

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden insgesamt 27 Schafe eingesetzt. Alle Tiere stammten aus dem gleichen Zuchtbetrieb und wurden dort ausschließlich mit Heu bzw. Weidegras gefüttert. Die Aufstallung im institutseigenen Stall erfolgte mindestens 8 Wochen vor Versuchsbeginn auf Stroh. Es handelte sich um Tiere der Rasse deutsches Milchschaaf, die bei Versuchsbeginn zwischen 9 und 10 Monate alt und zwischen 33,5 und 50 kg schwer waren. Unter den insgesamt 27 Tieren gab es 23 weibliche und 4 männlich kastrierte. Die Schafe waren eingeteilt in 21 Tiere für die Versuche in der Ussing-Kammer und 6 ausschließlich weibliche Tiere für die Untersuchung der Pansenflüssigkeit.

2.2 Fütterung

2.2.1 Ussing-Kammer-Versuche (21 Tiere)

Vor Versuchsbeginn wurden die Schafe mindestens 8 Wochen in Gruppenhaltung mit Heu ad libitum gefüttert, um sie an eine energiearme Fütterung zu adaptieren. Um 7:00 Uhr und um 14:30 Uhr wurde jeweils frisches Heu vorgelegt. Dabei nahm jedes Tier pro Tag ca. 1 – 1,5 kg Heu auf.

Um eine bessere Kontrolle der Heuaufnahme zu gewährleisten, wurden die Tiere 2 Wochen vor der Krafffutter-Fütterung (KF) einzeln aufgestallt. In den Einzel-Boxen wurde den Tieren pro Tag jeweils 1,5 kg Heu vorgelegt.

Es erfolgte eine Einteilung in 7 Gruppen mit je drei Tieren pro Gruppe, wobei eine Gruppe ausschließlich mit Heu gefüttert wurde (Kontrollgruppe), während die anderen 6 Gruppen zusätzlich Krafffutter bekamen (Versuchsgruppen).

Bei Beginn der KF-Periode wurde den Tieren in den ersten vier Tagen eine steigende (1. Tag 2 mal 100 g, 2. Tag 2 mal 200 g, 3. Tag 2 mal 300 g) und ab dem vierten Tag eine konstante Menge von 2 mal täglich (7:00 Uhr und 14:30 Uhr) 390 g an Krafffutter (Zusammensetzung s. Anhang Tab. 20) und 1 kg Heu (Zusammensetzung s. Anhang Tab. 21) um 7:00 Uhr vorgelegt.

In den Versuchsgruppen variierte die KF wie folgt:

- | | |
|--------------------|-------------|
| 1. Versuchsgruppe: | 2 Tage KF |
| 2. Versuchsgruppe: | 4 Tage KF |
| 3. Versuchsgruppe: | 1 Woche KF |
| 4. Versuchsgruppe: | 2 Wochen KF |
| 5. Versuchsgruppe: | 4 Wochen KF |
| 6. Versuchsgruppe: | 6 Wochen KF |

Die Menge des aufgenommenen Futters konnte durch Zurückwiegen der ungefressenen Anteile bei erneuter Futtervorlage festgestellt werden. Alle Tiere hatten jederzeit Zugang zu Wasser und Salzlecksteinen. Nach der KF wurden die Tiere geschlachtet.

2.2.2 Untersuchung der Pansenflüssigkeit (6 Tiere)

Diesen Tieren wurde operativ eine Pansenfistel (Beschreibung s. 8.2) eingesetzt, die einen direkten Zugang zum Lumen des Pansens ermöglichte. Nach der Pansenfisteloperation wurden diese Tiere 12 Wochen mit 1,5 kg Heu pro Tag gefüttert, 2 Wochen vor der KF begann die Dokumentation der Futteraufnahme. Ab diesem Zeitpunkt erfolgte die gleiche Fütterung wie in der 6. Versuchsgruppe (s. o.).

2.3 Schlachtung und Gewinnung der Pansenschleimhaut

Nach der Heufütterung bzw. KF wurden die Tiere in einem örtlichen Schlachthof geschlachtet. Das durch Bolzenschuss betäubte und entblutete Schaf wurde an den Hinterbeinen aufgehängt und die Bauchhöhle mit einem Schnitt entlang der Linea alba eröffnet. Der Magen-Darm-Trakt wurde sofort entfernt und auf einer sauberen Unterlage ausgebreitet. Der Pansen wurde durch einen horizontalen Schnitt auf der linken Seite des ventralen Pansensackes eröffnet und der Boden des ventralen Sackes für die Versuche in der Ussing-Kammer herausgeschnitten. Die Schleimhaut wurde in einem Transport-Puffer (Zusammensetzung siehe Tab. 22 im Anhang, Temperatur: 37° C, Begasung: 95% Sauerstoff und 5 % Kohlendioxid) mehrmals gewaschen, bis die Flüssigkeit klar blieb.

Anschließend wurde die Tunica mucosa von der Tunica serosa und Tunica muscularis getrennt und in ca. 5 cm breite Streifen geschnitten. Die Streifen wurden in dem oben erwähnten Transport-Puffer zum Labor transportiert.

Für die molekularbiologischen Versuche wurde die Schleimhaut eines Areals von 10 mal 10 cm entnommen, das sich auf der rechten Seite des Pansens und direkt unterhalb des vorderen Pansenpfeilers befand.

Die Zotten eines Areals von je 2 mal 2 cm des Epithels wurden mit einer scharfen Schere abgetrennt und in Eppendorf-Gefäße mit 1 ml RNAlater der Fa. Qiagen transferiert. Die Proben wurden innerhalb von 12 Stunden bei – 80 °C eingefroren und bis zur weiteren Untersuchung aufbewahrt.

2.4 Ussing-Kammer-Methode

2.4.1 Allgemeiner Versuchsaufbau

Die Versuchstechnik geht auf eine von USSING und ZEHRAN 1951 entwickelte Methode zurück und dient der Erfassung von elektrophysiologischen Parametern unter *in vitro* Bedingungen (Ussing und Zerahn, 1951)

Die Schleimhaut wird in circa 3 cm x 3 cm große Stücke zerschnitten und so zwischen die beiden Hälften einer Ussingkammer eingespannt, dass serosal (= basolateral) wie mukosal (= apikal) das Gewebe mit einer Fläche von 3,14 cm² in Kontakt mit dem Lumen der Kammer steht. Auf beiden Seiten schützt ein Silikonring das Gewebe vor Beschädigungen im Randbereich. Die doppelwandigen Kammern sind im Inneren mit einer Pufferlösung (Zusammensetzung s. Tab. 23 im Anhang) gefüllt, die das Gewebe umgibt und die durch die Begasung (95% O₂, 5% CO₂) aus einem Gasliftsystem (Fa. Landgraf) ständig umgewälzt wird. Im äußeren Mantel umspült die Kammern Wasser aus einem 38°C warmen Wasserbad (Pumpthermostat: Haake D1) (Stevens, C. E., 1964).

2.4.2 Elektrische Messungen

Vor dem Einspannen der Epithelien in die Kammern wird der Flüssigkeitswiderstand der Pufferlösungen und das Elektrodeneigenpotential gemessen und für den Versuch gespeichert, um die späteren Messungen um diese Werte automatisch korrigieren zu können. Zur Messung der elektrischen Parameter dienen 2 gewebeernahe Kalium-Chlorid-Brücken, verbunden mit Ag-AgCl-Elektroden, welche die transepitheliale Potentialdifferenz erfassen, sowie 2 gewebeferne Agar-Brücken, verbunden über Ag-AgCl-Elektroden zur externen Stromspeisung. Potentialdifferenz (PD_t, mV) und Stromstärke (I, μA · cm⁻²) werden über eine computergesteuerte „voltage-clamp-Anlage“ (Windows, Clamp Version 2.02, Dipl. Ing. K. Mussler, Aachen) koordiniert und erfasst.

