

5 Ergebnisse

5.1 Sensitivität und Spezifität der RT-qPCR

Bevor die Messungen an dem Darmprobenmaterial stattfanden, wurden Vorversuche durchgeführt, die die Sensitivität und vor allem die Spezifität der Primer- und Sondenpaare für die vier CLCA-Vertreter einwandfrei garantierten.

Die besondere Herausforderung für den spezifischen Nachweis von mCLCA1 bis -4 bestand darin, trotz der extrem hohen Sequenzhomologie, eine RT-qPCR zu etablieren, die zwischen den Homologen sicher diskriminieren konnte. Das Ziel der durchgeführten RT-qPCR war es daher, eine verlässliche Differenzierung zwischen den mCLCA1 bis -4-mRNA-Spezies zu gewährleisten. Dazu wurden Primer- und Sondenkombinationen speziell für die vier Homologen neu ausgewählt oder aber aus einer zuvor bereits in unserer Arbeitsgruppe angefertigten Dissertation für mCLCA1 und mCLCA2 übernommen (Horstmeier 2003). Es wurden Vorversuche durchgeführt, bei denen zu jeder Primer- und Sondenkombination von mCLCA1 bis -4 als Template entweder Plasmid-cDNA (für mCLCA1 bis -3) oder aber ein mittels PCR synthetisiertes cDNA-Fragment (für mCLCA4) in stufenweisen verdünnten Konzentrationen eingesetzt wurde. Für diese Experimente wurden die Ansätze als Duplikate untersucht. Der arithmetische Mittelwert (\bar{x}) und die Standardabweichung (SD) in den Tabellen 19 bis 23 wurden aus den Duplikaten eines Doppellaufes gebildet. In jedem Messdurchgang wurden außerdem Negativkontrollen in Form von Duplikaten eingesetzt, um Kontaminationen gegebenenfalls zu erkennen. Diese enthielten DEPC-Wasser anstelle von cDNA-Templates. Die Positivkontrolle diente der Absicherung der Sensitivität, mit der die jeweilige Primer- /Sondenkombination das ihr zugehörige Template in diesem RT-qPCR-Durchlauf detektierte.

Tabelle 19: Bestimmung der Spezifität und Sensitivität der Primer- /Sondenkombination für **mCLCA1** (Fluoreszenz-Threshold CT=0,005)

Eingesetzte Kopienzahl mCLCA1	Positivkontrolle		mCLCA2-Plasmid- cDNA als Template		mCLCA3-Plasmid- cDNA als Template		mCLCA4-cDNA als Template	
	\bar{x} CT	SD CT	\bar{x} CT	SD CT	\bar{x} CT	SD CT	\bar{x} CT	SD CT
10^9	9,40	0,91	28,51	0,03	37,23	1,25	28,75	0,05
10^8	12,88	0,56	31,65	0,60	No CT	-	32,08	0,04
10^7	16,53	0,40	34,73	0,51	No CT	-	36,19	1,30
10^6	19,42	0,22	36,87	1,04	No CT	-	37,65	1,11
10^5	22,96	0,19	No CT	-	No CT	-	39,02	1,39
10^4	26,34	0,02	No CT	-	No CT	-	No CT	-
10^3	29,69	0,39	No CT	-	No CT	-	No CT	-
10^2	33,75	0,59	No CT	-	No CT	-	No CT	-

Tabelle 20: Bestimmung der Spezifität und Sensitivität der Primer- /Sondenkombination für **mCLCA2** (Fluoreszenz-Threshold CT=0,004)

Eingesetzte Kopienzahl mCLCA2	mCLCA1-Plasmid- cDNA als Template		Positivkontrolle		mCLCA3-Plasmid- cDNA als Template		mCLCA4 cDNA alsTemplate	
	\bar{x} CT	SD CT	\bar{x} CT	SD CT	\bar{x} CT	SD CT	\bar{x} CT	SD CT
10^9	No CT	-	9,60	0,72	31,92	0,40	No CT	-
10^8	No CT	-	12,15	0,15	35,49	1,61	No CT	-
10^7	No CT	-	15,92	0,27	No CT	-	No CT	-
10^6	No CT	-	19,24	0,21	No CT	-	No CT	-
10^5	No CT	-	22,41	0,01	No CT	-	No CT	-
10^4	No CT	-	26,88	0,38	No CT	-	No CT	-
10^3	No CT	-	30,06	0,14	No CT	-	No CT	-
10^2	No CT	-	34,42	0,49	No CT	-	No CT	-

Tabelle 21: Bestimmung der Spezifität und Sensitivität der Primer- /Sondenkombination für **mCLCA3** (Fluoreszenz-Threshold CT=0,005)

Eingesetzte Kopienzahl mCLCA3	mCLCA1-Plasmid- cDNA als Template		mCLCA2-Plasmid- cDNA als Template		Positivkontrolle		mCLCA4 cDNA als Template	
	\bar{x} CT	SD CT	\bar{x} CT	SD CT	\bar{x} CT	SD CT	\bar{x} CT	SD CT
10^9	No CT	-	34,06	1,33	10,54	0,83	27,32	0,30
10^8	No CT	-	34,26	1,05	12,88	0,79	31,57	0,11
10^7	No CT	-	No CT	-	16,92	0,01	34,81	0,27
10^6	No CT	-	No CT	-	20,01	0,08	No CT	-
10^5	No CT	-	No CT	-	22,76	0,26	No CT	-
10^4	No CT	-	No CT	-	26,80	0,76	No CT	-
10^3	No CT	-	No CT	-	29,40	0,99	No CT	-
10^2	No CT	-	No CT	-	30,32	0,58	No CT	-

Tabelle 22: Bestimmung der Spezifität und Sensitivität der Primer- /Sondenkombination für **mCLCA4** (Fluoreszenz-Threshold CT=0,042)

Eingesetzte Kopienzahl mCLCA4	mCLCA1-Plasmid- cDNA als Template		mCLCA2-Plasmid- cDNA als Template		mCLCA3-Plasmid- cDNA als Template		Positivkontrolle	
	\bar{x} CT	SD CT	\bar{x} CT	SD CT	\bar{x} CT	SD CT	\bar{x} CT	SD CT
10^9	No CT	-	34,76	0,28	No CT	-	11,80	0,03
10^8	No CT	-	No CT	-	No CT	-	15,50	0,28
10^7	No CT	-	No CT	-	No CT	-	19,28	0,15
10^6	No CT	-	No CT	-	No CT	-	22,26	0,12
10^5	No CT	-	No CT	-	No CT	-	26,59	0,05
10^4	No CT	-	No CT	-	No CT	-	30,01	0,07
10^3	No CT	-	No CT	-	No CT	-	33,26	0,20
10^2	No CT	-	No CT	-	No CT	-	No CT	-

Die schwachen Kreuzreaktionen der mCLCA1-Primer- /Sondenkombination mit mCLCA2 und mCLCA4 als Template wurde akzeptiert, da die Kreuzamplifikationen erst ab einer Templatekonzentration von 10^6 und erst bei einer Zyklenzahl über 36 auftraten.

Die mCLCA2-Primer- und Sondenkombination reagierte schwach in mit sehr hohen Templatekonzentrationen von mCLCA3 und die mCLCA3-Primer- und Sondenkombination reagierte schwach mit hohen Templatekonzentrationen von mCLCA2 und mCLCA4 mit Nachweisgrenzen bei 10^8 und 10^7 bei Zyklenzahlen über 34, was ebenfalls als akzeptierbar gewertet wurde.

Aufgrund der in ersten Vorversuchen beobachteten starken Kreuzreaktion zwischen der Primer- /Sondenkombination für mCLCA4 und mCLCA2 wurde der Fluoreszenz-*Threshold* manuell erhöht und die Anlagerungstemperatur der Primer- /Sondenkombination von mCLCA4 von 55°C auf 58°C heraufgesetzt, um die Spezifität der Reaktion zu steigern. Dass damit ein Sensitivitätsverlust einherging und eine Ausgangskopienzahl von ≤ 100 nicht mehr detektiert wurde, wurde dafür akzeptiert. Es traten daraufhin keine Kreuzreaktionen mehr auf (siehe Tabelle 22).

Da die Primer, die bei der qPCR zur Detektion von mCLCA2 eingesetzt wurden, sich gegenüber den homologen Sequenzbereichen der mCLCA1- und mCLCA4-mRNA nur in einem bis zu drei Basenpaaren unterschieden, wurde ein weiterer Vorversuch mit dieser Primer- /Sondenkombination durchgeführt, bei dem alle vier zu quantifizierenden CLCA-Homologen zu gleichen Anteilen in den Verdünnungsstufen gemischt vorlagen. Im selben Versuch wurde zum Vergleich Plasmid-mCLCA2-cDNA als Positivkontrolle eingesetzt. Auf diese Weise konnte bestimmt werden, ob sich die Spezifität unter kompetitiven Bedingungen, wie sie ja in den Proben vorlagen, verschlechtert. Wie der Tabelle 23 zu entnehmen ist, verhielt sich die Primer- /Sondenkombination für mCLCA2 nahezu identisch, unabhängig von der Anwesenheit konkurrierender, sehr ähnlicher Templates.

