

3. Methoden

(Die Zusammensetzungen der Puffer etc. finden sich stets am Ende eines Abschnittes.)

3.1 Immunfluoreszenzmikroskopie

3.1.1 Gewebereinbettung

Adulte Wistar-Ratten (ca. 300 g) wurden mit Diethylether in tiefe Narkose versetzt und sofort dekapitiert. Unmittelbar nach ihrer Tötung wurden den Tieren Magen, Dünndarm und Nieren entnommen. Diese Organe sowie frische Magenbiopsate des Menschen wurden sofort in ca. 1-3 mm³ große Stücke zerteilt, in PFA (4%, 4°C, pH 7,4) überführt und für 60 min. auf Eis vorsichtig bei 60 rpm geschüttelt.

Direkt im Anschluss an die PFA-Fixierung wurden die Gewebe durch die nachfolgend aufgeführte Alkoholreihe entwässert. Die einzelnen Inkubationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur.

- zweimal 15 min. in 70% Ethanol
- je 30 min. in 80%, 90%, 95% und 99% Ethanol
- zweimal 15 min. in 100% Ethanol

Der Alkohol in den Gewebestücken wurde anschließend schrittweise durch Propylenoxid, Propylenoxid-Epon-Gemische und abschließend durch Epon (Komponente A) ersetzt. Folgende Inkubationen wurden hierfür bei Raumtemperatur durchgeführt:

- zweimal 5 min. in reinem Propylenoxid
- je 60 min. in einer 2:1-, 1:1- und 1:2-Mischung aus Propylenoxid und Epon (Komp. A)

Danach wurden die Gewebestücke in ein neues Gefäß mit Epon (Komponente A + B) überführt und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Die in Epon aufgenommenen Gewebestücke wurden als nächstes in Gelatine kapseln überführt, mit Epon (Komponente A + B) überschichtet und zur Auspolymerisation des Kunstharzes für mindestens 12 h bei 60°C in einen Wärmeofen gestellt.

Ansatz des PFA (4 %):

- 40 g PFA in 500 ml dH₂O auf 70°C erhitzen
- unter Rühren einige Tropfen 10 molarer NaOH hinzufügen, bis Lösung klar wird
- Lösung abkühlen lassen und filtrieren
- 500 ml 0,2 M Phosphatpuffer mit pH 7,4 hinzufügen

Phosphatpuffer:

NaH₂PO₄ (M = 137,99 g/mol) → 100 mM

Na₂HPO₄ (M = 141,98 g/mol) → 100 mM

in dH₂O

Alkoholreihe nach BÖHME UND HARTKE (1978):

70% → 62,40 g 100-%-iges Ethanol + 37,60 g dH₂O

80% → 73,51 g 100-%-iges Ethanol + 26,49 g dH₂O

90% → 85,68 g 100-%-iges Ethanol + 14,32 g dH₂O

95% → 92,43 g 100-%-iges Ethanol + 7,57 g dH₂O

99% → 98,38 g 100-%-iges Ethanol + 1,62 g dH₂O

100% → 100 g 100-%-iges Ethanol

Epon-Komponenten:

Komponente A: 5,35 g Epoxy-Einbettungsmittel

3,90 g Epoxy-Einbettungsmittel, Härter DDSA

3,25 g Epoxy-Einbettungsmittel, Härter MNA

Komponente B: 0,25 g Epoxy-Einbettungsmittel, Beschleuniger

3.1.2 Immundetektion von Gewebeproteinen

Von den in Epon eingebetteten Geweben wurden mithilfe eines Ultramikrotoms semi-dünne Schnitte mit 1 µm Schichtdicke angefertigt. Die Schnitte wurden auf Deckgläser überführt und auf einer 80°C-warmen Heizplatte getrocknet.

Probeschnitte wurden mit Toluidin-Blau-Lösung (1%) gefärbt, um den Erfolg der Gewebeeinbettung beurteilen zu können und eine histologische Übersicht zu erhalten.

Toluidin-Blau-Lösung (1%):

dH ₂ O	→	100 ml
Na ₂ B ₄ O ₇ · 10 H ₂ O	→	1 g
Toluidinblau	→	1 g
Saccharose	→	40 g
pH = 9,35 einstellen		
vor Gebrauch filtrieren		

Um die im Schnitt enthaltenen Gewebeproteine für die Antikörperdetektion zugänglich zu machen, sind die Deckgläser mit den Eponschnitten anschließend einer Entharzungsreihe unterzogen worden, bei der das Einbettungsmedium Epon mittels Methanolat herausgelöst wurde.

