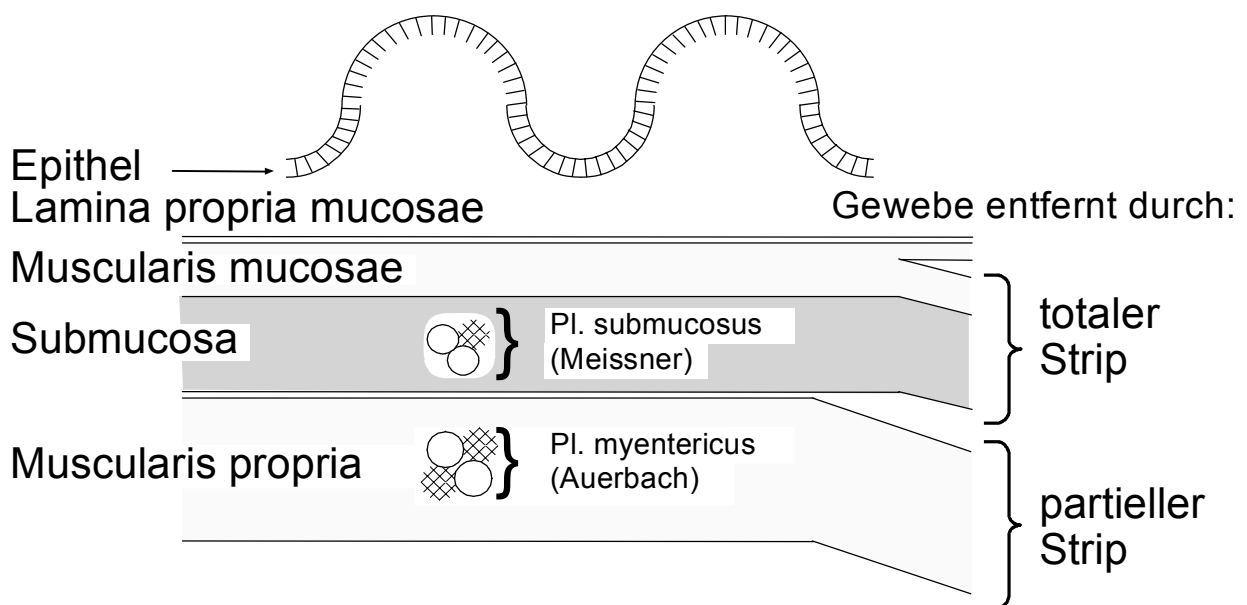


Abbildung 4: Strippen der Darmwand; modifiziert nach Hegel & Fromm (1990).

## **2.2.3 Ussing-Versuch**

### **2.2.3.1 Prinzip**

Das wie oben beschrieben gewonnene Epithel wurde in einem Versuchsstand zwischen zwei flüssigkeitsgefüllte Räume gespannt. Beide Flüssigkeitsräume enthielten Badlösung mit identischer Zusammensetzung. Die transepitheliale Potentialdifferenz zwischen den Flüssigkeitsräumen wurde durch eine externe Spannungsklemme auf 0 mV geklemmt, so dass über dem Epithel kein elektrochemischer Gradient mehr herrschte, welcher passive Ionenströme hätte antreiben können. Durch diesen Versuchsaufbau konnten lediglich aktive Transportprozesse ablaufen. Diese wurden in ihrer Nettosumme durch den Kurzschlussstrom ( $I_{SC}$ ) messbar, der die durch den aktiven Ionentransport entstehende Potentialdifferenz kompensierte.

### **2.2.3.2 Aufbau des Ussing-Versuchsstands**

Kernelement des Versuchsstandes war die Messkammer. Hier erfolgte die Applikation des Klemmstroms und die Messung der transepithelialen Spannung. Die Messkammer bestand aus zwei identischen Hälften, zwischen denen das Epithel eingespannt wurde. Die zu beiden Seiten ins Kammerlumen exponierte Fläche des Epithels betrug jeweils  $0,54 \text{ cm}^2$ .