Tabelle 23: Bestimmung der Spezifität und Sensitivität unter kompetitiven Bedingungen der Primer- /Sondenkombination für **mCLCA2** (Floureszenz-*Threshold* CT=0,004)

Eingesetzte Kopienzahl je Homolog	mCLCA1-, mCLCA2-, mCLCA3-und mCLCA4- cDNA-Mix als Template		Positivkontrolle	
	\bar{x} CT	SD CT	\bar{x} CT	SD CT
10^8	14,40	0,56	13,55	0,40
10^7	16,83	0,02	16,83	0,05
10^6	20,42	0,12	20,05	0,07
10^5	23,76	0,97	23,35	0,14
10^4	26,90	0,96	27,94	0,12
10^3	30,18	0,32	31,28	0,06
10^2	33,88	0,90	34,03	0,14

5.1.1 Quantifizierung der Expression von mCLCA1 bis -4

Die 80 Dünndarm-cDNA-Proben der 40 Tiere wurden mit dem Ziel untersucht, eine Quantifizierung der Genexpression der vier murinen CLCA-Vertreter durchzuführen. Der Variationskoeffizient der beiden Messdurchgänge durfte dabei nicht größer als 5% sein (BUSTIN 2000). Mit Hilfe des *Wilcoxon-Two-Sample-Tests* wurde überprüft, ob bei den Proben eventuell Einflüsse des CF-Genotyps oder der Stämme bestehen, die sich signifikant auf die Genexpression von mCLCA1 bis -4 auswirken. Dabei wurden jeweils nur Gruppen miteinander verglichen, die sich in einem Merkmal unterscheiden. Das hieß beispielsweise, dass beim Genotypenvergleich die beiden Gruppen desselben Stammes innerhalb der Lokalisation Jejunum verglichen wurden und sich nur im Genotyp, WT oder CF, unterschieden. Dasselbe Prinzip galt für den Stammesvergleich: Hier wurden die vier Gruppen innerhalb eines Genotyps und einer Lokalisation verglichen.

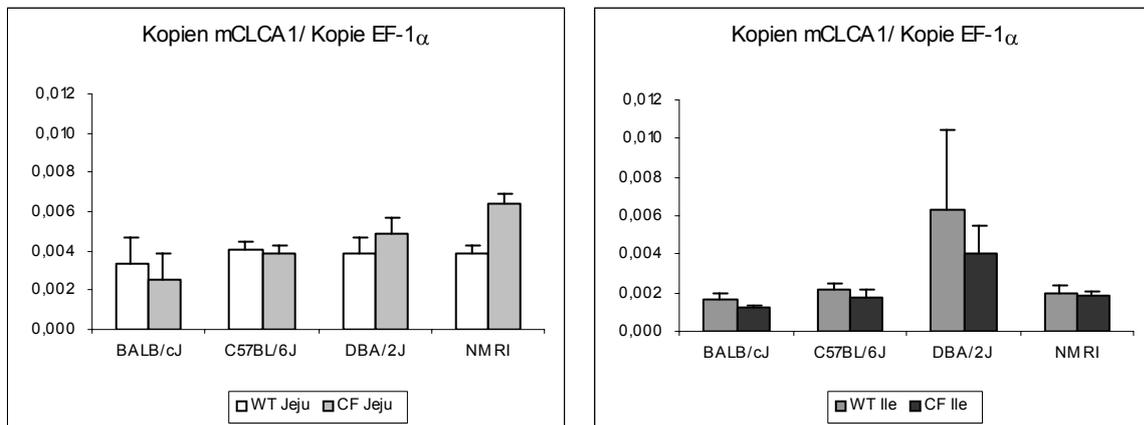
Die in Abschnitt 5.1.2 bis 5.1.5 dargestellten Säulendiagramme geben jeweils die Mittelwerte der Kopienzahlen an mCLCA-cDNA bezogen auf die EF-1 α -Kopienzahl an. Die Mittelwerte der mCLCA- und EF-1 α -Kopienzahlen wurden jeweils aus zwei Messdurchgängen mit als Triplikate gemessenen Proben ermittelt und anschließend der Quotient aus diesen beiden Mittelwerten für jede Probe gebildet. Dadurch wurde für jedes Tier pro Darmlokalisierung ein Quotient erhalten. Die Säulen der Diagramme stehen jeweils für einen Mittelwert dieser Quotienten von fünf Tieren einer Gruppe. Der in den Graphen eingezeichnete Fehlerindikator bezeichnet die Standardabweichung der Mittelwerte (SEM). Statistisch signifikante Unterschiede sind in den Graphen durch die Linien angegeben, die die zu vergleichenden Gruppen verbinden und sind mit einem Stern ($P \leq 0,05$) gekennzeichnet. Ist über einer Säule einer zu vergleichenden Gruppe nur ein Stern und keine Linien eingezeichnet, so ist die mit dem Stern gekennzeichnete Säule signifikant unterschiedlich gegenüber allen drei übrigen Säulen.

5.1.2 mRNA-Kopienzahlen von mCLCA1

Insgesamt war die Expression der mCLCA1-mRNA am geringsten von allen vier untersuchten Genen im Darm der Maus und lag im Verhältnis zu den mRNA-Homologen mCLCA1:mCLCA2:mCLCA3:mCLCA4 bei ungefähr 1:4:40:100.

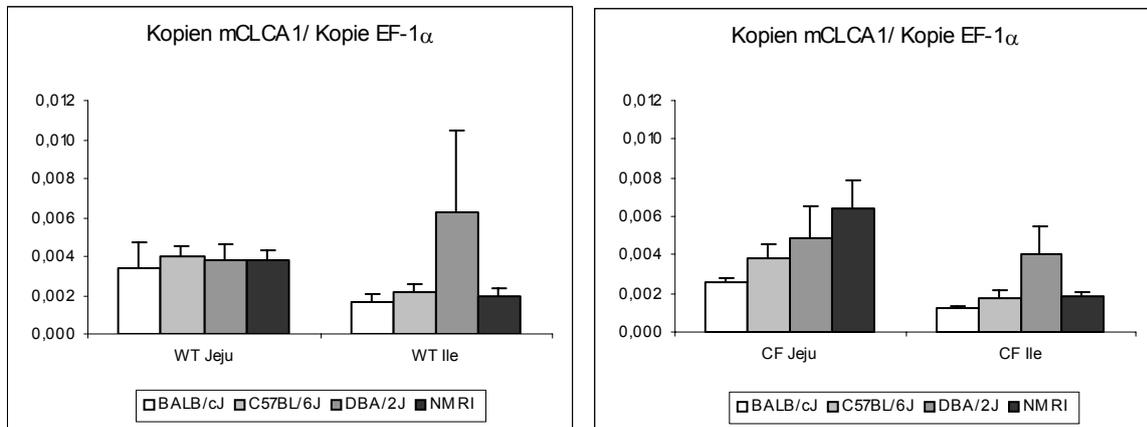
Beim Genotypenvergleich wurden keine signifikanten Unterschiede der relativen mCLCA1-mRNA-Expression zwischen den CF-Tieren und den WT-Tieren festgestellt. Auch statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Stämmen gab es nicht.

Abb. 1: mRNA-Expression von mCLCA1 in Jejunum (Jeju; links) und Ileum (Ile; rechts), Vergleich zwischen Wildtyp (WT) - und Zystische Fibrose (CF) -Mäusen



Die Säulen geben jeweils die arithmetischen Mittelwerte (\bar{x}) der relativen mRNA-Kopienzahlen bezogen auf das *Housekeeping*-Gen EF-1 α von fünf Tieren einer Gruppe an, der Fehlerindikator bezeichnet die Standardabweichung der Mittelwerte (SEM).

Abb. 2: mRNA-Expression von mCLCA1 in Jejunum (Jeju) und Ileum (Ile), Vergleich zwischen den Wildtyp (WT) -Stämmen (links) und Zystische Fibrose (CF) -Stämmen (rechts)



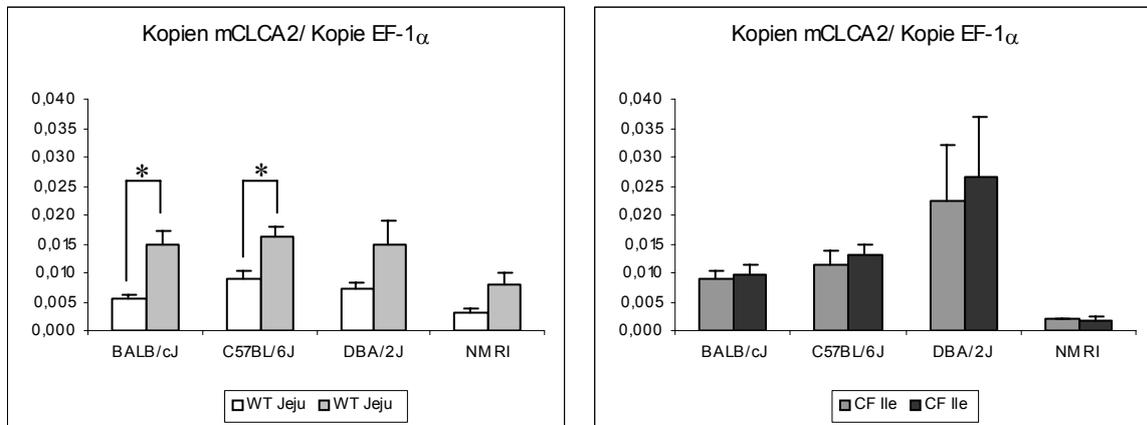
Die Säulen geben jeweils die arithmetischen Mittelwerte (\bar{x}) der relativen mRNA-Kopienzahlen bezogen auf das *Housekeeping*-Gen EF-1 α von fünf Tieren einer Gruppe an, der Fehlerindikator bezeichnet die Standardabweichung der Mittelwerte (SEM).

5.1.3 mRNA-Kopienzahlen von mCLCA2

Die mRNA-Expression von mCLCA2 war insgesamt fast um ein Vierfaches höher als die von mCLCA1.