Etwa 45 Minuten nach dem Schlachtvorgang wird das Pansenepithel für 15 Minuten unter „*open circuit*-Bedingungen“ äquilibriert. Durch das Aussenden von Strompulsen (= ΔI, mit einer Amplitude von 100 μA, für die Dauer von 200 ms, im Abstand von 1 Minuten) kann die hierdurch kurzfristig veränderte Potentialdifferenz (= ΔPD) gemessen werden. Nach dem Ohm'schen Gesetz kann danach der transmurale Widerstand (= R_T) berechnet werden.

Gleichung 1

$$R_T = \frac{\Delta PD}{\Delta I_T}$$

Die Gewebeleitfähigkeit (= G_T) entspricht dem reziproken Wert des Gewebewiderstandes:

Gleichung 2

$$G_T = \frac{1}{R_T}$$

Das Pansenepithel wird weitere 30 Minuten unter Kurzschluss-Bedingungen (short-circuit) äquilibriert, bis sich ein „steady-state“ eingestellt hat. Hierbei wird das transepitheliale Potential durch unidirektional gerichteten, externen Strom auf 0 mV reduziert. Der sogenannte Kurzschlussstrom entspricht genau der Summe aller elektrogenen Ionenbewegungen des Epithels, so dass unter diesen Bedingungen ein elektrischer Gradient ausgeschlossen werden kann.

Da gleichzeitig auf beiden Seiten identische Pufferlösungen mit identischer Osmolarität eingesetzt werden, ist auch kein chemischer Gradient vorhanden. Wenn unter diesen Bedingungen ein Nettotransport stattfindet, kann also davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um einen aktiven Transport handelt.

2.4.3 Bestimmung der Transportraten für Natrium und Acetat

2.4.3.1 Ionenfluxmessungen

Durch Zugabe von radioaktiven markiertem Natrium (^{22}Na , s. 8.4) und Acetat (^{14}C , s. 8.4) kann der unidirektionale Flux dieser beiden Ionen gemessen werden. Pro Epithelstück kann nur eine Transportrichtung bestimmt werden. Für die Ermittlung der Nettotransportraten müssen jedoch beide Transportrichtungen an elektrophysiologisch ähnlichen Epithelien bestimmt werden. Die Paarbildung erfolgt anhand ähnlicher Gewebeleitfähigkeiten (G_T -Werte) mit weniger als 25 % Unterschied.

Gleichung 3
$$J_{net} = J_{ms} - J_{sm}$$

J_{net} = Nettotransport

J_{ms} = Transport von mucosal nach serosal (1. Epithelstück)

J_{sm} = Transport von serosal nach mucosal (2. Epithelstück)

Hierzu werden zunächst die Isotope (37 kBq ^{22}Na /Kammer, 54,6 kBq ^{14}C /Kammer) auf einer Seite des Epithels zugegeben. 45 Minuten später, nach Äquilibrierung der Isotope, wird sowohl auf der gleichen Seite („heiße Seite“) als auch der anderen Seite („kalte Seite“) eine Probe entnommen. Die Probe der heißen Seite (0,1 ml) dient der Bestimmung der spezifischen Aktivität, die der kalten Seite (1 ml) der Feststellung des Nullwertes. Im weiteren Verlauf werden der kalten Seite dreimal im Abstand von 30 Minuten Proben von je 1 ml entnommen, um den Ionentransport zu quantifizieren. Das Volumendefizit auf der kalten Seite wird sofort durch Zugabe von Pufferlösung ausgeglichen. Im Anschluss an die letzte Probe von der kalten Seite wird auf der heißen Seite eine zweite Probe (0,1 ml) für die Errechnung eines Mittelwertes zwischen den beiden heißen Proben benötigt (s.u.).

Um die Radioaktivität im Beta-Counter (Wallac 1409, Liquid Scintillation Counter, Fa. Wallac/PerkinElmer, Freiburg) zu ermitteln, müssen die Proben mit Szintillatorflüssigkeit (Quicksafe A, Flashpoint > 130°C, Cat. No. 1008000, Fa. Zinsser Analytic, Frankfurt) auf 4 ml aufgefüllt und zunächst per Hand geschüttelt und danach gevortext werden, um eine optimale Durchmischung zu erreichen. Die Szintillatorflüssigkeit verstärkt hierbei das Signal für die Zählung um ein Vielfaches.

2.4.3.2 Berechnungen

Um die Natrium- und Acetat-Fluxe berechnen zu können, muss zunächst die spezifische Aktivität ermittelt werden:

Gleichung 4
$$Ak_{spez} = \frac{cpm_h}{V_h \cdot c} [cpm \cdot \mu mol^{-1}]$$

- cpm = Radioaktivität der „heißen“ Probe (Mittelwert aus den 2 „heißen“ Proben)
[counts per minute]
- V_h = Volumen der „heißen“ Probe [ml]
- c = Konzentration des zu untersuchenden nicht radioaktiv markierten Isotops in der Pufferlösung [$\mu mol \cdot ml^{-1}$]

Anschließend ist es möglich, die Ionenfluxe nach folgender Formel zu berechnen:

Gleichung 5
$$J = \frac{cpm_2 \cdot \frac{V_s}{V_p} - cpm_1 \cdot \frac{V_s - V_p}{V_p}}{Ak_{spez} \cdot A \cdot t} [\mu eq \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}]$$

- J = Ionenflux [$\mu eq \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$]
- cpm_1 = ‘Counts per minute’ (Radioaktivität) der zu Beginn eines Fluxes entnommenen Probe
- cpm_2 = ‘Counts per minute’ (Radioaktivität) der am Ende des entsprechenden Fluxes entnommenen Probe
- V_s = Puffervolumen im Gasliftsystem [ml]
- V_p = Probenvolumen der „kalten“ Seite [ml]
- Ak_{spez} = Spezifische Aktivität [$cpm \cdot \mu mol^{-1}$]
- A = Gewebefläche [cm^2]
- t = Dauer eines Fluxintervalls (Zeit zwischen 2 „kalten Proben“) [h]

2.5 Molekularbiologische Untersuchungen

2.5.1 Übersicht

Das Ziel der molekularbiologischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit bestand in der Quantifizierung von Boten-RNA (messenger RNA, mRNA) bestimmter Gene in biologischen Proben (Pansenzotten), um Informationen über die Veränderung der relativen mRNA-Kopienzahl der betreffenden Gene in diesen Proben zu erhalten (Genexpressionsprofil, gene expression profile). Um zu ermitteln, ob und in welcher Menge die mRNA eines Gens in den Proben vorhanden ist, musste zunächst eine Isolierung der RNA aus den Proben erfolgen (siehe 2.5.2). Anschließend war eine reverse Transkription der RNA (RT, siehe 2.5.3) in copy DNA (cDNA) erforderlich. Die cDNA wurde in der Folge durch konventionelle (kPCR) oder quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) qualitativ oder quantitativ nachgewiesen. Die Kombination aus reverser Transkription und Polymerasekettenreaktion wird als kRT-PCR beziehungsweise als qRT-PCR bezeichnet. Für die PCR sind synthetisch hergestellte Oligonukleotide (Primer, siehe 2.5.4.5) 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 2.5.4.2) mit Hilfe der $\Delta\Delta$ CT-Methode zur relativen Quantifizierung (siehe 2.5.4.7). Das Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchungen war die Erkenntnis, wie viel mRNA eines bestimmten Gens in einer Probengruppe im Vergleich zu einer anderen Probengruppe enthalten ist.

2.5.2 RNA-Isolierung und RNA-Qualitätskontrolle

2.5.2.1 Stabilisierung der Proben-RNA

Zur Vermeidung von RNA-Abbau wurden die Proben sofort nach der Gewinnung stabilisiert. Dazu wurde jede Probe im zehnfachen Volumen (10 ml / g) RNA-Stabilisationsmedium (RNA-Later, Fa. Qiagen) aufgenommen und schnellstmöglich (innerhalb von maximal 24 Stunden) bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingelagert. Diese Behandlung gewährleistet die Stabilität der enthaltenen RNA über einen unbegrenzten Zeitraum (Mutter *et al.*, 2004).