Das Lumen jeder Seite der Messkammer war über zwei Plastikschläuche mit einem Aufsatz verbunden, der neben der Aufnahme auch der Erwärmung, Umwälzung und Begasung der Badlösung diente. Der Aufsatz war nach oben hin geöffnet, um weitere Substanzen zuführen zu können. Über separate Anschlüsse wurde der Badlösung im Aufsatz ein Gasgemisch aus 95 %  $O_2$  und 5 %  $CO_2$  so zugeführt, dass der Auftrieb der Gasbläschen eine konstante Umwälzung der Lösung bewirkte. Dadurch konnten die Konzentrationen von  $O_2$  und  $CO_2$  und der pH-Wert konstant gehalten werden. Zudem wurde so sichergestellt, dass Lösungen, die der Badlösung zugegeben wurden, sich gleichmäßig verteilten. Der Aufsatz war doppelwandig konstruiert. Der hierdurch bedingte Hohlraum enthielt Wasser zur Temperaturregulierung. Dieses war über einen Kreislauf von Schläuchen und Pumpen mit einem Wasserbad verbunden, das die Temperatur des Aufsatzes und damit der Badlösung konstant bei  $37^\circ \text{ C}$  hielt.

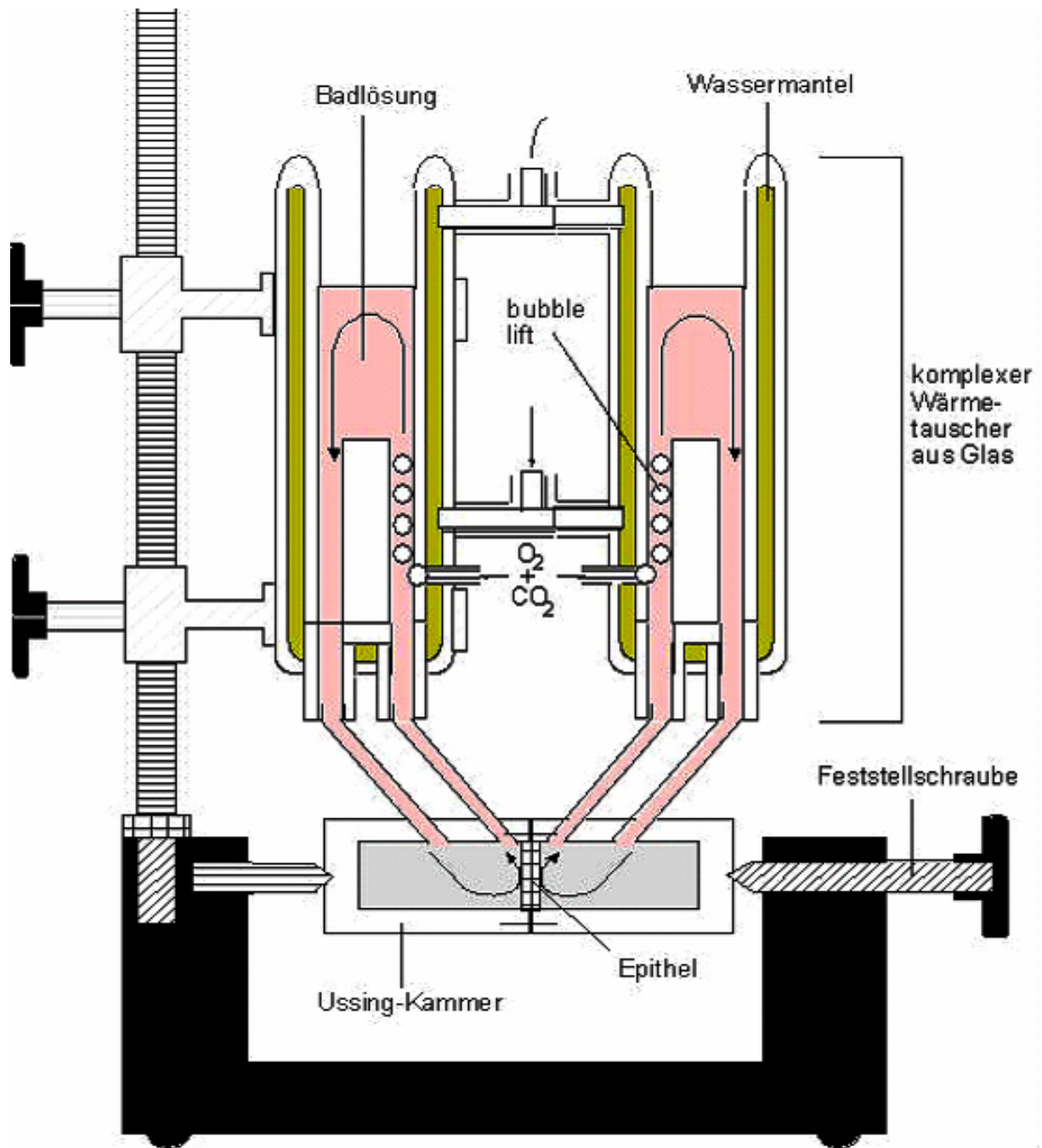


Abbildung 5: Messkammer und Aufsatz; nach Barmeyer (2002).