Beim Genotypenvergleich war festzustellen, dass die mRNA-Expression von mCLCA2 im Jejunum der BALB/cJ- und C57BL/6J-Tiere bei den *cftr*^{TgH(neoim)¹Hgu}-Mäusen signifikant hochreguliert war im Vergleich zum Wildtyp (P = 0,012 für BALB/cJ; P = 0,022 für C57BL/6J). Auch bei den beiden anderen untersuchten Stämmen zeichnete sich diese Tendenz deutlich ab, war aber nicht statistisch signifikant.

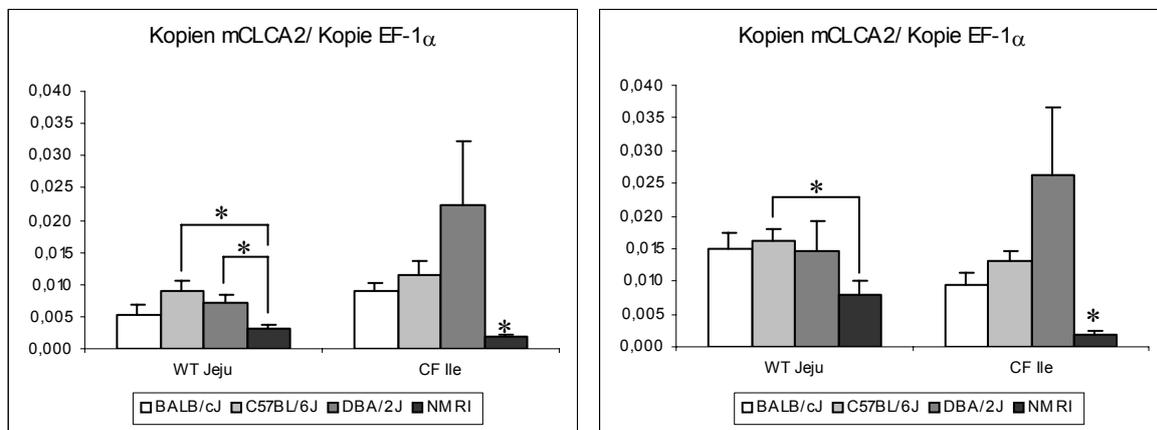
Abb. 3: mRNA-Expression von mCLCA2 in Jejunum (Jeju; links) und Ileum (Ile; rechts), Vergleich zwischen Wildtyp (WT) - und Zystische Fibrose (CF) -Mäusen



Die Säulen geben jeweils die arithmetischen Mittelwerte (\bar{x}) der relativen mRNA-Kopienzahlen bezogen auf das *Housekeeping*-Gen *EF-1 α* von fünf Tieren einer Gruppe an, der Fehlerindikator bezeichnet die Standardabweichung der Mittelwerte (SEM). Über den Säulen eingezeichnete Linien mit einem Stern verbinden zu vergleichende Mausgruppen, bei denen statistisch signifikante Unterschiede mit einem P-Wert $\leq 0,05$ aufgetreten sind.

Beim Vergleich zwischen den vier Stämmen (Abb. 4) wurden signifikant niedrigere Kopienzahlen der WT-NMRI-Tiere im Jejunum gegenüber den Stämmen WT-DBA/2J ($P = 0,037$) und WT-C57BL/6J ($P = 0,012$) und im Ileum gegenüber den Stämmen WT-BALB/cJ, WT-DBA/2J und WT-C57BL/6J (jeweils $P = 0,012$) detektiert. Auch bei den CF-Tieren zeigte der Stamm NMRI-*cfr*^{tm1Cam} gegenüber den übrigen Stämmen in Jejunum und Ileum die niedrigste Expressionsrate an mCLCA2-mRNA. Dies war in den folgenden Fällen signifikant: Im Jejunum waren die mCLCA2-Kopienzahlwerte des Stammes NMRI-*cfr*^{tm1Cam} signifikant niedriger gegenüber dem Stamm C57BL/6J-*cfr*^{TgH(neoim)1Hgu} ($P = 0,022$) und im Ileum signifikant niedriger als bei den Stämmen BALB/cJ-*cfr*^{TgH(neoim)1Hgu}, DBA/2J-*cfr*^{TgH(neoim)1Hgu} und C57BL/6J-*cfr*^{TgH(neoim)1Hgu} (jeweils $P = 0,012$).

Abb. 4: mRNA-Expression von mCLCA2 in Jejunum (Jeu) und Ileum (Ile), Vergleich zwischen den Wildtyp (WT) -Stämmen (links) und Zystische Fibrose (CF) -Stämmen (rechts)



Die Säulen geben jeweils die arithmetischen Mittelwerte (\bar{x}) der relativen mRNA-Kopienzahlen bezogen auf das *Housekeeping*-Gen EF-1 α von fünf Tieren einer Gruppe an, der Fehlerindikator bezeichnet die Standardabweichung der Mittelwerte (SEM). Über den Säulen eingezeichnete Linien mit einem Stern verbinden zu vergleichende Mausgruppen, bei denen statistisch signifikante Unterschiede mit einem P-Wert $\leq 0,05$ aufgetreten sind.

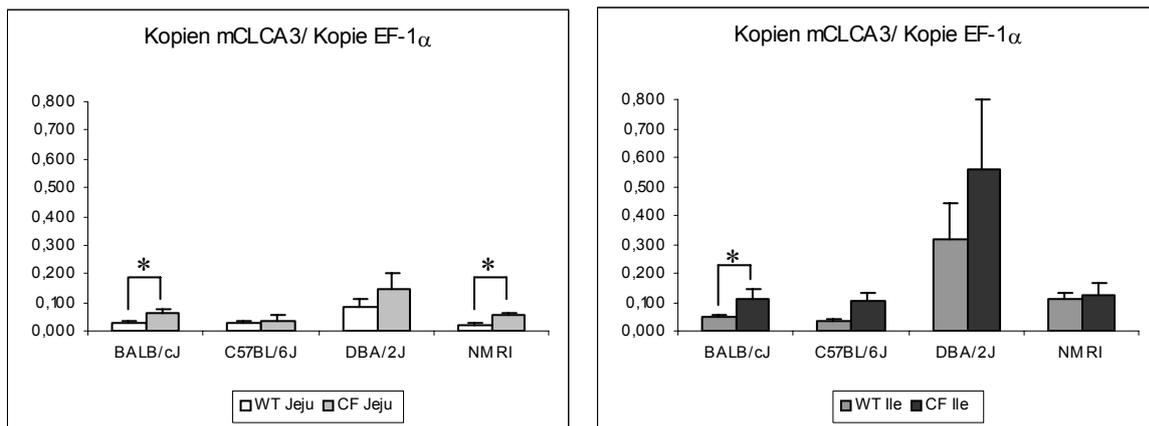
5.1.4 mRNA-Kopienzahlen von mCLCA3

Insgesamt wurde mCLCA3-mRNA am zweithöchsten von den vier gemessenen mCLCA-Spezies im Mäusedarm exprimiert.

Beim Genotypvergleich zeigten die CF-Mäuse aller Stämme höhere mCLCA3-Kopienzahlen als die jeweiligen Wildtyp-Kontrollen. Jedoch waren diese Unterschiede nicht in jedem Fall statistisch signifikant. Statistische Signifikanzwerte von $P \leq 0,05$ wurden lediglich in den folgenden Fällen erreicht: Die BALB/cJ-*cftr*^{TgH(neoim)1Hgu}-Mäuse zeigten sowohl im Jejunum ($P = 0,022$) als auch im Ileum ($P = 0,027$) eine signifikante Heraufregulierung der mCLCA3-mRNA gegenüber den WT-Kontrolltieren. Bei den NMRI-Tieren war kein Unterschied im Ileum zwischen den *cftr*^{tm1Cam}- und WT-Mäusen vorhanden, während sich im Jejunum wieder eine signifikante Heraufregulation dieser mRNA-Spezies nachweisen ließ ($P = 0,012$). Bei

den Stämmen C57BL/6J und DBA/2J konnte für keine der beiden Darmlokalisationen ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Genotypen festgestellt werden.

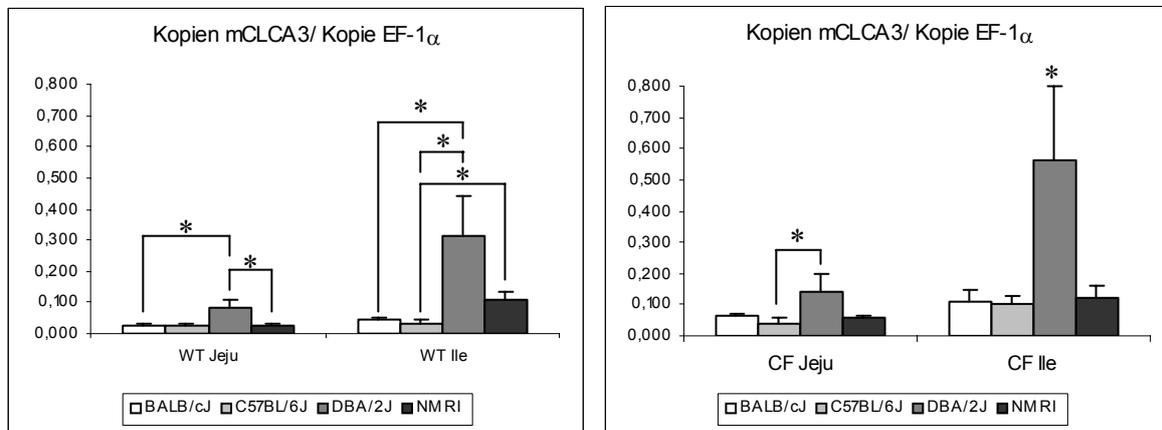
Abb. 5: mRNA-Expression von mCLCA3 in Jejunum (Jeju; links) und Ileum (Ile; rechts), Vergleich zwischen Wildtyp (WT) - und Zystische Fibrose (CF) -Mäusen



Die Säulen geben jeweils die arithmetischen Mittelwerte (\bar{x}) der relativen mRNA-Kopienzahlen bezogen auf das *Housekeeping*-Gen EF-1 α von fünf Tieren einer Gruppe an, der Fehlerindikator bezeichnet die Standardabweichung der Mittelwerte (SEM). Über den Säulen eingezeichnete Linien mit einem Stern verbinden zu vergleichende Mausgruppen, bei denen statistisch signifikante Unterschiede mit einem P-Wert $\leq 0,05$ aufgetreten sind.