2.5.2.2 Isolierung der Gesamt-RNA aus stabilisierten Proben

Aus den eingelagerten, stabilisierten Proben (siehe 2.5.2.1) wurde die Gesamt-RNA mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Systems (Nucleospin RNA II Kit, Fa. Macherey & Nagel) isoliert. Dazu wurden die bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerten Proben (siehe 2.5.2.1) aufgetaut und durch Skalpellsschnitte 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 (siehe oben) wurde die RNA in Lösung gebracht. Nach Zentrifugation zur Sedimentation der Zellreste (10 Sekunden bei 5000 x g) wurden 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 x 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 (siehe oben) 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 eine 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 Waschschritten und Trocknen der Säule durch Zentrifugation (5 Minuten bei 14000 x 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.

2.5.2.3 Bestimmung der RNA-Konzentration

Nach der RNA-Isolierung (siehe 2.5.2.2) wurde die Konzentration jeder Probe in einem Spektralphotometer (Biophotometer, Fa. Eppendorf) bestimmt. Durch Beurteilung der Verhältnisses der Extinktionen bei 230 nm, 260 nm, 280 nm und 320 nm wurde dabei eine grobe Klassifizierung der Probenreinheit vorgenommen. Dabei wurde eine maximale Extinktion bei 260 nm als Hinweis für eine reine RNA-Lösung bewertet, während maximale Extinktionen bei 230 nm (Salze) und 280 nm (Proteine) als Hinweise auf Verunreinigungen interpretiert wurden. Proben-RNA, die in der spektralphotometrischen Analyse maximale Extinktionen bei 230, 280 oder 320 nm aufwiesen, wurden aus den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Bis auf 2 Ausnahmen befand sich die Ratio 260/280 nm aller RNA-Proben in einem Bereich von 1,8 bis maximal 2,3, was als Hinweis auf eine gute bis sehr gute RNA-Qualität bewertet wurde. In den Ausnahmefällen betrug sie 1,3 und deutete damit auf eine mittlere RNA-Qualität hin. Die Proben wurden nach der Analyse auf 100 ng/µl verdünnt und bis zur Weiterverarbeitung bei – 80 °C gelagert.

2.5.2.4 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 (Bioanalytiker 2100, Fa. Agilent) untersucht. Bei diesem Verfahren wird die RNA der Probe elektrophoretisch aufgetrennt und fluorometrisch detektiert. Anhand des entstehenden Elektropherogramms wird durch die an das Gerät angeschlossene 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. Basierend auf Empfehlungen der Literatur wurden Proben mit einer RIN < 5 aus den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen (Schroeder *et al.*, 2006).

2.5.3 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Vor der PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion; siehe 2.5.4) musste die isolierte Proben-RNA (siehe 2.5.2) 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. In einem zyklisch programmierbaren Thermoblock (Thermocycler; Techne cyclone 25, Fa. PeqLab) wurde die Reverse Transkription (nach 5 Minuten Inkubation bei 25 °C) durch 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 von 20 µl auf 200 µl Lösungsvolumen verdünnt und bei -20 °C gelagert. Endprodukt des Verfahrens waren für jede Probe 200 µl cDNA, deren qualitative (enthaltenen Sequenzen) und quantitative (Kopienzahl der enthaltenen Sequenzen) Zusammensetzung die entsprechende Zusammensetzung der eingesetzten RNA-Probe widerspiegelt (Ginzinger, 2002).

2.5.4 Quantitative PCR

2.5.4.1 Überblick

Für die Erstellung von Genexpressionsprofilen (siehe 2.5.1) wird die Kopienzahl der gesuchten mRNA-Sequenz (Targetgen, gene of interest, GOI) relativ quantifiziert. Dies erfolgte in der vorliegenden Arbeit durch reverse Transkription (siehe 2.5.3) und anschließende quantitative PCR (qRT-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 2.5.5.4) nachgewiesen werden, ermöglicht es die qPCR, bei welcher nach jedem Amplifikationszyklus (siehe 2.5.4.4) 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 (iQCyler, Fa. Biorad; siehe 2.5.3) 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 nach 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 2.5.4.11) 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 2.5.4.5) 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 (siehe 2.5.4.7) 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 möglich (Bustin, 2000). Während es sich bei diesen Kontaminationen um verschiedene Sorten von dsDNA handeln kann, stellen Amplifikationsprodukte aneinander gelagerter Primer (Primerdimere, siehe

2.5.4.6) die häufigste Form dar. Zur Differenzierung zwischen spezifischem Produkt und Primerdimeren wurde die Probe daher im Anschluss an die qPCR einer allmählichen Temperaturerhöhung ausgesetzt, wobei die Fluoreszenz ständig kontrolliert wurde (Schmelzkurvenanalyse; siehe 2.5.4.4). Im Verlauf einer solchen Schmelzkurvenanalyse wird für jede Spezies an dsDNA (PCR-Produkt, Primerdimer) ein produktspezifischer Schmelzpunkt erreicht und die Moleküle der entsprechenden Spezies denaturierten in einzelsträngige DNA (single stranded DNA, ssDNA). Da bei dieser Temperatur der eingelagerte Farbstoff (SybrGreen) freigegeben wird und folglich nicht weiter fluoresziert, kommt es zu einem steilen Fluoreszenzabfall, dessen Temperatur für die entsprechende dsDNA-Sequenz charakteristisch ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden für jede Probe drei qPCR-Experimente pro GOI (gene of interest, siehe oben) durchgeführt und in Kombination ausgewertet (Triplet-Ansatz; siehe 2.5.4.5).

2.5.4.2 Referenzgen (housekeeping gene)

Zur Normalisierung der Daten aus qPCR-Experimenten wurden in der vorliegenden Arbeit die Expressionsrate eines Referenzgens (siehe unten) in den entsprechenden Proben in die Auswertung einbezogen (siehe 2.5.4.7). 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 Gene (Luxusgene) 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 dieses Gen zur Normalisierung eingesetzt (Kreuzer *et al.*, 1999).

2.5.4.3 qPCR Kontrollen

Bei der Präparation von RNA (siehe 2.5.2.2) besteht 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 (siehe 2.5.3) in qPCR-Experimenten zur Detektion der Gensequenz von β -Aktin eingesetzt (No RT-Control, NRC). Das Ergebnis dieser Untersuchung (C_T -Wert der qPCR zur Detektion von β -Aktin in 2,5 ng RNA) wurde durch relative Quantifizierung (siehe 2.5.4.7) mit dem Ergebnis einer entsprechenden Untersuchung in der korrespondierenden cDNA (C_T -Wert der qPCR zur Detektion von β -Aktin in cDNA 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 festgestellt.

Zur Prüfung der qPCR-Spezifität wurde in jedem qPCR-Experiment eine Negativkontrolle mitgeführt, bei welcher keine Probe (5 µl Wasser statt 5 µl cDNA, siehe 2.5.3) eingesetzt wurde (no template control, NTC). Experimente, in welchen die Negativkontrolle eine Amplifikation des spezifischen PCR-Produkts zu beobachten war (siehe 2.5.4.6) wurden wiederholt.

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

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten qPCR-Untersuchungsmethoden (qPCR-Assay) wurden in Vorversuchen bezüglich ihrer Sensitivität, Spezifität und Effizienz untersucht und bewertet (s. 2.5.4.11). Für den Einsatz in den qPCR-Experimenten wurden nur qPCR-Assays verwendet, die in den Vorversuchen als tauglich bewertet wurden.