### 2.2.3.3 Elektrische Messanordnung

Die elektrische Messanordnung des Versuchsstandes bestand aus zwei Spannungselektroden, zwei Stromelektroden, einem Interface und einem Rechner. Sämtliche Elektroden waren über Agarbrücken mit dem Inneren der Messkammer verbunden. Die elektrische Verbindung zwischen Elektroden und Agarbrücken bestand aus gesättigter KCl-Lösung.

Die Spitzen der Agarbrücken waren durch Bohrlöcher in die Messkammer geführt. Diese Bohrlöcher waren so angeordnet, dass sich die Spitzen der Spannungselektroden, mit denen die transepitheliale Potenzialdifferenz gemessen wurde, epithelnah befanden. Der Abstand der Elektrodenenden zum Epithel betrug 2 mm. Die Spitzen der Stromelektroden, über die der Klemmstrom appliziert wurde, waren dagegen epithelfern angebracht, mit einem Abstand zum Epithel von 25 mm. Die Messung der transepithelialen Potentialdifferenz, die Applikation des Kurzschlussstromes sowie die Bestimmung der Gewebeleitfähigkeit und die Größe des Kurzschlussstromes wurden dabei in bestimmaren Zeitintervallen durch die rechnergesteuerte Spannungsklemmeinrichtung vorgenommen und gespeichert.