Beim Vergleich zwischen den Stämmen lag die Expressionsrate im Ileum der DBA/2J-*cfr*^{TgH(neoim)1Hgu}-Tiere signifikant über der Expression der übrigen drei Stämme hinsichtlich dieses Genotyps und dieser Lokalisation (DBA/2J / BALB/cJ P = 0,037; DBA/2J / C57BL/6J P = 0,0122; DBA/2J / NMRI P = 0,037), während die Expression im Jejunum der DBA/2J-*cfr*^{TgH(neoim)1Hgu}-Mäuse nur signifikant höher als die der C57BL/6J-*cfr*^{TgH(neoim)1Hgu}-Mäuse war (P = 0,037). Die WT-DBA/2J-Tiere exprimierten ebenfalls signifikant mehr mCLCA3 sowohl im Jejunum gegenüber den WT-BALB/cJ- und WT-NMRI-Tieren (jeweils P = 0,022) als auch im Ileum gegenüber den WT-BALB/cJ- und WT-C57BL/6J-Mäusen (jeweils P = 0,022). Des Weiteren lag die mCLCA3-mRNA-Expressionsrate im Ileum der WT-NMRI-Mäuse signifikant über der der WT-C57BL/6J-Tiere (P = 0,012).

Abb. 6: mRNA-Expression von mCLCA3 in Jejunum (Jeju) und Ileum (Ile), Vergleich zwischen den Wildtyp (WT) -Stämmen (links) und Zystische Fibrose (CF) -Stämmen (rechts)



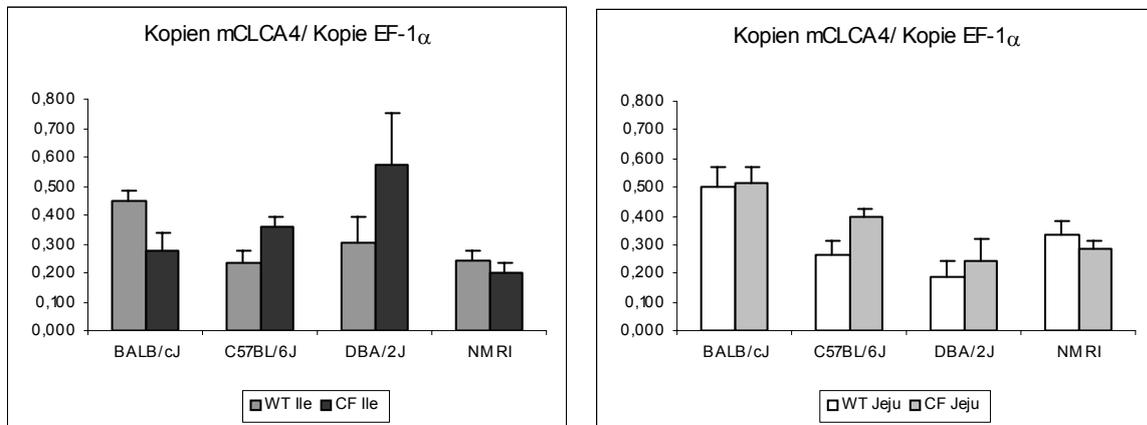
Die Säulen geben jeweils die arithmetischen Mittelwerte (\bar{x}) der relativen mRNA-Kopienzahlen bezogen auf das *Housekeeping*-Gen *EF-1 α* von fünf Tieren einer Gruppe an, der Fehlerindikator bezeichnet die Standardabweichung der Mittelwerte (SEM). Über den Säulen eingezeichnete Linien mit einem Stern verbinden zu vergleichende Mausgruppen, bei denen statistisch signifikante Unterschiede mit einem P-Wert $\leq 0,05$ aufgetreten sind.

5.1.5 mRNA-Kopienzahlen von mCLCA4

Der vierte Vertreter der untersuchten mCLCA-mRNA-Spezies war insgesamt am höchsten im Mäusedarm exprimiert.

Beim Genotypenvergleich konnte in keiner der beiden Darmlokalisationen ein konsistenter Unterschied zwischen den WT- und CF-Tieren hinsichtlich der mCLCA4-mRNA-Expression festgestellt werden, auch lagen keinerlei statistische Signifikanzen zwischen den nur geringen Kopienzahlunterschieden vor.

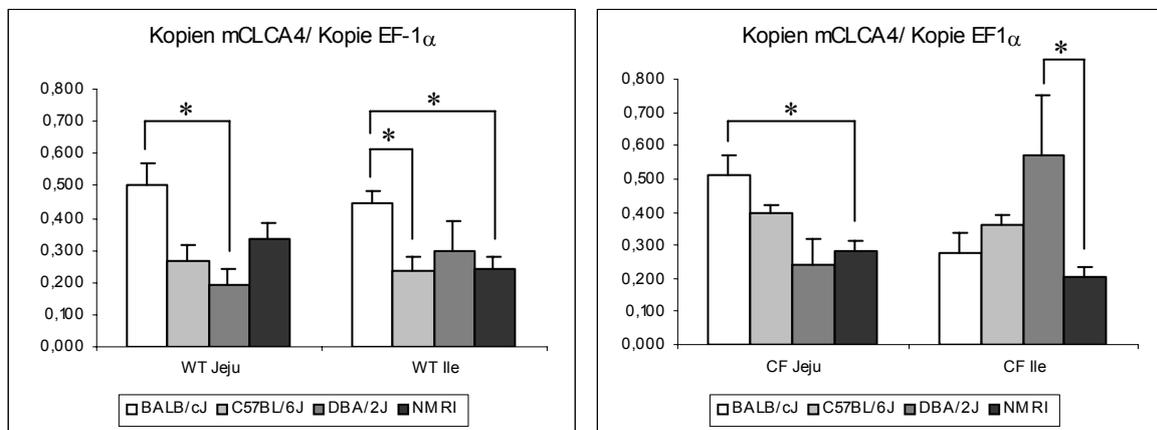
Abb. 7: mRNA-Expression von mCLCA4 in Jejunum (Jeju; links) und Ileum (Ile; rechts), Vergleich zwischen Wildtyp (WT) - und Zystische Fibrose (CF) -Mäusen



Die Säulen geben jeweils die arithmetischen Mittelwerte (\bar{x}) der relativen mRNA-Kopienzahlen bezogen auf das *Housekeeping*-Gen EF-1 α von fünf Tieren einer Gruppe an, der Fehlerindikator bezeichnet die Standardabweichung der Mittelwerte (SEM).

Beim Stammesvergleich waren signifikant höhere Expressionraten im Jejunum der WT-BALB/cJ-Tiere gegenüber den WT-DBA/2J-Tieren ($P = 0,0367$) und im Ileum der WT-BALB/cJ-Mäuse gegenüber den WT-C57BL/6J- und WT-NMRI-Mäusen (jeweils $P = 0,022$) zu detektieren. Auch im Jejunum der BALB/cJ-*cfr*^{TgH(neoim)1Hgu}-Tiere lag die mCLCA4-Expression signifikant über der der NMRI-*cfr*^{tm1Cam}-Tiere ($P = 0,022$). Des Weiteren war die mCLCA4-Expression im Ileum der C57BL/6J- *cfr*^{TgH(neoim)1Hgu}-Tiere signifikant stärker ausgeprägt als bei den NMRI-*cfr*^{tm1Cam}-Tieren ($P = 0,037$).

Abb. 8: mRNA-Expression von mCLCA4 in Jejunum (Jeu) und Ileum (Ile), Vergleich zwischen den Wildtyp (WT) -Stämmen (links) und Zystische Fibrose (CF) -Stämmen (rechts)



Die Säulen geben jeweils die arithmetischen Mittelwerte (\bar{x}) der relativen mRNA-Kopienzahlen bezogen auf das *Housekeeping*-Gen EF-1 α von fünf Tieren einer Gruppe an, der Fehlerindikator bezeichnet die Standardabweichung der Mittelwerte (SEM). Über den Säulen eingezeichnete Linien mit einem Stern verbinden zu vergleichende Mausgruppen, bei denen statistisch signifikante Unterschiede mit einem P-Wert $\leq 0,05$ aufgetreten sind.

5.2 Histologische Quantifizierung der Becherzellen

Die Erfassung des Anteils an PAS-positiven Becherzellen am Darmepithel, diente der Erfassung des Anteils an Muzin- und damit mCLCA3-produzierenden Zellen (LEVER-KOEHNE u. GRUBER 2002) am Darmepithel von WT-und CF-Tieren im Vergleich. Diese konnten ins Verhältnis zu den mRNA-Expressionsdaten von mCLCA3 gesetzt werden, wodurch die mCLCA3-Expressionsdaten relativiert werden konnten: Eine heraufregulierte mCLCA3-mRNA-Kopienzahl pro Einzelzelle konnte so von einer mCLCA3-mRNA-Heraufregulation aufgrund einer erhöhten Anzahl an mCLCA3-exprimierenden Anzahl an Becherzellen unterschieden werden. Die Zählung der PAS-positiven Zellen erfolgte nach Zotte und Krypte getrennt, da in beiden Kompartimenten sehr unterschiedliche Anteile an Becherzellen vorkommen.