2.5.4.4 Protokoll der qPCR

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, siehe 2.5.3), 0,5 µl (10 pmol) von jedem der beiden entsprechenden qPCR-Primer (sense und antisense, siehe 2.5.4.10), 12,5 µl qPCR Reaktionslösung (iQ SybrGreen Supermix) und 6,5 µl Wasser in ein Reaktionsgefäß zusammengeführt und im Thermocycler (siehe oben) inkubiert. Für die qPCR wurde ein einheitliches Temperaturprofil verwendet, welches nach Aktivierung der Polymerase durch dreiminütige Inkubation bei 95 °C aus 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). Im Verlauf dieser Zyklen wurde die Fluoreszenz der Proben während der Hybridisierung / Neustrangsynthese dauerhaft gemessen (Echtzeit-Datenanalyse, real time data analysis). Für die anschließende Schmelzkurvenanalyse (siehe 2.5.4.1) wurden die Proben 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 des Verfahrens standen für jede Probe die Daten aus drei Amplifikationskurven und drei Schmelzkurvenanalysen zur Verfügung.

2.5.4.5 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 Amplifikations- und Schmelzkurvendaten (siehe 2.5.4.4) analysiert. Nach Festlegung des C_T-Werts jeder Amplifikationskurve durch die Geräte-Software, welcher die Amplifikationskurve quantitativ charakterisiert und die Basis für die weiteren Berechnungen darstellt (siehe 2.5.4.1), wurden die drei C_T-Werte (Triplet, siehe 2.5.4.1) jedes zu untersuchenden Gens (GOI, gene of interest) jeder Probe zum arithmetischen Mittelwert verrechnet. 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.

2.5.4.6 Auswertung der Schmelzkurvenanalyse

Die Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse (siehe 2.5.4.1) jeder qPCR wurden mit den Ergebnissen der Etablierung der entsprechenden qPCR-Untersuchung (siehe 2.5.4.11) 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.

2.5.4.7 Bestimmung der relativen Expression

Die gemittelten C_T-Werte (siehe 2.5.4.1) einer Probe wurden zur Bestimmung der relativen Expressionsrate des zu untersuchenden Gens (gene of interest, GOI) mit Hilfe der $\delta\delta C_T$ -Methode zur relativen Quantifizierung untersucht (Livak und Schmittgen, 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurden die verwendeten Proben als *Testprobe* (*Test* = experimentell beeinflusste Probe, bei welcher die Abweichung der Expressionsrate des GOI gemessen werden soll) und *Basisprobe* (*Ctrl* = experimentell unbeeinflusste Probe, die als Bezug für die Testprobe dient (siehe unten)) bezeichnet. Die untersuchten Gene wurden als *Targetgen* (*Targ* = zu untersuchendes Gen (gene of interest, GOI); siehe 2.5.4.1) und *Referenzgen* (*Ref* = Referenzgen, mit dessen Hilfe die Expressionsrate des Targetgens normalisiert wird (siehe 2.5.4.2)) bezeichnet.

Bei der relativen Quantifizierung wird die Expressionsrate eines Targetgens (siehe oben) in einer Testprobe (siehe oben) im Vergleich zur Expressionsrate des gleichen Targetgens in einer Basisprobe (siehe oben) anhand von Ergebnissen aus qPCR-Experimenten (C_T-Werte, siehe 2.5.4.5) berechnet. Dabei werden die Expressionsraten des Targetgens in beiden Proben im Vergleich zu den Expressionsraten des Referenzgens (siehe oben) in den jeweils

gleichen Proben normalisiert. Die Berechnung der normalisierten, relativen Expression eines Targetgens in einer Testprobe im Vergleich zu einer Basisprobe erfolgt mit Hilfe der Formel

Gleichung 6
$$FC_{GOI} = 2^{-((RefCtrl - TargCtrl) - (RefTest - TargTest))}$$

FC_{GOI} = Fold Change (siehe unten) des zu untersuchenden Gens (gene of interest, GOI)

$RefCtrl$ = C_T -Wert des Referenzgens in der Basisprobe

$RefTest$ = C_T -Wert des Referenzgens in der Testprobe

$TargCtrl$ = C_T -Wert des Targetgens in der Basisprobe

$TargTest$ = C_T -Wert des Targetgens in der Testprobe

Das Ergebnis wird als Fold Change (FC) ausgedrückt und beschreibt die normalisierte Expressionsrate des GOI in der Testprobe (*Test*) als Vielfaches der normalisierten Expressionsrate des GOI in der Basisprobe (*Ctrl*). So ist etwa ein Ergebnis $FC_{NHE3} = 2$ gleichbedeutend mit der Aussage, dass in der Testprobe doppelt so viele Kopien an NHE3-mRNA vorliegen wie in der Basisprobe und ein Ergebnis $FC_{NHE3} = 0,5$ ist gleichbedeutend mit der Aussage, dass in der Testprobe halb so viele Kopien an NHE3-mRNA zu finden sind wie in der Basisprobe.

2.5.4.8 Gruppenauswertung

Da in der vorliegenden Arbeit mit experimentellen Gruppen (2.1) gearbeitet wurde, war keine logische Zuordnung einer bestimmten Testprobe (siehe 2.5.4.7) zu einer bestimmten Basisprobe (siehe 2.5.4.7) möglich. Daher erfolgte die Auswertung der Ergebnisse aus qPCR-Experimenten als Gruppenauswertung. Dabei wurden die qPCR-Ergebnisse der Basisprobengruppe zunächst zum so genannten δC_T -Wert ($\delta C_T = TargCtrl - RefCtrl$; siehe 2.5.4.7) verrechnet, welcher die normalisierte Expressionsrate des Targetgens (siehe 2.5.4.7) in den einzelnen Basisproben darstellt. Die so errechneten δC_T -Werte wurden in der Folge zum Median verrechnet, welcher die normalisierte Expressionsrate des Targetgens in der gesamten Basisprobengruppe charakterisiert. Die qPCR-Ergebnisse der Testprobengruppe wurden analog zu den Daten der Basisprobengruppe zu δC_T -Werten ($\delta C_T = TargTest - RefTest$) für jede Testprobe verrechnet. Die so kalkulierten δC_T -Werte der einzelnen Testproben wurden im abschließenden Schritt der Auswertung entsprechend der Formel zur relativen Quantifizierung (siehe Gleichung 6) mit dem Median der δC_T -Werte der Basisprobengruppe (siehe oben) zum FC_{GOI} (siehe 2.5.4.7) verrechnet (Livak und Schmittgen, 2001).

2.5.4.9 Darstellung der Ergebnisse

Für eine umfassende Beurteilung der Ergebnisse von qPCR-Experimenten ist neben der relativen Expressionsrate des Targetgens in den Testproben auch dessen Expressionsrate in den Basisproben sowie die Expressionsrate der Referenzgene in beiden Gruppen von Bedeutung (siehe 2.5.4.7). Daher wurden in der vorliegenden Arbeit für jedes qPCR-Experiment alle oben genannten Auswertungsaspekte analysiert und dargestellt.

Für jedes untersuchte Gen werden im Teil „Ergebnisse“ (s. 3.8.3) 3 Darstellungen gezeigt:

Die erste Darstellung zeigt die FC-Werte für das Ziel-Gen jeweils für die Kontrollgruppe (Heufütterung = 0 Tage KF) und die Testgruppen (2., 4., 7., 14., 28. und 42. Tag der Kraffutterzulage (2, 4, 7, 14, 28, 42 Tage KF)) als Einzelpunkte an den entsprechenden Tagen auf der Zeitachse (x-Achse). Die Punkte der Testgruppen stellen die FC-Werte der einzelnen Testproben gegenüber dem Median der Basisproben dar. Bei diesen Werten ist sowohl die Lage der Punkte als auch ihre Streuung zu beachten. Sind die Punkte als Gruppe gelagert und weichen im Mittel vom Wert 1 ab, ist dies ein Hinweis auf eine Änderung der mRNA-Kopienzahl gegenüber der Basisgruppe. Die Punkte der Basisgruppe stellen die FC-Werte der einzelnen Basisproben gegenüber dem Median der Basisproben dar. Der Median ist immer 1. Die Streuung der FC-Werte der Basisproben repräsentiert die Inhomogenität der relativen Expressionsrate des untersuchten Gens in der Basisgruppe.