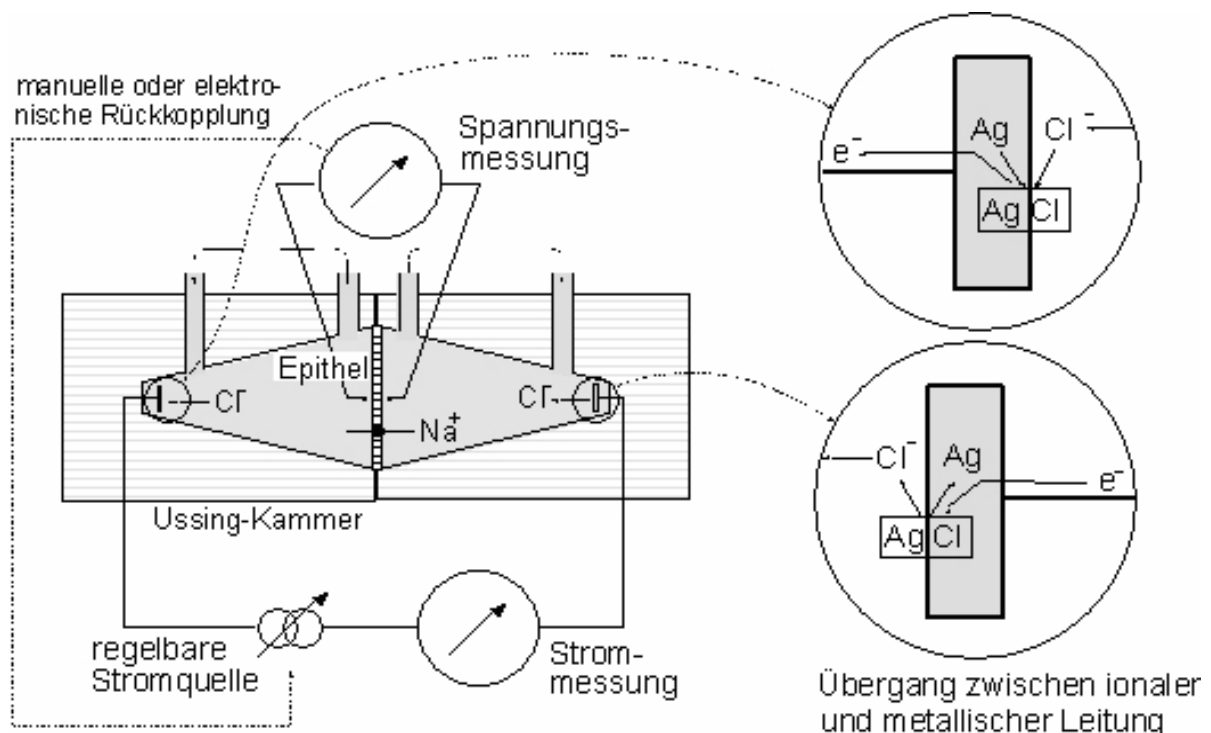


Abbildung 6: Messanordnung; modifiziert nach Hegel et al. (1993).



#### **2.2.3.4 Einspannen des Epithels**

Das aufgearbeitete Epithel, dem durch die darunterliegende Bindegewebsschicht der Lamina propria mucosae mechanische Stabilität verliehen wurde, wurde unter leichtem Zug in die Messkammer eingespannt, und diese in den Versuchsstand eingesetzt. Sofort wurden die Begasungsaufsätze mit je 10 ml der begasten Badlösung gefüllt und so eine Umspülung des Gewebes von beiden Seiten sichergestellt.

#### **2.2.3.5 Korrektur von Badwiderstand und Elektrodenasymmetrie**

Vor Beginn jedes Ussing-Experiments wurden der Badwiderstand und die Elektrodenspannung gemessen, um sie bei nachfolgenden Messungen berücksichtigen zu können.

Der Badwiderstand der zwischen den Spannungselektroden befindlichen Badlösung bedingt einen Spannungsabfall. Vor jedem Experiment wurde daher der Ohmsche Widerstand der Badlösung zwischen den Spannungselektroden gemessen, ohne dass ein Präparat in die Kammer eingespannt war. Der so ermittelte Wert wurde gespeichert und bei jeder späteren Spannungsmessung automatisch vom Messwert abgezogen.

Um die Asymmetrie der Elektroden auszugleichen, wurde des Weiteren die Elektrodenspannung in der Badlösung ohne Präparat gemessen. Auch dieser Wert wurde gespeichert und bei jeder nachfolgenden Messung berücksichtigt

#### **2.2.3.6 Messung des Kurzschlussstroms**

Die Abstände zwischen den automatischen Messungen betragen zehn Minuten und nach Amiloridzugabe 10 Sekunden. Erfasst wurden der Kurzschlussstrom, die spontane transepitheliale Spannung und die Gewebeleitfähigkeit. Zu diesem Zweck wurde, durch einen Regelloarithmus gesteuert, die gleichzeitig gemessene Potentialdifferenz mittels eines applizierten und registrierten Kurzschlussstroms auf Null gebracht. Aus der Änderung der Potentialdifferenz konnte hinterher der Widerstand, bzw. die Gewebeleitfähigkeit des Epithels nach dem Ohmschen Gesetz errechnet werden:

$$R^t = \frac{dV_{ms}}{dI_{SC}}$$

$$G^t = \frac{1}{R^t}$$

Im Intervall zwischen den Messungen wurde keine externe Spannung an das Epithel angelegt, das heißt es herrschten sogenannte open-circuit-Bedingungen.