Entharzungsreihe zum Herauslösen des Epons:

- 6 min. in Natriummethanolat
- 5 min. in 1:1-Methanol-Toluol-Mischung
- zweimal 5 min. in Aceton
- 5 min. in dH₂O
- 5 min. in PBS

Die Deckgläser mit den Gewebeschnitten wurden anschließend in eine lichtundurchlässige feuchte Kammer überführt und mit je 50 µl einer 5%-igen BSA- oder einer 3%-igen Pferdeserum-Lösung in PBS für 60 min. vorinkubiert, um unspezifische Bindungsstellen des Gewebes abzusättigen.

Es folgte die Inkubation mit je 50 µl der Primärantikörperlösung (1:50 bis 1:400 in 1%-iger BSA- oder Pferdeserum-Lösung) bei 4°C über Nacht. Es schloss sich die Inkubation mit je 50 µl OregonGreen[™] - oder TexasRed[™]-konjugiertem Sekundärantikörper (1:200 oder 1:400 in 1%-iger BSA- oder Pferdeserum-Lösung) bei Raumtemperatur für 1 h an. Nach jeder Inkubation wurden die Schnitte dreimal 5 min. mit PBS gespült. Als letztes erfolgte das Eindecken der Präparate mit je einem Tropfen Immu-Mount[®].

PBS (phosphate buffered saline):

NaCl	→	137 mM
KCl	→	2,68 mM
Na ₂ HPO ₄	→	9,58 mM
KH ₂ PO ₄	→	1,47 mM
in dH ₂ O		

3.2 Proteinbiochemie**3.2.1 Präparation von Gallenkanälchen aus Rattenleber**

Die Gallenkanälchenpräparation wurde bis auf leichte Modifikationen nach der Methode von TSUKITA UND TSUKITA (1989) durchgeführt.

Es wurden adulte Wistar-Ratten (ca. 300 g) mit Diethylether in tiefe Narkose versetzt und sofort dekapitiert. Die Leber wurde vorsichtig entnommen und sogleich in kaltes PBS (4°C) überführt. Alle folgenden Schritte wurden ebenfalls bei 4°C durchgeführt. Nach grober Zerkleinerung der Leber mithilfe von Skalpellklingen erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit 10 Vol. einer hypotonen Bicarbonatlösung (HBC-Puffer). Im Anschluss daran erfolgte eine gründliche Homogenisierung in einem Dounce-Homogenisator (10 x bei 900 rpm in 2 Vol. HBC-Puffer). Das Homogenat wurde mit HBC-Puffer auf 400 ml verdünnt, durch vier Schichten Gaze filtriert und das Eluat für 10 min. bei 1500 x g zentrifugiert. Die Sedimente wurden in HBC-Puffer resuspendiert und anschließend auf 13,1 ml verdünnt. Zu den 13,1 ml Suspension wurden dann 96,9 ml einer 55%-igen (w/v) Sucrose-Lösung gegeben, was nach gründlicher Durchmischung zu einer Endkonzentration der Sucrose von 48,5% führte. Die Suspension wurde auf sechs Röhrchen zu je ca. 18 ml verteilt, vorsichtig mit jeweils 2 ml einer 42,9%-igen Sucrose-Lösung überschichtet und für 60 min. bei 100.000 x g zentrifugiert. Die mit Gallenkanälchen angereicherte Membranfraktion befand sich danach an der Grenzschicht zwischen der 42,9%-igen und der 48,5%-igen Sucrose. Mit einer Hamilton-Spritze konnte diese Schicht vorsichtig extrahiert werden. Die gewonnene Membranfraktion wurde dann mit 10 Vol. HBC-Puffer verdünnt und für 30 min. bei 4000 x g zentrifugiert. Die resultierenden Sedimente enthielten die hoch angereicherte Gallenkanälchenfraktion.

Für die spätere Darstellung der enthaltenen Proteinbanden mittels SDS-PAGE (**siehe 3.2.2**) wurde das Sediment zur Denaturierung der Proteine mit 3-fach-Probenpuffer im Verhältnis 1:3 versetzt und für 10-20 min. bei 95°C unter Schütteln im Thermomixer belassen.