Die zweite Darstellung zeigt die FC-Werte der Testgruppen und der Basisgruppe für das Kontrollgen (β -Aktin). Die Werte der Testgruppen zeigen die Transkriptionsraten des Kontrollgens bezogen auf den Median der Basisgruppe. Eine Abweichung mehrerer Werte vom Median der Basisproben zeigt eine systematische Abweichung der Transkriptionsrate des Kontrollgens in der Testgruppe von der Transkriptionsrate dieses Gens in der Basisgruppe (Bedeutung siehe Diskussion). Die Werte der Basisgruppe sind stets um den Wert 1 angeordnet. Die Streuung der FC-Werte für die Test- und Basisgruppe(n) zeigt eine Inhomogenität der Transkriptionsrate des Kontrollgens in der jeweiligen Gruppe an.

Die dritte Grafik stellt die Verteilung der FC-Werte der einzelnen Testproben für das untersuchte Gen gegenüber dem Median des normalisierten Gens der entsprechenden Basisproben dar. Ein klares Übergewicht an Proben in der Gruppe > 2 ist ein deutlicher Hinweis auf eine Steigerung der relativen mRNA-Kopienzahl, während ein klares Übergewicht an Proben in der Gruppe $< 0,5$ auf eine Verringerung der mRNA-Kopienzahl hinweist. Wenn sich die Werte zum erheblichen Teil in der Gruppe $>0,5$ und <2 befinden, hat keine Änderung der relativen mRNA-Kopienzahl stattgefunden.

2.5.4.10 qPCR Primer

Für das Anlagern der Taq-Polymerase (siehe 2.5.4.4) 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-Untersuchungsmethoden wurden entweder aus vorangegangenen Dissertationen der Arbeitsgruppe übernommen, aus der Literatur recherchiert oder selbst etabliert.

Zur Etablierung eines neuen qPCR assay 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, siehe 2.5.4.7). In der Sequenz des Targetgens wurde anschließend der kodierende Sequenzbereich (kodierende Sequenz, coding sequence, cds) softwaregestützt ermittelt (Biowire Jellyfish, Version 1.5). Dabei wurde für die vorliegende Arbeit definiert, dass der Adeninrest des Startcodons der kodierenden Sequenz als Nukleotid 1 bezeichnet wird und alle folgenden Nukleotide entsprechend nummeriert werden, wobei zwischengeschaltete, nicht kodierende Sequenzbereiche (introns) nicht in der Zählung berücksichtigt wurden. Innerhalb der kodierenden Sequenz (cds, siehe oben) wurden in der Folge durch Sequenzvergleich mit öffentlich verfügbaren annotierten Sequenzdatenbanken (European Bioinformatics Institute (EBI) Ensembl, www.ensembl.org) die Grenzen zwischen benachbarten kodierenden Sequenzbereichen (Exon-Exon-Grenzen) ermittelt (Lehninger *et al.* 2001). Abschließend wurden softwaregestützt (Primer3, http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) zwei ineinander verschachtelte Primerpaare (nested primer set) ermittelt, die alle um eine Exon-Exon-Grenze gruppiert sind (Rozen und Skaletsky, 2000). Die Integration von Exon-Exon-Grenzen sorgt neben der Behandlung der RNA durch DNase (siehe 2.5.2.2) für eine ausschließliche Detektion von cDNA (siehe 2.5.3), während genomische DNA (gDNA) nicht nachgewiesen wird. Bei der Ermittlung der Primersequenzen wurden die Standardparameter (default parameters) der Software (s. o.) verwendet (Idealwerte: PCR-Produktlänge = 175; Primerlänge = 20 Nukleotide; Schmelzpunkt (T_M) = 60 °C; GC-Gehalt = 50 %; Selbstkomplementarität = 0; 3'-Komplementarität = 0). Nach der Ermittlung der Sequenz wurden die entsprechenden Nukleotide kommerziell synthetisch hergestellt (Fa. MWG Biotech) und zum Abschluss der Etablierung des entsprechenden qPCR assay in Qualitätskontrollexperimenten (s. 2.5.4.11) untersucht.

2.5.4.11 qPCR Assay Etablierung

Für die Etablierung einer qPCR-Untersuchungsmethode (qPCR assay) wurden deren Sensitivität, Spezifität und Effizienz festgestellt. Weiterhin wurden die optimale Temperatur für Annealing und Elongation (s. 2.5.4.4) und der Schmelzpunkt des qPCR-Produkts ermittelt. Die Sensitivität bezeichnet die geringste Kopienzahl an Targetgen-Sequenz (2.5.4.7), die in einem qPCR-Experiment feststellbar ist und die Spezifität beschreibt die Neigung der eingesetzten qPCR-Primer (s. 2.5.4.10) zur ausschließlichen Bindung an die Targetsequenz, während die qPCR-Effizienz ein Maß für die Vervielfachungsrate des qPCR-Produkts in einem Zyklus (s. 2.5.4.4) der qPCR beschreibt. Die optimale Temperatur für Annealing und Elongation ist die Inkubationstemperatur während der Phase von Hybridisierung und Neustrangsynthese, bei welcher ein maximaler Unterschied zwischen spezifischer und Negativkontrollamplifikation besteht und der Schmelzpunkt des qPCR-Produkts beschreibt die Temperatur des stärksten Fluoreszenzsignalverlusts in der Schmelzkurvenanalyse (s. 2.5.4.6).

Zur Bestimmung der qPCR-Sensitivität wurde eine 7-stufige \log_{10} -Verdünnungsreihe des entsprechenden qPCR-Produkts (500 pg bis 0,5 fg) als Proben-DNA (template DNA) in qPCR-Experimenten mit den entsprechenden Primern untersucht. Die niedrigste Verdünnungsstufe, bei deren Verwendung eine qPCR-Amplifikation zu beobachten war, stellt die Grenze der Sensitivität des entsprechenden qPCR assay dar. Das Ergebnis kann als Masse (fg) oder als Kopienzahl ausgedrückt werden.

Die Spezifität des qPCR assay wurde in qPCR-Experimenten mit cDNA (s. 2.5.3) untersucht. Nach den Experimenten wurde (a) die Schmelzkurvenanalyse ausgewertet (s. 2.5.4.6), (b) das qPCR-Produkt durch DNA-Gelelektrophorese untersucht (s. 2.5.5.4) und (c) das qPCR-Produkt durch Sequenzanalyse untersucht (s. 2.5.5.6). Eine spezifische qPCR-Untersuchungsmethode wurde festgestellt, wenn (a) nur eine Amplitude in der Schmelzkurvenanalyse vorlag, wenn (b) genau eine Bande der erwarteten Größe in der Gelelektrophorese zu finden war und wenn (c) die ermittelte Sequenz mit der erwarteten Sequenz des qPCR-Produkts (s. 2.5.4.10) übereinstimmte.

Zur Bestimmung der qPCR-Effizienz wurde eine 6-stufige \log_{10} -Verdünnungsreihe aus RNA (1 μ g bis 10 pg) revers in cDNA transkribiert (s. 2.5.3) und anschließend für jede qPCR-Untersuchungsmethode (qPCR assay) mit den entsprechenden Primern untersucht. Die Bestimmung der qPCR-Effizienz erfolgte softwaregestützt durch eine Regressionsanalyse (s. 2.5.4.1). Ergebnis der Untersuchungen war die qPCR-Effizienz, welche in Prozent (100 % entspricht Verdoppelung der Menge an PCR-Produkt während der exponentiellen Zyklen (s. 2.5.4.1) der qPCR) oder als Steigung der Regressionsgeraden (slope) ausgedrückt werden kann (s. Gleichung 7). In der vorliegenden Arbeit wurden qPCR assays mit einer Effizienz von > 90 % für die Untersuchungen verwendet.