### 2.2.3.7 Bestimmung des elektrogenen Natriumtransports

Der epitheliale Natriumtransport wurde nach acht Stunden durch die Gabe von  $10^{-4}$  M Amilorid blockiert. Amilorid hat seinen Wirkort auf der mukosalen Seite des Epithels. Dementsprechend wurde die Substanz auch nur dort appliziert (siehe 2.3.2.3). Um mit dem schlecht löslichen Amilorid die angestrebte  $10^{-4}$  molare Konzentration in der Kammer zu erreichen, musste 1 ml der Badlösung mit einer Pipette abgezogen und durch 1 ml einer  $10^{-3}$  molaren Amiloridlösung ersetzt werden.

Um häufiger Daten zu gewinnen, wurde zuvor das Messintervall von 10 auf 2,5 Minuten verkürzt. Bei den Messungen wurde der Abfall des Kurzschlussstroms durch die Amiloridgabe folgendermaßen ermittelt: Der Kurzschlussstrom wurde unmittelbar vor und 10 Minuten nach Amiloridgabe bestimmt und die Differenz der beiden Werte gebildet. Der durch Amilorid hemmbare Anteil des Kurzschlussstroms entsprach stöchiometrisch der elektrogenen Natriumresorption, die außerdem auch als Teilchenflux ausgedrückt werden konnte. Der Amilorid-hemmbare Kurzschlussstrom konnte folglich als Strom pro Flächeneinheit in  $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  oder als Flux einwertiger Kationen pro Flächeneinheit in  $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  angegeben werden. Die Umrechnungsfaktoren zwischen den Einheiten ergaben sich aus der Faraday-Konstanten ( $F = 96487$  Coulomb/mol) nach den Formeln:

$$\text{Flux: } \frac{M}{t \cdot A} [\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}] = \frac{3600}{96487} \cdot \frac{I}{A} = 0,037 \cdot \frac{I}{A}$$

$$\text{Strom: } \frac{I}{A} [\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}] = \frac{96487}{3600} \cdot \frac{M}{t \cdot A} = 26,8 \cdot \frac{M}{t \cdot A}$$

### 2.2.3.8 Zugabe der Substanzen

Es wurden jeweils vier verschiedene Gruppen gebildet:

- Gruppe I:            Ansatz mit Ringerlösung (Kontrolle)
- Gruppe II:           Ansatz mit Aldosteron
- Gruppe III:          Ansatz mit spezifischem MAPK-Inhibitor PD98059 oder U0126  
                          oder SB202190 oder TPA
- Gruppe IV:          Ansatz mit Aldosteron und einem spezifischen MAPK-Inhibitor  
                          oder TPA

Nach Erwärmen der Badlösung durch den Wärmetauscher im Aufsatz auf 37°C wurden der Badlösung auf der mukosalen und serosalen Seite jeweils folgende Substanzen zugegeben:

- Gruppe I:            keine Zugabe (Kontrollansatz)
- Gruppen II und IV:   10 µl 10<sup>-6</sup> M Aldosteron
- Gruppen III und IV:  5 µl 40·10<sup>-3</sup> M PD98059  
                          oder 5 µl 100·10<sup>-3</sup> M U0126  
                          oder 5 µl 100·10<sup>-3</sup> M SB202190  
                          oder 5 µl mit 1000 ng TPA

Nach achtstündiger Inkubation wurde in allen Gruppen auf der mukosalen Seite 1 ml Badlösung durch 1 ml 10<sup>-3</sup> M Amilorid ersetzt. Nach weiteren 20 Minuten wurde I<sub>SC</sub> gemessen und das Experiment beendet.

## 2.2.4 Biochemische Versuche

### 2.2.4.1 RNA-Extraktion und -Isolation

Nach Beendigung des Ussing-Versuchs wurden die zur Badlösung hin exponierten Flächen der Epithelien mit einer Präparierschere ausgeschnitten. Im Folgenden wurden die Epithelien der jeweiligen Gruppen zusammen mit 6 ml gekühltem RNAzol in ein 12-mm-Reaktionsgefäß gegeben. Unter ständiger Kühlung wurden die Epithelien anschließend mit dem Ultra-Turrax homogenisiert.