Die PAS-positiven Becherzellen wurden wie beschrieben (siehe Abschnitt 4.4.11.5) an Paraffinschnitten ausgezählt und statistisch ausgewertet. Die PAS-positiven Zellen stellen sich mit pinkem Zytoplasma dar, das durch die Reaktion von Aldehydgruppen der Glycoproteine und Polysaccharide aus den muzinhaltigen Zellen mit dem Schiff'schen Reagenz zustande kommt (siehe Abb. 13).

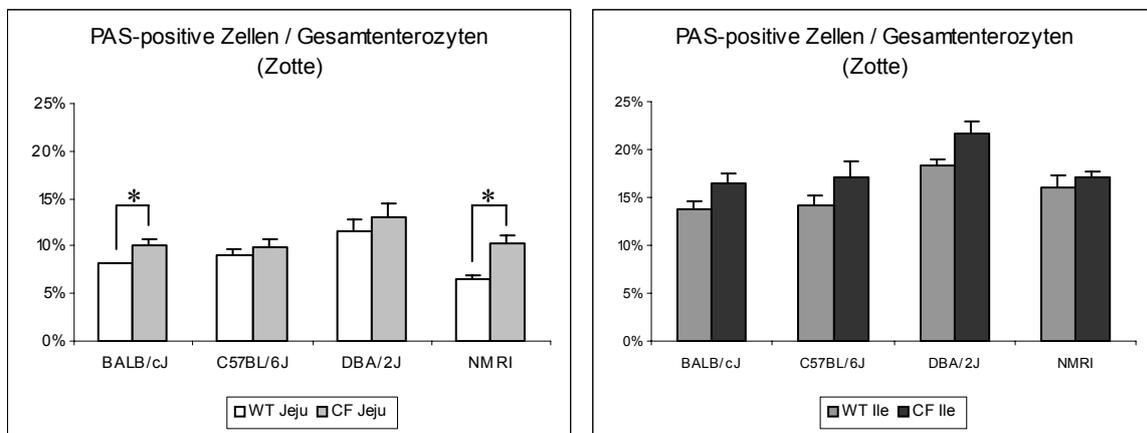
Die Säulendiagramme geben die arithmetischen Mittelwerte der Quotienten aus der Anzahl PAS-positiver Zellen/Enterozytenzahl (angegeben in %) von jeweils fünf Tieren einer Gruppe an. Der Fehlerindikator bezeichnet wieder den *Standard Error of the Mean* (SEM-Wert).

Wie bereits für die Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalyse beschrieben, wurden statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen WT und CF und zwischen den einzelnen Stämmen mit Hilfe des *Wilcoxon-Two-Sample-Tests* auch für alle durchgeführten histologischen Auswertungen gesucht.

5.2.1 Quantifizierung der Becherzellen in den Zotten

Beim Vergleich der CF- und WT-Mäuse der einzelnen Stämme zeigten alle CF-Tiere dezente Zunahmen an PAS-positiven Zellen im Vergleich zu den WT-Kontrolltieren. Diese Zunahmen waren jedoch nur in zwei Fällen statistisch signifikant: die BALB/cJ-*cfr*^{TgH(neoim)1Hgu} und die NMRI-*cfr*^{tm1Cam}-Tiere wiesen im Jejunumzottenepithel eine signifikant erhöhte Anzahl an PAS-positiven Zellen im Vergleich zu den WT-Mäusen (jeweils $P = 0,012$) auf.

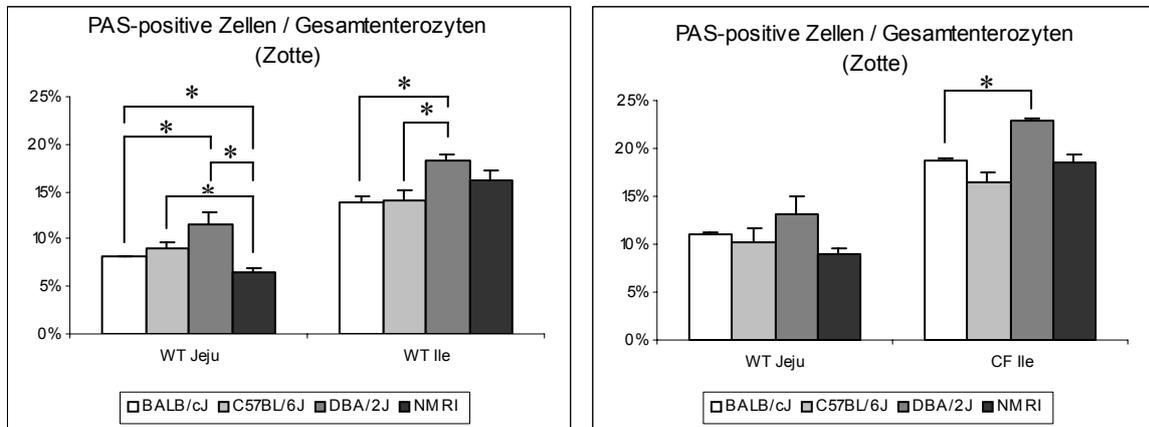
Abb 9: Anteil PAS-positiver Zellen am Zottenepithel des Jejunums (Jeju; links) und Ileums (Ile; rechts) in Prozent, Vergleich zwischen Wildtyp (WT) - und Zystische Fibrose (CF) -Mäusen



Die Säulen geben die arithmetischen Mittelwerte der Quotienten aus der Anzahl PAS-positiver Zellen/Enterozytenzahl der Zotten (angegeben in %) von jeweils fünf Tieren einer Gruppe an. Der Fehlerindikator bezeichnet die Standardabweichung der Mittelwerte (SEM). Über den Säulen eingezeichnete Linien mit einem Stern verbinden zu vergleichende Mausgruppen, bei denen statistisch signifikante Unterschiede mit einem P-Wert $\leq 0,05$ aufgetreten sind.

Beim Vergleich der Stämme untereinander waren mehr Unterschiede zwischen den WT-Tieren der unterschiedlichen Stämme vorhanden als zwischen den CF-Tieren. So besaßen die WT-BALB/cJ-Mäuse signifikant weniger PAS-positive Zellen im Jejunum als die WT-DBA/2J-Mäuse ($P = 0,012$) und signifikant mehr schleimproduzierende Zellen als die WT-NMRI-Mäuse in dieser Lokalisation ($P = 0,022$). Auch die WT-C57BL/6J-Tiere und die WT-DBA/2J-Tiere wiesen in diesem Darmabschnitt signifikant mehr PAS-positive Zellen auf als die WT-NMRI-Mäuse ($P = 0,037$ bzw. $P = 0,012$). Im Ileum waren bei den Stämmen BALB/cJ und C57BL/6J der WT-Gruppen signifikant weniger schleimproduzierende Zellen vorhanden als bei den WT-DBA/2J-Mäusen ($P = 0,022$ bzw. $P = 0,037$). Im Jejunum der CF-Mäuse waren keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Anteils PAS-positiver Zellen im Zottenepithel zu finden. Als einziger Unterschied bei den CF-Gruppen wurden im Ileum bei den BALB/cJ- $cfr^{TgH(neoim)1Hgu}$ -Mäusen ein signifikant niedrigerer Anteil PAS-positiver Zellen im Zottenepithel festgestellt als bei den DBA/2J- $cfr^{TgH(neoim)1Hgu}$ -Tieren ($P = 0,022$).

Abb 10: Anteil PAS-positiver Zellen am Zottenepithel des Jejunums (Jeju) und Ileums (Ile) in Prozent, Vergleich zwischen den Wildtyp (WT) -Stämmen (links) und Zystische Fibrose CF (-/-) -Stämmen (rechts)

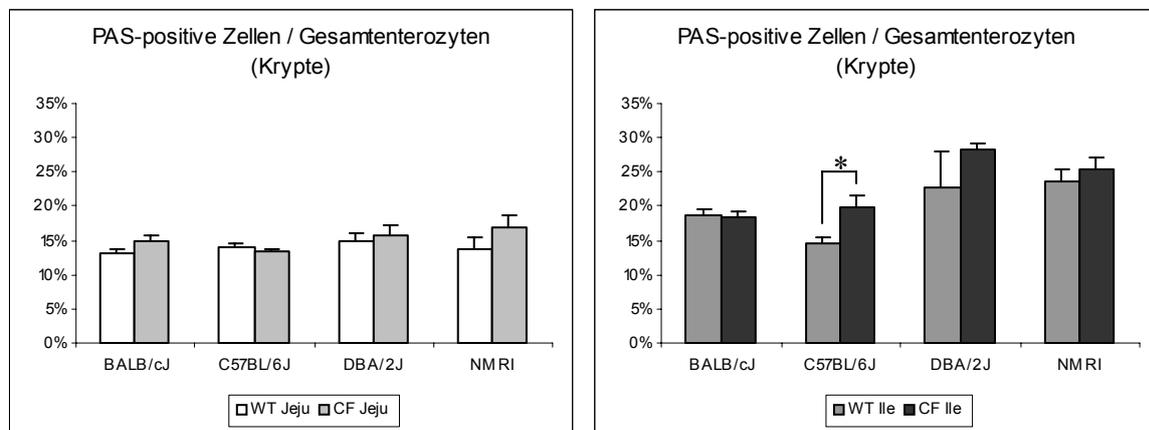


Die Säulen geben die arithmetischen Mittelwerte der Quotienten aus der Anzahl PAS-positiver Zellen/Enterozytenzahl der Zotten (angegeben in %) von jeweils fünf Tieren einer Gruppe an. Der Fehlerindikator bezeichnet die Standardabweichung der Mittelwerte (SEM). Über den Säulen eingezeichnete Linien mit einem Stern verbinden zu vergleichende Mausgruppen, bei denen statistisch signifikante Unterschiede mit einem P-Wert $\leq 0,05$ aufgetreten sind.