Gleichung 7
$$\text{Effizienz} = 10^{\left(-\frac{1}{\text{Slope}}\right)}$$

Die optimale Temperatur für Annealing und Elongation (s. 2.5.4.4) wurde durch ein qPCR-Experiment bestimmt, in welchem cDNA (s. 2.5.3) als Probe eingesetzt wurde. Das qPCR-Protokoll (s. 2.5.4.4) wurde für diese Untersuchungen in der Form abgewandelt, dass die Annealing / Elongation in Parallelansätzen bei unterschiedlichen Temperaturen (Gradienten-PCR; Temperaturgradient von 54 °C bis 64 °C) durchgeführt wurde. Ein Optimum liegt für die Temperatur vor, bei deren Verwendung ein größtmöglicher Unterschied zwischen spezifischer Amplifikation und Negativkontrollamplifikation besteht. Für die vorliegende Arbeit wurden qPCR-Untersuchungsmethoden eingesetzt, deren Temperaturoptimum bei 58 °C festgestellt wurde.

Der Schmelzpunkt des spezifischen qPCR-Produkts wurde in qPCR-Experimenten festgestellt, in welchen sequenzierte PCR-Produkte (s. 2.5.5.6) der entsprechenden Sequenz als Proben-DNA eingesetzt wurden. In der Auswertung der Schmelzkurvenanalyse (s. 2.5.4.6) wurde die Temperatur festgestellt, bei welcher das entsprechende qPCR-Produkt in Einzelstränge zerfällt.

Ergebnis der Etablierungsarbeiten war jeweils eine qPCR-Untersuchungsmethode mit bekannter und qualitätskontrollierter Sensitivität, Spezifität, Effizienz, Optimaltemperatur des Annealing- / Elongationsschritts sowie einem bekannten Schmelzpunkt des qPCR-Produkts.

2.5.5 Weitere molekularbiologische Verfahren

2.5.5.1 Qualitative PCR, kPCR

Die qualitative PCR (konventionelle PCR; kPCR) wird für die Amplifizierung spezifischer DNA-Stücke verwendet. Synthetisch hergestellte Oligonukleotide (Primer s. o.) binden am 5'-und 3'-Ende der zu amplifizierenden Sequenz, bevor eine DNA-abhängige DNA-Polymerase die Ausgangssequenz (Template) repliziert. Wiederholte Zyklen von Einzelstrangbildung (Denaturation), Primeranbindung (Annealing) und Neustrangsynthese (Elongation) führen zu einer exponentiellen Vermehrung des von den Primern flankierten Bereichs der Proben-DNA (Template-DNA). Als Endprodukt wird in vielfacher Kopie doppelsträngige lineare DNA spezifischer Sequenz gebildet, deren Länge in der DNA-Gelelektrophorese (s. 2.5.5.4) beurteilt werden kann.

2.5.5.2 RT-PCR

Bei der RT-PCR wird direkt zu dem PCR-Ansatz eine Reverse Transkriptase (s. o.) gegeben, die vor der PCR bei einer niedrigeren Temperatur (47 °C) eine RT durchführt. Danach folgt eine Temperaturerhöhung auf 94 °C, die gleichzeitig für eine Inaktivierung der Reversen

Transkriptase und für eine Aktivierung der DNA-Polymerase für die PCR sorgt (Reverse-iT™ One-Step RT-PCR-Kit, Fa. ABgene). Der weitere Ablauf entspricht dem der kPCR (s. o.).

2.5.5.3 PCR zur Vermehrung eines PCR-Produktes (Massen-PCR)

Für die Sequenzierung eines PCR-Produktes ist eine höhere Konzentration notwendig. Um dies zu erreichen, wird bei Bedarf die Menge an PCR-Produkt gesteigert. Bei einer Massen-PCR wird das RT-PCR-Produkt als Template in einer PCR eingesetzt, deren Ansatz mehrfach hergestellt wird. Im Folgenden wird die bei der Massen-PCR gewonnene DNA gereinigt (siehe 2.5.5.5).

2.5.5.4 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 elektrophoretisch aufgetrennt. Die Darstellung der DNA erfolgte durch Ethidiumbromid und anschließende Belichtung auf einem UV-Illuminator (Chemi Imager 5500, Fa. Alpha-Innotech).

2.5.5.5 Aufreinigung eines PCR-Produktes

Zur Reinigung von PCR-Produkten oder anderer kleiner DNA-Mengen aus unreiner wässriger Lösung wurde ein kommerziell erhältliches System (Qiaquick PCR product purification kit, Fa. Qiagen) eingesetzt. Dieses Verfahren basiert auf der Wirkung von Affinitätssäulen und setzt unreine wässrige DNA-Lösungen in gereinigte wässrige DNA-Lösungen um.

2.5.5.6 Sequenzierung

Zur Bestimmung der Sequenz von PCR-Produkten wurden diese in gereinigter Form (siehe 2.5.5.5) an ein kommerzielles Sequenzierungslabor (Fa. SeqLab) versandt und dort sequenziert.

2.6 Untersuchung der Pansenflüssigkeit

2.6.1 Gewinnung der Pansenflüssigkeit

Für die Pansensaftuntersuchung wurden 6 Schafe operativ mit einer Pansenfistel versehen (s. 8.2), über die ein direkter Zugang zum Panseninhalt möglich war (s. Abb. 67 im Anhang). Die Fistelöffnung war mit einem Schraubdeckel verschließbar. Das Ansaugen des Pansensaftes erfolgte durch ein Plastikrohr, das in flexibler Verbindung (kurzes Gummischlauchstück) zu einer 100 ml Spritze (Fa. BD Plastipak) den nötigen Unterdruck erzeugte.

Bei allen 6 Tieren erfolgte eine Probennahme im stündlichen Abstand, wobei die erste Probe direkt vor der morgendlichen Fütterung um 7 Uhr gewonnen wurde. Bis 15 Uhr wurden bei jedem Schaf 9 Pansensaftproben gesammelt und sofort weiterverarbeitet. Nach dem Ansaugen von ca. 25 ml Pansensaft in die Spritze wurde die Verbindung der Spritze zum Plastikrohr getrennt und die Pansenflüssigkeit durch ein feines (Tee-) Sieb in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen (Fa. Roth) gefiltert. Das Röhrchen wurde verschlossen und sofort auf Eis gestellt. Die Pansensaftentnahme dauerte pro Tier ca. 1 Minute.

Zwischen den Probennahmen wurde die Sonde unter fließendem Wasser gereinigt und abgetrocknet. Die 100 ml Spritze wurde ebenfalls durch mehrmaliges Ansaugen und Ausspritzen von Wasser von Pansensaftresten befreit.

Um Vergleiche zwischen der Zusammensetzung der Pansenflüssigkeit und dem Verhalten des Gewebes in der Ussing-Kammer ziehen zu können, wurden als Untersuchungszeitpunkte die Tage gewählt, an denen bei den anderen Tiergruppen die Ussing-Kammer-Versuche stattgefunden hatten, d.h. die Pansenflüssigkeit wurde in der oben beschriebenen Weise am letzten Tag vor der KF und am 2., 4., 7., 14., 28. und 42. Tag der KF entnommen.

2.6.2 Volumenmarker Chromium-EDTA

Um einen Hinweis auf Volumenänderungen durch Wassereinstrom und -resorption in den Pansen und Abfluss in Richtung Blättermagen zu bekommen, wurden 120 ml einer Chromium-EDTA-Lösung (Komponenten und Herstellung s. 8.5 im Anhang) 1 Stunde vor der ersten Probennahme (s. o.) eingegeben, um bis zur Beprobung eine angemessene Verteilung zu gewährleisten. Pro Tier wurden 120 ml der Chromium-EDTA-Lösung vor der Eingabe in den Pansen im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt und mit 30-50 ml frisch entnommenem Pansensaft des jeweiligen Schafes vermischt.