Nach 15 Minuten Inkubation auf Eis wurden dem Gemisch 1,2 ml Chloroform zugegeben und gemischt. Nach weiteren 5 Minuten Inkubation auf Eis wurde das Gemisch für 30 Minuten bei 9,500 g und 4°C in der Beckman-Zentrifuge zentrifugiert. Jetzt befand sich die RNA im wässrigen Überstand. Dieser Überstand wurde mit einer Pipette aufgenommen, mit ebensoviel Isopropanol (-20°C) in ein neues 12-mm-Reaktionsgefäß gegeben und zur Präzipitation (Fällung) über Nacht bei -80°C eingefroren.

Am nächsten Tag wurde der Überstand auf ca. -4°C aufgetaut und wiederum 30 Minuten bei 9.500 g zentrifugiert. Dabei trennten sich ein Pellet aus festen Bestandteilen und der Überstand. Dieser Überstand wurde abgegossen und verworfen. Das Pellet wurde jetzt mit 5 ml 70 % Ethanol (-20°C) versetzt und es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt von 15 Minuten bei 9.500×g und 4°C. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in ca. 40 µl DEPC-behandeltem Aqua bidest/ Fluka-Wasser resuspendiert. Die Messung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch mit dem RNA/DNA Calculator bei 260 nm. Zur späteren Verwendung wurden die Proben bei -80°C tiefgefroren.

#### **2.2.4.2 Denaturierende RNA-Gelelektrophorese**

Zur Herstellung des Gels wurde 1× MOPS zusammen mit Agarose in einem Mikrowellenofen bis zum Kochen erhitzt, so dass sich die Agarose vollständig gelöst hatte und ein Gemisch mit einem Agaroseanteil von 1% entstand. Nach Abkühlung bei Raumtemperatur auf ca. 60°C wurden 2% Formaldehyd zugegeben und das Gel gegossen. Die Vertiefungen zur Aufnahme der Proben wurden durch das Einsetzen eines Kamms gebildet. Das Gelschiff wurde nach dem Erstarren der Gelmasse in die Elektrophoresekammer gesetzt, welche dann mit 1× MOPS aufgefüllt wurde.

7,5 µg der extrahierten und isolierten RNA wurden mit ½ Vol. 3× RNA-Probenpuffer gemischt und für 15 Minuten bei 65°C in einem Heizblock inkubiert. Danach wurde die Probe 5 Minuten auf Eis (ca. 4°C) abgekühlt.

Die Probe wurde jetzt auf das Gel aufgetragen und 90 Minuten bei 60 V aufgetrennt. Anschließend erfolgte eine Visualisierung durch UV-Licht, um den Erfolg der Auftrennung zu kontrollieren.

### 2.2.4.3 Northern Blot

#### Kapillar-Transfer (Blot)

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurde das Gel aus der Gelkammer genommen und 30 Minuten lang bei Raumtemperatur in 1% Glycin gebadet. Danach folgten 15 Minuten in 0,05 M Natronlauge (NaOH), bevor es für einen Zeitraum von 40 Minuten in 20× SSC geschwenkt wurde.

Währenddessen wurde eine Nylonmembran entsprechend der Größe des Gels ausgeschnitten, mit DEPC-behandeltem Wasser benetzt und ebenfalls mit 20× SSC equilibriert.

Der Kapillartransfer vom Gel auf die Membran fand über Nacht in folgendem Aufbau statt:

Gewicht  
Papierhandtücher  
3x Gel Blotting-Papier  
Membran  
Gel (umgedreht)  
Parafilmmaske  
2x Gel Blotting-Papier  
Glasplatte  
Wanne mit 20× SSX

Am nächsten Tag wurde der Aufbau abgebaut und die Membran für einige Minuten in 2× SSC gewaschen. Anschließend wurde die RNA mit Hilfe des UV-Crosslinkers auf der Membran fixiert. Sowohl die Membran als auch das Gel wurden mit dem UV-Visualisierer auf Vollständigkeit des Transfers untersucht, bevor das Gel verworfen wurde.