Ansatz der hypotonen Bicarbonatlösung (HBC-Puffer):

NaHCO ₃	→	1 mM
Leupeptin (pH 7,5) in dH ₂ O	→	2 µg/ml

3.2.2 Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen wurde die diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in Modifikation nach LAEMMLI (1970) angewandt. Es wurden 12%-ige Trenngele von 6 x 9 cm Größe sowie 3,75%-ige Sammelgele verwendet, deren Zusammensetzung in modifizierter Weise nach ANDERSON UND PETERSON (1981) erfolgte.

Die Proben wurden mit 3-fach-Probenpuffer (LAEMMLI, 1970) vermischt und für 10-20 min. bei 95°C unter Schütteln im Thermomixer belassen. Die Überführung der Proben in die Geltaschen erfolgte mithilfe einer Hamilton-Spritze. Zur Elektrophorese wurde für das Durchlaufen des Sammelgels eine Spannung von $U = 80 \text{ V}$ und für das Durchlaufen des Trenngels eine Spannung von $U = 150 \text{ V}$ angelegt. Hierbei war darauf zu achten, die Stromstärke zwischen $I = 20$ und 50 mA zu halten.

Zur Bestimmung der Molekulargewichte der zu untersuchenden Proteinbanden wurden in den zwei randständigen Taschen einmal 3 µl eines LMW-Markers (14,5-97,4 kDa) und einmal 20 µl lysierter Erythrozytenmembranen (HG-Marker, 23-240 kDa) bei der Elektrophorese mit aufgetrennt.

Zusammensetzung der Gele:

	Trenngel 12%	Sammelgel 3,75%
Puffer	2000 μ l „Tris II“	500 μ l „Tris I“
Acrylamid (30%)	3200 μ l	250 μ l
Bisacrylamid (2%)	1280 μ l	100 μ l
dH₂O	1520 μ l	1150 μ l
Bromphenolblau	---	4 μ l
TEMED	10 μ l	2,6 μ l
APS (10%)	80 μ l	20 μ l

Trenngelpuffer („Tris II“):

Tris(Base) → 1,5 M
 pH → 8,8 einstellen mit HCl
 SDS → 0,4%
 in dH₂O

Sammelgelpuffer („Tris I“):

Tris(Base) → 500 mM
 pH → 6,8 einstellen mit HCl
 SDS → 0,4%
 in dH₂O

Elektrophoresepuffer:

Glycin → 1,44%
 Tris(Base) → 0,3%
 SDS → 0,1%
 in dH₂O

3.2.3 Anfärbung der Proteinbanden in SDS-Polyacrylamidgelen

Zur Darstellung der Proteinbanden in einem SDS-Gel wurde die Methode nach ANDERSON UND PETERSON (1981) angewandt. Hierfür wurden die Gele nach der Elektrophorese in Coomassie-

Färbelösung für 3 min. in der Mikrowelle gefärbt. Die Entfärbung bis zur deutlichen Darstellung der Bandenstrukturen erfolgte in dH₂O durch wiederholtes Erhitzen in der Mikrowelle für 3-5 min.

Coomassie-Färbelösung:

Coomassie Brilliant Blue R-250	→	0,1%
Essigsäure	→	10%
Methanol	→	50%
in dH ₂ O		

3.2.4 Proteintransfer auf Nitrocellulose (Western-Blotting)

Nach der SDS-PAGE erfolgte der elektrophoretische Transfer der im SDS-Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran mithilfe des Western-Blot-Verfahrens nach BURNETTE (1981). Hierfür wurde das Semidry-Transblotverfahren verwendet. Der Proteintransfer erfolgte bei einer Stromstärke $I = 0,3$ A pro Gel für 22 min.

Zur Überprüfung eines erfolgreichen Proteintransfers diente die reversible Anfärbung der auf die Nitrocellulose transferierten Proteinbanden mit Ponceau-Färbelösung.