2.6.3 Messungen in der Pansenflüssigkeit

2.6.3.1 Bestimmung von pH-Wert und Ammonium-Konzentration der Pansenflüssigkeit

Der pH-Wert des Pansensaftes wurde sofort nach der Entnahme der Proben von allen 6 Tieren durch eine pH-Elektrode (Elektrode: Fa. Metrohm, Messverstärker: Digital-pH-Meter 646, Fa. Knick) bestimmt. Vor den Messungen wurde die Elektrode mit Standard-Lösungen kalibriert. Die Elektrode wurde in die Pansenflüssigkeit eingetaucht und der pH-Wert abgelesen, sobald dieser stabil blieb.

2 ml der Pansenflüssigkeit wurden für die Untersuchung des Ammonium-/Ammoniak-Gehaltes abgenommen und in ein Glasröhrchen mit Deckel überführt. Die Messung mit einer gas-sensitiven Ammoniak-Elektrode (Fa. Jumbo) begann ca. 12 Minuten nach der

Probennahme. Um alle in der Pansenflüssigkeit vorhandenen Ammonium-Ionen zu deprotonieren, wurde der pH-Wert der Flüssigkeit unter Rühren (Magnetrührer) durch Zugabe von 100 µl 10 molarer Natriumhydroxid-Lösung stark alkalisiert (pH 13). Danach wurde sofort der Messkopf so eingetaucht, dass die Membran vollständig mit der Flüssigkeit in Kontakt stand (ca. 3 mm unter der Oberfläche). Dabei wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen unter der Membran befanden. Das entstehende Ammoniak-Gas wird über die gas-sensitive Membran in die Sonde aufgenommen und bewirkt eine Änderung der Aussen-Elektrolyt-Lösung im Inneren der Sonde. Die Spannung zwischen dieser Aussen-Elektrolyt-Lösung und der Innen-Elektrolyt-Lösung der Sonde wird (vom Messverstärker: Digital-pH-Meter 646, Fa. Knick) in mV angezeigt. Das Ablesen des Wertes erfolgte, sobald dieser stabil war. Zwischen den Messungen wurde der Messkopf gründlich mit destilliertem Wasser gereinigt.

Die Messwerte wurden mit Hilfe von Standardlösungen (1 mmol/l und 10 mmol/l NH₄Cl) in mmol/l NH₃ umgerechnet (Gleichung 8, Gleichung 9). In die anschließende Berechnung des NH₄⁺-Gehaltes wurden die vorher ermittelten pH-Werte einbezogen (Gleichung 10 nach Henderson-Hasselbalch).

Gleichung 8
$$\text{Elektrodenpotential} = a \cdot \ln[\text{NH}_3] + b$$

b = Elektrodenpotential (E_p) bei 1 mmol/l NH₃

a = E_{p 2} - E_{p 1} / LN (y)

E_{p 1} = Elektrodenpotential bei 1 mmol/l NH₃

E_{p 2} = Elektrodenpotential bei 10 mmol/l NH₃

y = NH₃ [mmol/l] bei E_{p2}

Gleichung 9
$$\text{NH}_3 [\text{mmol/l}] \text{ Probe} = e^{(E_p \text{ Probe} - b/a)}$$

Gleichung 10
$$\text{NH}_4^+ [\text{mmol/l}] \text{ Probe} = \text{NH}_3 [\text{mmol/l}] \text{ Probe} / (10^{\text{pH} - \text{pKs}} + 1)$$

pKs (NH₃) = 9,25

pH = pH der Probe

2.6.3.2 Bestimmung der flüchtigen Fettsäuren in der Pansenflüssigkeit

Nach Zentrifugation (10 min bei 5000 rpm) erfolgte eine Stabilisation der flüchtigen Fettsäuren des Pansensaftes. Dazu wird 10 ml der Pansenflüssigkeit in einem neuen Röhrchen mit 1 ml 25%iger Schwefelsäure versetzt, gemischt, und für weitere 20 min bei 5000 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand wird mit 1 Tropfen gesättigter Quecksilberchlorid-Lösung gemischt und sofort bei -20°C eingefroren.

Die Proben wurden in der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL) (Bundesallee 50, 38116 Braunschweig, <http://www.fal.de/>) mittels Gaschromatographie auf ihren Gehalt an den flüchtigen Fettsäuren Acetat, Propionat und Butyrat untersucht.

2.6.3.3 Bestimmung von Natrium- und Kaliumkonzentration und des Chrom-Gehaltes in der Pansenflüssigkeit durch Atomabsorptions-Spektroskopie (AAS)

Im Anschluss an die Zentrifugation (10 min bei 5000 rpm) wurden je 1 ml pro Probe für die Untersuchung der Natrium- und Kaliumkonzentration und des Gehaltes an Chromium-EDTA in ein Eppendorfgefäß pipettiert und bis zur weiteren Untersuchung im Institut für Tierernährung der FU Berlin (Institutsteil Dömane Dahlem, Königin-Luise-Straße 49, 14195 Berlin) mittels Atomabsorptionsspektrometrie bei – 20 °C eingefroren.

Die Proben wurden für die Messung im AAS Vario 6 (Analytik Jena) nach dem Auftauen zunächst verdünnt. Als Verdünnungsmedium wurde bei den Chrom-Messungen ein Gemisch aus 950 ml Reinstwasser und 50 ml Salzsäure (37%, Fa. J.T. Baker) zugesetzt. Für die Bestimmung von Natrium und Kalium diente ein Gemisch aus 900 ml Reinstwasser, 50 ml Salzsäure (s. o.) und 50 ml Schinkellösung (Cäsiumchlorid-Lanthanchlorid-Pufferlösung nach Schinkel, Fa. Merck) als Verdünnungslösung. Die Verdünnungsstufe wurde je nach optimalem Messbereich (s. u. bei Kalibrierung) und Gehalt der Proben gewählt. Daraus ergab sich für die Chrom-Messungen eine Verdünnung von 1:50, für die Natrium-Messungen 1:2000 und für die Kalium-Messungen 1:1000.

Als Brenngas wurde ein Acetylen-Luft-Gemisch verwendet. Das Linienspektrum liegt für Chrom bei 357,9 nm, für Natrium bei 589,6 nm und für Kalium bei 766,5 nm.

Vor Mess-Beginn wurde das Gerät mit 5 Standardlösungen (Ausgangslösung: 100mg/l, Fa. Merck) kalibriert (Null-Wert und 4 Standardlösungen (für Chrom 0,4 bis 3 mg/l, für Natrium 0,1 bis 0,5 mg/l, für Kalium 0,5-2 mg/l)). Dabei wurde vorausgesetzt, dass das Bestimmtheitsmaß der Kalibriergeraden mindestens 0,99 betragen sollte. Der Nullabgleich erfolgte jeweils nach 4 Probenmessungen.

Für jede Probe erfolgte eine dreifache Messung.

2.6.3.3.1 Berechnung von Pansenflüssigkeitsvolumen, Turnover und Abfluss in den Psalter

Aus den Werten der dreifachen Bestimmung wurde ein Mittelwert gebildet. Die Standardabweichung in der verdünnten Ausgangslösung lag bei 0,016 (Natrium), 0,015 (Kalium), 0,026 (Chrom) mg/l im Mittel.

Die erhaltenen Werte für Natrium und Kalium wurden mit Gleichung 11 von mg/l in mmol/l umgerechnet

$$n = \frac{M}{m}$$

Gleichung 11

n = Stoffmenge [mol]

M = Molmasse [g/mol]

m = Masse [g]

Für Chrom erfolgte eine Umrechnung auf das im Pansen vorliegende Volumen. Dafür muss die Chrom-Konzentration direkt nach der Eingabe (C_0) bekannt sein.