Die Membran wurde in Aqua bidest angefeuchtet, bevor sie zur Hybridisierung weiterverwendet wurde.

## Sondenherstellung durch PCR

Zur Herstellung der Sonden diente ein kommerziell erhältlicher Kit von Boehringer/Roche. Der PCR-Ansatz enthielt die folgenden Zusätze:

- Template aus einem Minipräp
- DIG Probe 2
- 10× PCR Puffer
- 25 mM MgCl<sub>2</sub>
- Primer
- AmpliTaq (Quiagen)
- Eppendorf-H<sub>2</sub>O

Dieser Ansatz wurde nach folgendem PCR-Programm im Cyclor verarbeitet:

5 Minuten	95° C
45 Sekunden	95° C
1 Minute	60° C
2 Minuten	72° C

Die letzten drei Schritte wurden 30 mal wiederholt.

Zuletzt folgten folgende Schritte im Cyclor:

7 Minuten	72° C
∞	4° C

Zur Kontrolle des PCR-Ergebnisses wurden die so hergestellten Sonden zusammen mit einem DNA-Marker und einem 100 bp-Marker auf 1,5 % Agarosegel aufgetrennt.

## Hybridisierung

Die Membran wurde zusammen mit 5 ml vorgewärmter QuikHyb-Lösung 15 Minuten bei 68 °C in einem 50 ml-Reaktionsgefäß prähybridisiert. Gleichzeitig wurden 2 µl der mittels DIG PCR hergestellten Sonde einer Untereinheit und 3 µl GAPDH-Sonde zusammen mit 95 µl Herring Sperm DNA bei 95° C denaturiert und anschließend 5 Minuten auf Eis gestellt.

In einem nächsten Schritt wurde die Prähybridisierungslösung verworfen und die denaturierten Sonden mit 5 ml QuikHyb-Lösung in das Reaktionsgefäß gegeben. Die Hybridisierung erfolgte für 2 Stunden bei 68° C.

### **Waschen**

Der Hybridisierung folgten vier Waschschriffe. Zweimal wurde die Membran 5 Minuten lang bei Raumtemperatur in 2× SSC/ 0,1 % SDS geschwenkt und zweimal bei 65° C in 0,5 × SSC/ 0,1 % SDS.

### **Detektion**

Die Membran wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur in 100 ml Waschpuffer, anschließend für 2 h in einer Küvette mit 100 ml Blockierungslösung geschwenkt. Darauffolgend wurde die Blockierungslösung aus der Küvette geleert und die Küvette mit 50 ml Antikörper-Lösung gefüllt, welche den Anti-Digoxigenin-Antikörper enthielt. Die Küvette wurde weitere 30 Minuten gleichmäßig bewegt.

Um überflüssige Flüssigkeit abzuwaschen, wurde die Membran zweimal 15 Minuten in je 100 ml Waschpuffer geschwenkt, bevor sie mit 20 ml Detektionspuffer auf die Detektion vorbereitet wurde.

Die Inkubation in Detektionslösung erfolgte unter Lichtausschluss auf Parafilm, wobei die Membran für 5 Minuten umgedreht in der CDP-Star-haltigen Detektionslösung lag. Anschließend wurde die überschüssige Flüssigkeit von der Membran ablaufen gelassen und die Signale mit Hilfe eines Luminiszenz-Imagers detektiert (LAS-1000). Zur zusätzlichen Dokumentation wurden die Membranen anschließend für 2 Minuten auf Röntgenfilm exponiert.

### **2.2.5 Statistik**

Die Ergebnisse wurden angegeben als arithmetischer Mittelwert ± SEM. Die Anzahl der Einzelversuche (Versuchstiere) wurde mit n bezeichnet. Zum Vergleich der verschiedenen Gruppen kam der t-Test nach Student für voneinander unabhängige Stichproben zur Anwendung. Als signifikant galt  $p < 0,05$ .