Semidry-Transblotpuffer:

Glycin	→	386 mM
Tris(Base)	→	48 mM
SDS	→	0,037%
Methanol	→	20%
in dH ₂ O		

Ponceau-Färbelösung:

Ponceau-S	→	0,5%
Trichloressigsäure (TCA)	→	3%
in dH ₂ O		

PBS-Tween:Tween[®] 20 → 0,05%

in PBS (siehe 3.1.2)

3.2.5 Immundetektion der Proteinbanden

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf der Nitrocellulose wurden die Blot-Streifen für 60 min. in 10%-iger Magermilch (in PBS) inkubiert. Die Inkubation mit den Primärantikörpern erfolgte über Nacht und bei 4°C. Die Antikörperseren wurden in einer Verdünnung von 1:1000 in 10%-iger Magermilch eingesetzt. Die Inkubation mit den Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörpern wurde für 60 min. bei Raumtemperatur durchgeführt. An jede Inkubationsphase schloss sich ein Waschschriff der Blot-Streifen von 2 x 5 min. in PBS-Tween und 1 x 5 min. in PBS an. Die anschließende Visualisierung der Antikörper-markierten Proteinbanden erfolgte nach der Anwendung der Lösungen des ECL[®]-Systems durch Schwärzung eines aufgelegten Röntgenfilms.

3.3 Messung der parazellulären Permeabilität des Dünndarmepithels der Ratte**3.3.1 Entnahme und Vorbereitung eines Rattendarmsegmentes**

Adulte WISTAR-Ratten (ca. 300 g) wurden mit Diethylether in tiefe Narkose versetzt und sofort dekapitiert. Durch einen Median-Sagittal-Schnitt entlang der Linea alba wurde die Bauchhöhle eröffnet und ein ca. 15 cm oder 50 cm langes Segment des Dünndarms, beginnend ca. 2 cm distal der Flexura duodenojejunalis, entnommen. Hierbei war darauf zu achten, dass ein ca. 5 mm breiter Streifen des Mesenteriums am Darmsegment erhalten blieb, um Verletzungen der Darmwand zu vermeiden.

Das orale Ende des Darmsegments wurde anschließend über den Ausgang eines Dreiwegehahns gestülpt und mit Zwirn fixiert. Zur Entfernung des Darminhalts wurde über den Dreiwegehahn das Darmlumen zwei Mal mit 50 ml Puffer A (37°C) gespült und danach das anale Ende des Darmsegments mit einer Dialysenschlauchklemme dicht verschlossen. Über den Dreiwegehahn

folgte dann die luftblasenfreie Füllung des Darmlumens mit einer der folgenden Inkubationslösungen (37°C, siehe **Methoden 3.3.2**).

Ansatz von Puffer A:

NaCl	→	130 mM
KH ₂ PO ₄	→	3 mM
K ₂ HPO ₄	→	2 mM
D-Glucose	→	5 mM
Hepes	→	10 mM
CaCl ₂	→	1 mM
MgCl ₂	→	1 mM
in dH ₂ O		

anschließend:

- pH = 7,4 einstellen mit 10 molarer Natronlauge
- Begasung mit O₂ für 30 min.
- vor Gebrauch auf 37°C erwärmen

3.3.2 Die Inkubationslösungen

Folgende Inkubationslösungen wurden nach Erwärmung auf 37°C zur Befüllung der Rattendarmsegmente verwendet:

- (1.) Puffer A (enthält 5 mM D-Glucose)
- (2.) Puffer A + 20 mM D-Glucose
- (3.) Puffer A + 3 mM Tolbutamid
- (4.) Puffer A + 20 mM L-Glucose
- (5.) Puffer A + 20 mM D-Glucose + 3 mM Diazoxid
- (6.) Puffer A + 20 mM D-Glucose + 3 mM Tolbutamid

Stammlösungen von Tolbutamid und Diazoxid zu je 100 mM wurden in 1 molarer Natronlauge hergestellt. Die entsprechenden Inkubationslösungen wurden anschließend auf pH = 7,4 eingestellt.

Um Veränderungen der parazellulären Permeabilität messbar zu machen, wurde jeder der Inkubationslösungen 0,1 $\mu\text{Ci/ml}$ an radioaktiver L- ^{14}C -Glucose hinzu gegeben. Da der wichtigste Glucose-Carrier des Dünndarms, der Natrium-abhängige Glucose-Transporter 1 (SGLT-1), enantiomerenspezifisch für die in der Nahrung ausschließlich vorhandene D-Form der Glucose ist (RUMMEL UND STUPP, 1960), wird die L-Form der Glucose nicht transzellulär aufgenommen, sondern kann ausschließlich parazellulär durch Solvent Drag das Dünndarmepithel passieren. Die nach einer definierten Inkubationszeit nachweisbare Konzentration an L- ^{14}C -Glucose innerhalb des subepithelialen Bindegewebes konnte daher als direktes Maß für die Tight-Junction-Permeabilität der Enterozyten verwendet werden.