5.2.2 Quantifizierung der Becherzellen in den Krypten

Beim Vergleich der WT- und CF-Tiere zeigten die C57BL/6J- *cftr*^{TgH(neoim)1Hgu}-Mäuse signifikant mehr PAS-positive Zellen (P = 0,012) im Kryptepithel als die WT-C57BL/6J-Mäuse. Bei den drei übrigen Stämmen gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen hinsichtlich der Becherzellzahlen in den Krypten.

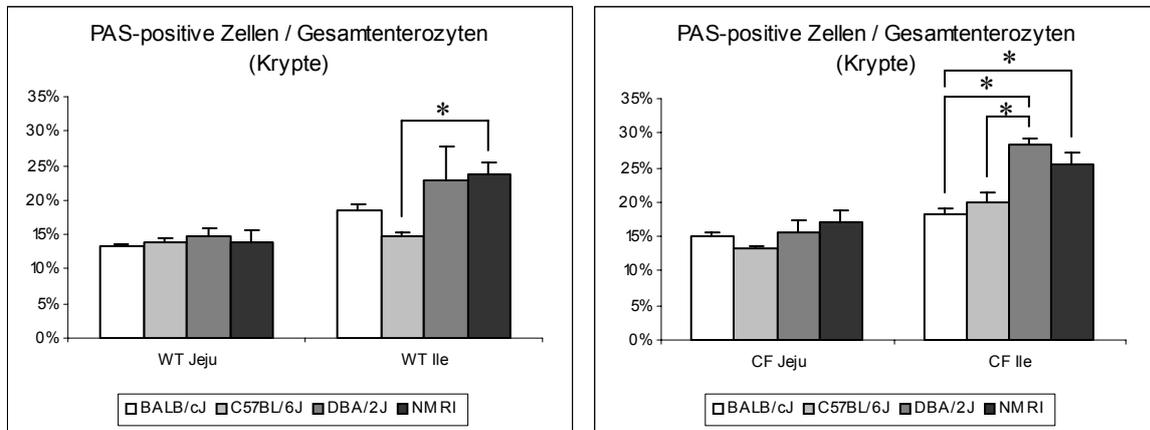
Abb 11: Anteil PAS-positiver Zellen am Kryptepithel des Jejunums (Jeju; links) und Ileums (Ile; rechts) in Prozent, Vergleich zwischen Wildtyp (WT) - und Zystische Fibrose (CF) -Mäusen



Die Säulen geben die arithmetischen Mittelwerte der Quotienten aus der Anzahl PAS-positiver Zellen/Enterozytenzahl der Krypten (angegeben in %) von jeweils fünf Tieren einer Gruppe an. Der Fehlerindikator bezeichnet die Standardabweichung der Mittelwerte (SEM). Über den Säulen eingezeichnete Linien mit einem Stern verbinden zu vergleichende Mausgruppen, bei denen statistisch signifikante Unterschiede mit einem P-Wert $\leq 0,05$ aufgetreten sind.

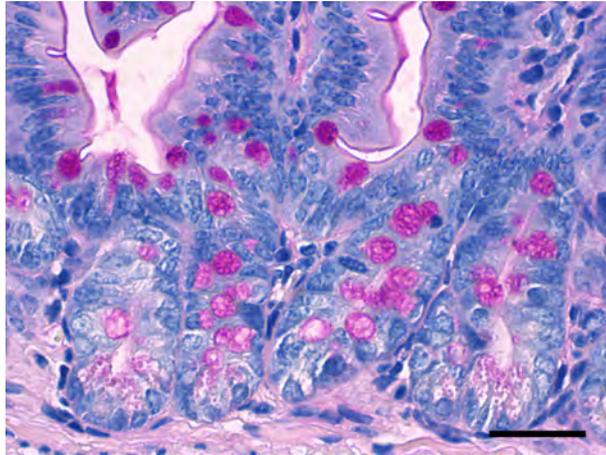
Beim Vergleich der vier Stämme waren bei der Kryptauswertung weniger stammestypische Unterschiede festzustellen als bei der Auszählung PAS-positiver Zellen in den Zotten. Im Jejunumkryptepithel der WT-Mäuse waren keine besonderen Unterschiede im Anteil PAS-positiver Zellen zu beobachten. Die NMRI-Mäuse besaßen in den Ileumkrypten der WT-Mäuse signifikant mehr PAS-positive Zellen als die Mäuse des Stammes WT-C57BL/6J ($P = 0,012$). Im Jejunum der CF-Tiere waren wieder keine besonderen Unterschiede in den Anteilen der Becherzellen am Kryptepithel zwischen den Stämmen vorhanden. Im Ileumkryptepithel der NMRI-*cfr*^{tm1Cam}-Mäuse waren signifikant mehr schleimproduzierende Zellen vorhanden gegenüber dem Stamm BALB/cJ-*cfr*^{TgH(neoim)1Hgu} ($P = 0,012$). Die Gruppe der DBA/2J-*cfr*^{TgH(neoim)1Hgu}-Tiere besaß in den Ileumkrypten signifikant mehr PAS-positive Zellen als die BALB/cJ-*cfr*^{TgH(neoim)1Hgu}- ($P = 0,012$) und die C57BL/6J-*cfr*^{TgH(neoim)1Hgu}-Mäuse ($P = 0,022$).

Abb 12: Anteil PAS-positiver Zellen am Kryptepithel des Jejunums (Jeju) und Ileums (Ile) in Prozent, Vergleich zwischen den Wildtyp (WT) -Stämmen (links) und Zystische Fibrose (CF) -Stämmen (rechts)



Die Säulen geben die arithmetischen Mittelwerte der Quotienten aus der Anzahl PAS-positiver Zellen/Enterozytenzahl der Krypten (angegeben in %) von jeweils fünf Tieren einer Gruppe an. Der Fehlerindikator bezeichnet die Standardabweichung der Mittelwerte (SEM). Über den Säulen eingezeichnete Linien mit einem Stern verbinden zu vergleichende Mausgruppen, bei denen statistisch signifikante Unterschiede mit einem P-Wert $\leq 0,05$ aufgetreten sind.

A



B

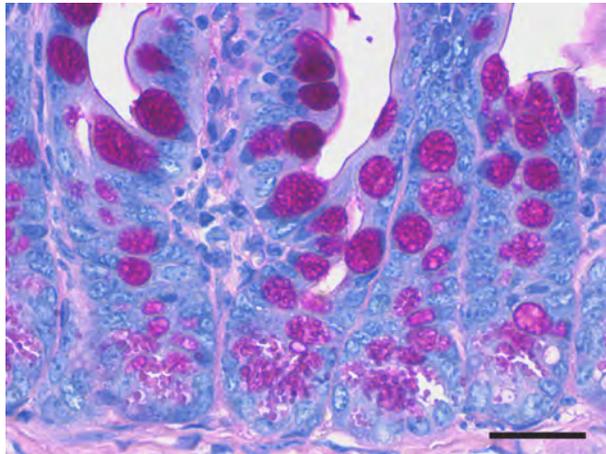


Abb 13: Beispiel einer Perjodsäure-Schiff- (PAS) Reaktion (pinkes Zytoplasma) in den Krypten von Gewebeschnitten des formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Ileums jeweils einer WT-C57BL/6J- (A) und einer C57BL/6J- *cftr*^{TgH(neoim)}1Hgu-Maus (B) bei gleicher Vergrößerung (Größenbalken = 50µm). Beim CF-Genotyp konnte bei der Quantifizierung eine signifikante Zunahme der Anzahl an PAS-positiven Zellen in den Ileumkrypten dieses Mausstammes nachgewiesen werden.

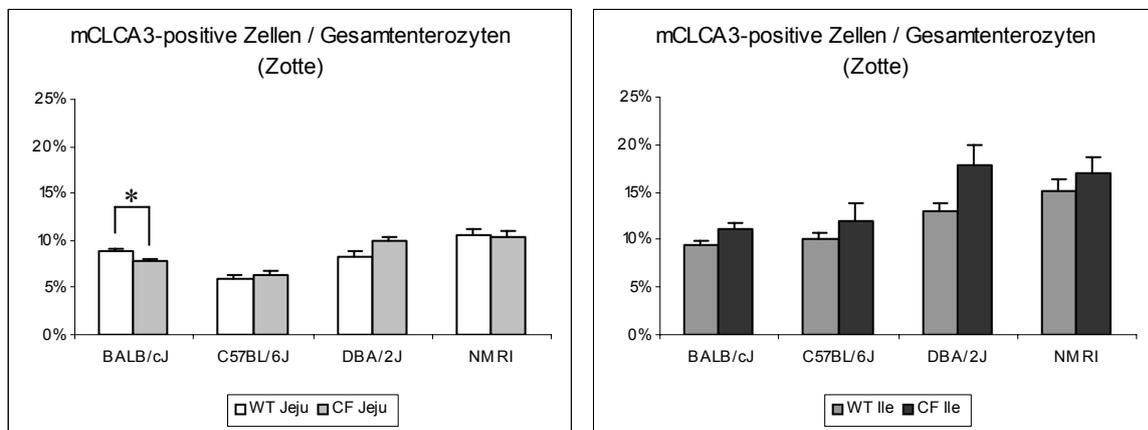
5.3 Histologische Quantifizierung von mCLCA3-Protein-haltigen Becherzellen

Die Auszählung und statistische Auswertung mCLCA3-Protein-positiver Zellen erfolgte nach demselben Muster wie bei der PAS-Reaktion und diente der Normalisierung der mCLCA3-RT-qPCR-Expressionsdaten. Vor allem die Becherzellen der beiden Darmabschnitte, die in den oberen zwei Dritteln der Krypten gelegen waren, waren mCLCA3-positiv, wie schon zuvor beschrieben wurde (LEVERKOEHNE u. GRUBER 2002) und stellten sich mit braungranuliertem Zytoplasma dar (siehe Abb. 18). Die mCLCA3-negativen Becherzellen fanden sich vor allem in den basalen Anteilen der Krypten und in den Zotten.