Die Abnahme der Chrom-Konzentration in der Pansenflüssigkeit folgt einer exponentiellen Funktion:

Gleichung 12
$$C_t = C_0 \times e^{-kt}$$

C_0 = Marker-Konzentration direkt nach Eingabe (mg/l)

C_t = Marker-Konzentration bei Zeit t

t = Zeit (Stunden)

k = Konstante

Die Konstante k wurde folgendermaßen ermittelt: Für jedes einzelne Tier und für jede Fütterungsstufe wurden die Chromkonzentrationen der Stunden 4 – 9 (für die Stunden 1, 2 und 3 erwies sich die Streuung als zu groß) nach Eingabe der Chrom-Lösung in ein Diagramm eingetragen. Nach logarithmischer Skalierung der x-Achse konnte eine Regressionsgerade durch die Punkte gelegt werden. Mithilfe der Gleichung der Regressionsgeraden wurden die Werte für die Chromkonzentration 5 und 8 Stunden nach der Fütterung berechnet (idealisiert). Die idealisierten Werte konnten in die folgende Gleichung zur Berechnung von k eingesetzt werden:

Gleichung 13
$$k = \frac{\ln C_5 - \ln C_8}{8 - 5}$$

C_5 = Chromkonzentration in der Pansenflüssigkeit 5 Stunden nach Eingabe (s. o.)

C_8 = Chromkonzentration in der Pansenflüssigkeit 8 Stunden nach Eingabe (s. o.)

C_0 entspricht dem y-Achsenabschnitt der oben erwähnten Regressionsgeraden.

Das Volumen der Pansenflüssigkeit bei Eingabe des Markers wird nach folgender Funktion berechnet:

Gleichung 14

$$\frac{D}{C_0} = V$$

C_0 = Konzentration des Markers zum Zeitpunkt der Marker-Eingabe (mg/l)

D = Menge des Markers im Pansen (mg)

V = Volumen der Pansenflüssigkeit

In einem Liter der eingegebenen Chrom-EDTA-Lösung sind 2,77 g Chrom enthalten, so dass 120 ml (tatsächlich eingegebenes Volumen) 330 mg eingegebenem Chrom (D) entsprechen. Von dem errechneten Volumen wurden die eingegebenen 120 ml wieder abgezogen.

Aus der oben genannten Konstante k kann eine Aussage über die Umwälzung (Turnover) der Pansenflüssigkeit gemacht werden, die beschreibt, wie groß der Anteil ist, der aus dem Pansen in Richtung Blättermagen abfließt. Dabei wird angenommen, dass das Volumen des Pansens konstant bleibt und die Wasserabsorptionskapazität der Pansenwand gering und daher zu vernachlässigen ist. Der Wert 1 bedeutet, dass ein vollständiger Turnover pro Zeiteinheit stattgefunden hat, bei einem Wert von 0,5 fließt nur die Hälfte der Ursprungsmenge pro Zeiteinheit weiter. Nach Multiplikation mit 100 kann eine prozentuale Angabe über den Teil der Flüssigkeit getroffen werden, der in Richtung Blättermagen fließt.

Die tatsächlich zum Psalter abfließende Menge an Pansenflüssigkeit wird (bei der Annahme eines konstanten Flüssigkeitsvolumens im Pansen) durch die Gleichung 15 berechnet.

Gleichung 15

$$f = k \times V$$

k = Konstante (s. o.)

V = Volumen der Pansenflüssigkeit

f = Ausfluß aus dem Psalter (ml/h)

2.6.3.4 Bestimmung der Osmolalität in der Pansenflüssigkeit

Nach der Zentrifugation (10 min bei 5000 rpm) wurde 1 ml pro Probe in ein Eppendorfgefäß pipettiert und bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C eingefroren. Für die Bestimmung der Osmolalität musste der Pansensaft zunächst entgast werden. Nach dem Auftauen bei Zimmertemperatur wurden die Proben für 15 Minuten bei 99°C erhitzt (Thermomixer compact, Fa. Eppendorf) und anschließend nochmals bei 13.000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. 50 μl des Pansensaftes in einem 0,5 ml Eppendorfgefäß wurden für die Analyse mit dem Osmomat 030-D (Fa. Gonotec GmbH) eingesetzt. Das Gerät wurde jeweils nach 30 Probenmessungen mit destilliertem Wasser kalibriert.

2.7 Blutuntersuchung

2.7.1 Blutgewinnung

Sowohl den Tieren für die Ussing-Kammer-Versuche, als auch den Tieren für die Untersuchung der Pansenflüssigkeit, wurden während der Heufütterung und der Kraffutterfütterungs-Periode Blutproben (verwendetes Material s. 8.7) aus der Vena jugularis entnommen.

Bei den Tieren für die Ussing-Kammer-Versuche erschienen hierfür der Zeitpunkt der Heufütterung in der Gruppe und der Tag vor der Schlachtung als sinnvoll.

Bei den Tieren für die Untersuchung der Pansenflüssigkeit wurden zunächst in der Heufütterungsperiode in Einzelaufstallung, ferner am 4. Tag der KF, am 7.Tag der KF und im Folgenden im wöchentlichen Abstand Blutproben entnommen.

Die Probennahme fand jeweils am Nachmittag um 15 Uhr 30 statt. Das Vollblut wurde in EDTA-K-Röhrchen an der Gerinnung gehindert. Für die Serumgewinnung wurde das Blut in speziellen Serum-Röhrchen für 10 Minuten bei 3000 g zentrifugiert und anschließend 2 ml des Serums in neutrale Serum-Röhrchen des Labors für klinische Diagnostik (s.u.) überführt. Bis auf die Leukozytendifferenzierung (s. u.) wurden die Untersuchungen spätestens am nächsten Tag (weniger als 24 Std.) im Labor für klinische Diagnostik, Berlin-Lichterfelde durchgeführt. Bis zur Analyse wurden die Proben gekühlt (4°C).

2.7.2 Untersuchungen im Blut

2.7.2.1 Kontrolle auf Krankheiten/Stoffwechselstörungen

Es erfolgte in Vollblut und Serum eine Kontrolle auf Krankheiten bzw. Stoffwechselstörungen durch eine Auswahl an Entzündungs-, Stoffwechsel- und speziellen Organparametern:

- Leukozyten, Gesamteiweiß, Leukozytendifferenzierung
- ASAT (GOT), GLDH, Bilirubin, Kreatinin, Harnstoff
- Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, Erythrozytenindices, Thrombozyten
- Kalium, Natrium, Chlorid
- Glucose im Serum

2.7.2.2 Leukozytendifferenzierung

Ein Tropfen des EDTA-Vollblutes wurde auf einem sauberen Objektträger ausgestrichen und nach Trocknen an der Luft wie folgt gefärbt: Zunächst erfolgte eine 5-minütige Überschichtung mit unverdünnter May-Grünwald-Lösung, dann wurde die gleiche Menge Aqua dest. darauf gegeben und 3 Minuten gewartet. Nach Abgießen der Flüssigkeit wurde verdünnte Giemsa-Lösung (2,5 ml auf 50 ml) aufgetragen. Nach 15 min wurde gründlich mit A. dest gespült und der Ausstrich wiederum an der Luft getrocknet. Nach dem Trocknen

wurde der Ausstrich mit einem Tropfen Immersionsöl unter dem Mikroskop bei 100-facher Vergrößerung mäanderförmig durchgemustert und 100 Zellen differenziert.

2.7.2.3 Bestimmung von IGF-1

Die Serum-Proben der 6 Schafe mit Pansenfistel wurden nicht nur auf die oben erwähnten Parameter, sondern auch auf ihre Konzentration an Insulin-growth-factor 1 (IGF-1) geprüft. Dafür wurde ca. 1 Stunde nach Blutentnahme je 1 ml des Serums (Serumgewinnung s.o.) bis zur Bestimmung bei – 20 °C gelagert. Die Untersuchung mittels ELISA (Fa. dpc Biermann) übernahm das VMDI (Veterinärmedizinisch-Diagnostisches Privat-Institut GmbH, Sonnenburger Str. 70, 10437 Berlin).