3.3.3 Inkubation eines Rattendarmsegmentes von 50 cm Länge

Ein entnommenes 50-cm-Darmsegment wurde in zwei 25-cm-Segmente geteilt, die jeweils mit einem Dreiwegehahn versehen wurden. Die Darmsegmente wurden mit Inkubationslösung befüllt, am analen Ende mit einer Dialysenschlauchklemme dicht verschlossen und anschließend in eine mit Puffer A gefüllte Schale gelegt, welche durch Einhängen in ein Inkubationswasserbad auf Temperatur und unter leichtem Schütteln gehalten wurde.

Es sollten mit diesen Segmenten mehrere unterschiedliche Inkubationszeiten (3, 15, 30, 45 und 60 Minuten) nacheinander an einem Segment durchgeführt werden, um das Verhalten der L- ^{14}C -Glucose-Resorption über die Zeit zu beurteilen und unterschiedliche Dünndarmabschnitte eines Tieres miteinander zu vergleichen.

Hierfür wurde zunächst eine zweite Dialysenschlauchklemme an dem gefüllten Darmsegment befestigt, die sich ca. 6 cm proximal der ersten, an anal gesetzten Klemme zu befinden hatte. Auf diese Weise entstand ein separates, durch die beiden Klemmen begrenztes Darmrohrsegment (t_3 -Segment) am analen Ende des 25-cm-Segmentes, welches man zum entsprechenden Zeitpunkt (3. Minute [= t_3]) vom Hauptsegment abschneiden konnte. Für das Abschneiden klemmte man mit einer Pinzette das Darmrohr innerhalb des neuen Teilsegmentes, distal der neu gesetzten Klemme mit ca. 8 mm Abstand ab und trennte dann proximal davon mit je ca. 4 mm Abstand zu Pinzette und zweiter Klemme das t_3 -Segment, nunmehr begrenzt von der ersten Klemme und der Pinzette, vom Hauptsegment ab. Die zweite Klemme bildete von da an den neuen analwärtigen Verschluss des Hauptsegmentes. Auf diese Weise erhielt man bei einem 25-cm-Segment

insgesamt fünf kleinere Teilsegmente (t_3 -, t_{15} -, t_{30} -, t_{45} - und t_{60} -Segment), die zum jeweiligen Zeitpunkt (3., 15., 30., 45. und 60. Minute) vom Hauptsegment abzuschneiden waren.

Zum Beenden einer Inkubationszeit war die Inkubationslösung des entsprechenden Darm-Teilsegmentes (t_3 -, t_{15} -, t_{30} -, t_{45} - oder t_{60} -Segment) auslaufen zu lassen und zwei Mal mit 50 ml Puffer A zu spülen. Nach Abschneiden der analwärtigen Dialysenklemme wurde das Segment der Länge nach aufgeschnitten, für 2 min. in 100 ml vorsichtig rotierenden Puffers A gelegt (Magnetrührer Stufe 2) und anschließend in zwei ca. 2 mal 1 cm große Stücke geteilt, welche zur zwischenzeitigen Aufbewahrung jeweils in ein nummeriertes 1,5-ml-Eppendorf-Cap überführt wurden.

3.3.4 Inkubation eines Rattendarmsegmentes von 15 cm Länge

Ein 15-cm-Darmsegment wurde nach Verbindung mit einem Dreiwegehahn entweder für 45 sek. als t_1 -Startwert oder für 60 min. als t_{60} -Endwert mit einer der Inkubationslösungen befüllt und anschließend wie unter **3.3.3** beschrieben inkubiert.

Zum Beenden einer Inkubationszeit wurde über den Dreiwegehahn zwei Mal mit 50 ml Puffer A gespült. Anschließend wurden von dem Darmsegment der orale Teil mit dem Dreiwegehahn (ca. 1 cm Darmrohr) und der anale Teil (ebenfalls ca. 1 cm) durch Abschneiden entfernt. Das Darmrohr wurde dann der Länge nach aufgeschnitten und für 1 min. in 100 ml vorsichtig rotierenden Puffers A belassen (Magnetrührer Stufe 2). Danach war das gesamte Darmsegment in sechs ca. 2 mal 1 cm große Stücke zu schneiden und in nummerierte 1,5-ml-Eppendorf-Caps zu überführen.