5.3.1 Quantifizierung der mCLCA3-Protein-haltigen Becherzellen in den Zotten

Beim Vergleich der beiden Genotypen waren im Zottenepithel des Jejunums der BALB/cJ-*cfr*^{TgH(neoim)1Hgu}-Mäuse signifikant weniger mCLCA3-positive Zellen zu detektieren als bei den WT-BALB/cJ-Mäusen ($P = 0,037$). In allen anderen Fällen zeigten sich mehr mCLCA3-positive Zellen bei den CF-Mausstämmen, diese Unterschiede waren jedoch nur sehr gering und nicht statistisch signifikant.

Abb 14: Anteil mCLCA3-positiver Zellen am Zottenepithel des Jejunums (Jeju; links) und Ileums (Ile; rechts) in Prozent, Vergleich zwischen Wildtyp (WT) - und Zystische Fibrose (CF) -Mäusen

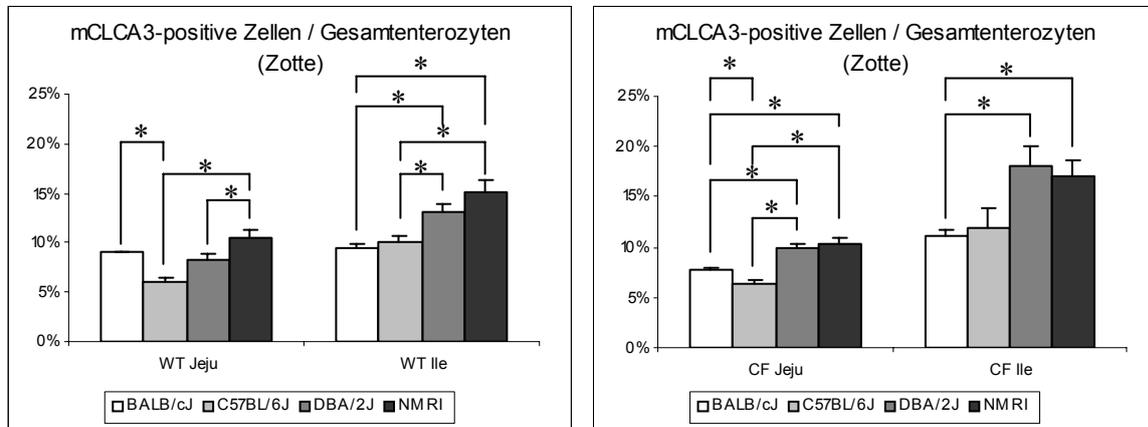


Die Säulen geben die arithmetischen Mittelwerte der Quotienten aus der Anzahl mCLCA3-positiver Zellen/Enterozytenzahl der Zotten (angegeben in %) von jeweils fünf Tieren einer Gruppe an. Der Fehlerindikator bezeichnet die Standardabweichung der Mittelwerte (SEM). Über den Säulen eingezeichnete Linien mit einem Stern verbinden zu vergleichende Mausgruppen, bei denen statistisch signifikante Unterschiede mit einem P-Wert $\leq 0,05$ aufgetreten sind.

Beim Vergleich der Stämme untereinander ergaben sich eine Vielzahl signifikanter Unterschiede, die vor allem zwischen den BALB/cJ- und C57BL/6J-Tieren einerseits gegenüber den DBA/2J- und NMRI-Tieren ausgeprägt waren, wobei die erstgenannten beiden Mausstämme weniger mCLCA3-positive Zellen aufwiesen als die anderen beiden Stämme. Dies war vor allem im Ileum der WT-Mäuse und im Jejunum der CF-Tiere ausgeprägt (siehe Abb. 15). Zur besseren Übersicht werden diese P-Werte in Tabelle 24 dargestellt.

Weiterhin war sowohl bei den WT-BALB/cJ-Tieren als auch bei den CF-BALB/cJ-*cfr*^{TgH(neoim)1Hgu}-Tieren ein signifikant höherer Anteil an mCLCA3-positiven Zellen im Jejunum als bei den C57BL/6J-Mäusen zu beobachten (jeweils P=0,012). Die WT-NMRI-Mäuse besaßen signifikant mehr mCLCA3-positive Zellen in dieser Lokalisation als die WT-DBA/2J-Mäuse (P=0,022).

Abb. 15: Anteil mCLCA3-positiver Zellen am Zottenepithel des Jejunums (Jeju) und Ileums (Ile) in Prozent, Vergleich zwischen den Wildtyp (WT) -Stämmen (links) und Zystische Fibrose(CF) -Stämmen (rechts)



Die Säulen geben die arithmetischen Mittelwerte der Quotienten aus der Anzahl mCLCA3-positiver Zellen/Enterozytenzahl der Zotten (angegeben in %) von jeweils fünf Tieren einer Gruppe an. Der Fehlerindikator bezeichnet die Standardabweichung der Mittelwerte (SEM). Über den Säulen eingezeichnete Linien mit einem Stern verbinden zu vergleichende Mausgruppen, bei denen statistisch signifikante Unterschiede mit einem P-Wert $\leq 0,05$ aufgetreten sind.

Tabelle 24: Immunhistochemische Quantifizierung von mCLCA3-exprimierenden Zellen, P-Werte der Zottenausählung beim Stammesvergleich der C57BL/6J- und BALB/cJ-Mäuse gegenüber den DBA/2J- und NMRI-Mäusen

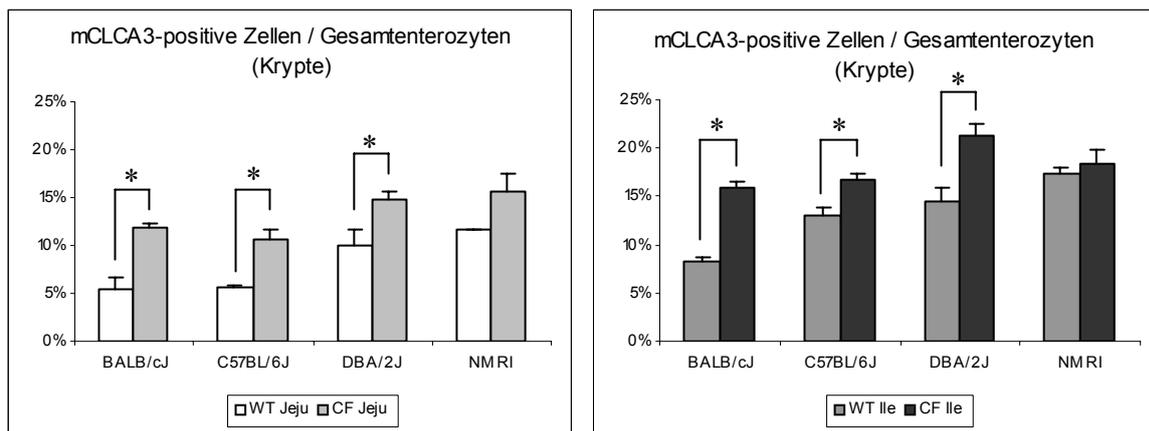
	WT Jejunum	WT Ileum	CF Jejunum	CF Ileum
BALB/cJ < DBA/2J	n.s.	P=0,012	P=0,012	P=0,012
BALB/cJ < NMRI	n.s.	P=0,037	P=0,012	P=0,012
C57BL/6J < DBA/2J	n.s.	P=0,037	P=0,102	n.s.
C57BL/6J < NMRI	P=0,012	P=0,037	P=0,012	n.s.

n.s = nicht signifikant

5.3.2 Quantifizierung der mCLCA3-Protein-haltigen Becherzellen in den Krypten

Beim Genotypenvergleich zeigten die CF-Tiere aller Stämme deutliche Zunahmen an mCLCA3-positiven Zellen sowohl im Ileum- als auch im Jejunumkryptepithel. Dabei waren statistisch signifikant mehr mCLCA3-positive Zellen sowohl im Jejunum als auch im Ileum bei den Tieren der Stämme BALB/cJ-*cfr*^{TgH(neoim)1Hgu} (jeweils P=0,012) C57BL/6J-*cfr*^{TgH(neoim)1Hgu} (P=0,012; P=0,037; siehe Abbildung 2) und DBA/2J-*cfr*^{TgH(neoim)1Hgu} (jeweils P=0,022) vorhanden.