3.3.5 Präparation der Darmstücke

Von jedem 2 mal 1 cm großen Darmstück wurden zunächst die fettreichen Überreste des Mesenteriums präparatorisch entfernt. Anschließend folgte eine grobe Zerkleinerung mit zwei Skalpelln und, nach Aufnahme in 2000 μ l dH₂O, eine gründliche Homogenisierung der Probe mithilfe eines Dounce-Homogenisators (10 x bei 900 rpm). Das Homogenat wurde in ein nummeriertes 2-ml-Eppendorf-Cap überführt und für 10 min. bei 20.000 x g zentrifugiert.

3.3.6 Quantitative Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration [$\mu\text{g/ml}$] des Überstandes jeder zentrifugierten Probe wurde nach der Methode von BRADFORD (1976) bestimmt, um für die spätere Radioaktivitätsmessung der Proben vergleichbare Proteinmengen einsetzen zu können. Die Bindung des im Roti[®]-Quant-Reagenz enthaltenen Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine verschiebt das Absorptionsmaximum der Farbe des Reagenzes von 465 nm (ohne Protein) auf 595 nm (mit Protein). Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung.

Es wurden jeweils 5 μl des Überstands mit 1 ml von 1:5-verdünntem Roti[®]-Quant versetzt und nach 10 min. bei $\lambda = 595 \text{ nm}$ photometrisch gemessen. Als Leerwert diente 1 ml 1:5-verdünntes Roti[®]-Quant + 5 μl dH_2O . Durch Aufstellen einer Referenz-Eichgeraden aus Extinktionsmessungen unterschiedlich konzentrierter BSA-Lösungen war nach Ermittlung der Steigung der Eichgeraden die Berechnung der exakten Proteinkonzentration der Proben anhand ihrer gemessenen Extinktionen möglich.

Eichgeradenkonzentrationen von BSA in dH_2O :

62,5 $\mu\text{g/ml}$
125 $\mu\text{g/ml}$
250 $\mu\text{g/ml}$
500 $\mu\text{g/ml}$
750 $\mu\text{g/ml}$
1000 $\mu\text{g/ml}$
2000 $\mu\text{g/ml}$
3000 $\mu\text{g/ml}$

Ermittlung der Steigung m der Eichgeraden nach:

$$m = dy / dx$$

($y = \text{Extinktion } E \text{ einer Probe, } x = \text{BSA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}]$)

Aufstellen der Eichgeraden nach:

$$y = mx + n$$

3.3.7 Messung der Radioaktivität

Ein Aliquot des Überstandes einer zentrifugierten Probe, entsprechend 500 µg Gesamtprotein, wurde mit 4 ml Scintillations-Flüssigkeit vermischt und für 5 min. einer ¹⁴C-Messung im Scintillation-Counter unterzogen. Die gemessene Radioaktivität der Probe wird in cpm angegeben.

Errechnung der Proteinkonzentration c einer Probe nach:

$$x = y \cdot n / m$$

(*x = Proteinkonzentration c [µg/ml]*)

Ermittlung der einzusetzenden Menge an Proteinüberstand nach:

$$\text{gesuchte Menge } [\mu\text{l}] / 500 \mu\text{g Protein} = 1000 \mu\text{l} / c [\mu\text{g/ml}]$$

$$\Rightarrow \text{gesuchte Menge } [\mu\text{l}] = 500.000 / c [\mu\text{g/ml}]$$

3.3.8 Statistische Auswertung

Bei den 50 cm langen Rattendarmsegmenten wurden für jede Inkubationszeit (*t*₃₋, *t*₁₅₋, *t*₃₀₋, *t*₄₅₋ und *t*₆₀₋Segment) zwei Darmstücke und somit zwei cpm-Einzelwerte erhalten, deren Mittelwert graphisch aufgetragen wurde.

Bei den 15 cm langen Rattendarmsegmenten wurden für Start- und Endwert jeweils sechs cpm-Einzelwerte erhalten, deren Medianwert später graphisch aufgetragen wurde.

Zur Signifikanzermittlung erfolgte die Berechnung des p-Wertes mithilfe des t-Tests. Als „signifikant“ (*) wurde eine Korrelation zweier Größen dann bezeichnet, wenn der p-Wert kleiner als 0,05 war. Lag der p-Wert unterhalb von 0,01 wurde die Korrelation als „hochsignifikant“ (**) eingestuft.

Zur tabellarischen und graphischen Auswertung sowie zur Errechnung des p-Wertes dienten die Programme Microsoft Office Excel (Professional Edition 2003) und GraphPad Prism 4 for Windows (2003).