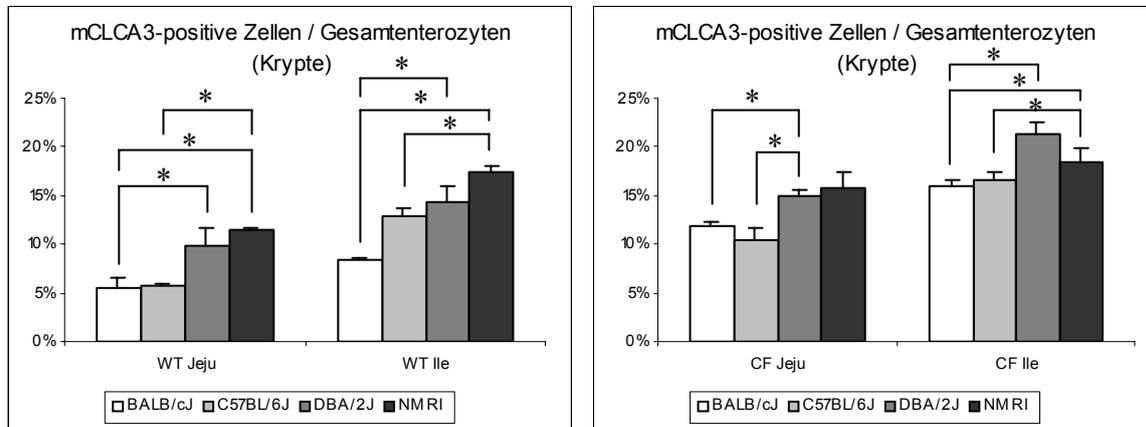
Abb 16: Anteil mCLCA3-positiver Zellen am Kryptepithel des Jejunums (Jeju; links) und Ileums (Ile; rechts) in Prozent, Vergleich zwischen Wildtyp (WT) - und Zystische Fibrose (CF) -Mäusen



Die Säulen geben die arithmetischen Mittelwerte der Quotienten aus der Anzahl mCLCA3-positiver Zellen/Enterozytenzahl der Krypten (angegeben in %) von jeweils fünf Tieren einer Gruppe an. Der Fehlerindikator bezeichnet die Standardabweichung der Mittelwerte (SEM). Über den Säulen eingezeichnete Linien mit einem Stern verbinden zu vergleichende Mausgruppen, bei denen statistisch signifikante Unterschiede mit einem P-Wert $\leq 0,05$ aufgetreten sind.

Beim Vergleich der Stämme untereinander konnte man wieder eine ähnlich ausgeprägte Gruppenbildung beobachten wie bei der Zottenauswertung, wobei die BALB/cJ- und C57BL/6J-Mäuse eher weniger und die DBA/2J- und NMRI-Tiere eher mehr mCLCA3-positive Zellen in den Krypten besaßen. Zur besseren Übersicht sind diese signifikanten Unterschiede in der Tabelle 25 zusammengefasst.

Abb. 17: Anteil mCLCA3-positiver Zellen am Kryptepithel des Jejunums (Jeu) und Ileums (Ile) in Prozent, Vergleich zwischen den Wildtyp (WT) -Stämmen (links) und Zystische Fibrose (CF) -Stämmen (rechts)



Die Säulen geben die arithmetischen Mittelwerte der Quotienten aus der Anzahl mCLCA3-positiver Zellen/Enterozytenzahl der Krypten (angegeben in %) von jeweils fünf Tieren einer Gruppe an. Der Fehlerindikator bezeichnet die Standardabweichung der Mittelwerte (SEM). Über den Säulen eingezeichnete Linien mit einem Stern verbinden zu vergleichende Mausgruppen, bei denen statistisch signifikante Unterschiede mit einem P-Wert $\leq 0,05$ aufgetreten sind.

Tabelle 25: Immunhistochemische Quantifizierung von mCLCA3-exprimierenden Zellen, P-Werte der Kryptenausählung beim Stammesvergleich der C57BL/6J- und BALB/cJ-Mäuse gegenüber den DBA/2J- und NMRI-Mäusen

	WT Jejunum	WT Ileum	CF Jejunum	CF Ileum
BALB/cJ < DBA/2J	P=0,037	P=0,012	P=0,012	P=0,012
BALB/cJ < NMRI	P=0,012	P=0,012	n.s.	P=0,022
C57BL/6J < DBA/2J	n.s.	n.s.	P=0,022	P=0,022
C57BL/6J < NMRI	P=0,012	P=0,012	n.s.	n.s.

n.s.= nicht signifikant

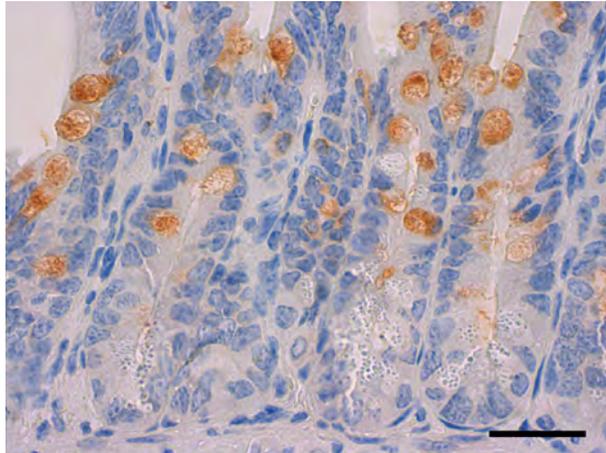
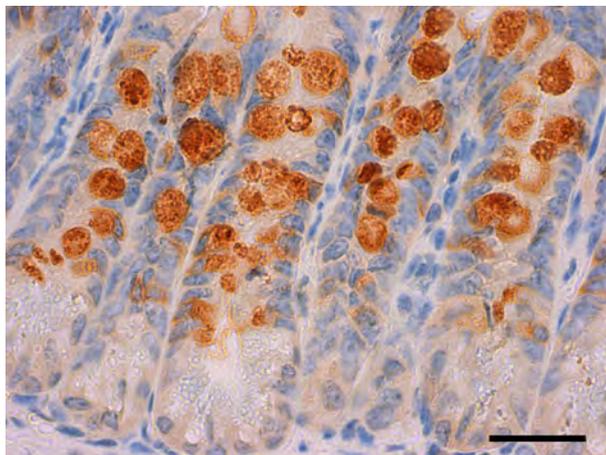
A**B**

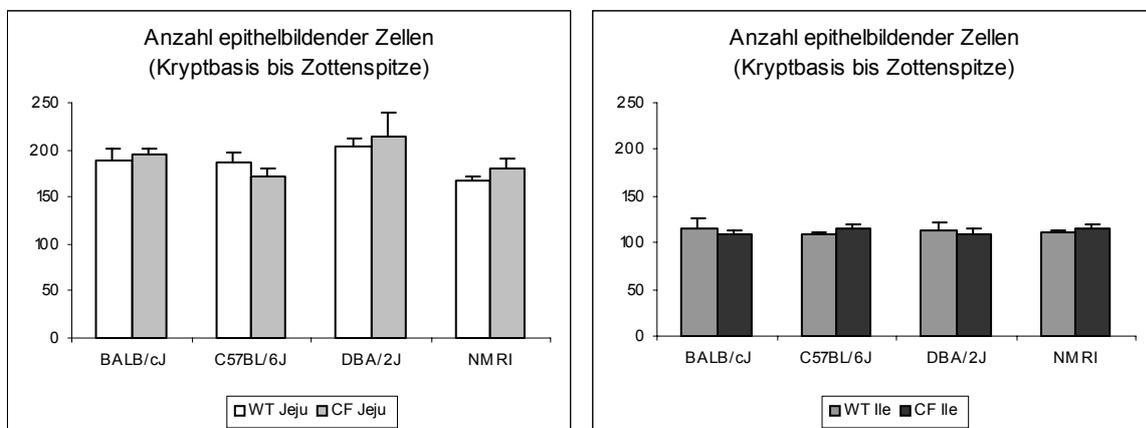
Abb. 18: Beispiel einer mCLCA3-Immunhistochemie (braunes Zytoplasma) von Gewebeschnitten des formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Ileums (Kryptenregion) jeweils einer WT-C57BL/6J- (A) und einer C57BL/6J-*cftr*^{TgH(neoim)}1Hgu-Maus (B) bei gleicher Vergrößerung (Größenbalken = 50µm). Beim CF-Genotyp konnte bei der Quantifizierung eine signifikante Zunahme der mCLCA3-positiven Zellen in den Ileumkrypten dieses Mausstammes nachgewiesen werden. Die mCLCA3-positiven Zellen fanden sich vor allem in den oberen zwei Dritteln der Krypten und weniger im Zottenepithel.

5.4 Ergebnisse der Darmepithelzellzahlauswertung

Es wurde der arithmetische Mittelwert der epithelbildenden Zellen, von der Kryptbasis bis zur Zottenspitze, im Jejunum und Ileum aus jeweils 20 Krypt-Villus-Achsen pro Tier und Lokalisation ermittelt. Statistisch untersucht wurden Genotyp- und Stammeseinflüsse, die die Darmepithelzellzahl beeinflussen. Gleichzeitig wurden die Mitose- und Apoptoseraten erfasst (siehe Abschnitt 5.5 und 5.6), um zu untersuchen, ob Zellanzahlzu- oder -abnahmen mit einer erhöhten Mitose- oder Apoptoserate zusammenhängen.

Beim Vergleich der beiden Genotypen wurde bei keinem der vier untersuchten Stämme ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der epithelbildenden Anzahl an Zellen festgestellt. Insgesamt waren die Unterschiede bei diesem Vergleich sehr gering und es war kein eindeutiger Trend ersichtlich.

Abb. 19: Durchschnittliche Gesamtepithelzellzahl pro Krypt-Villus-Achse des Jejunums (Jeju; links) und Ileums (Ile; rechts), Vergleich zwischen Wildtyp (WT) - und Zystische Fibrose (CF) -Mäusen

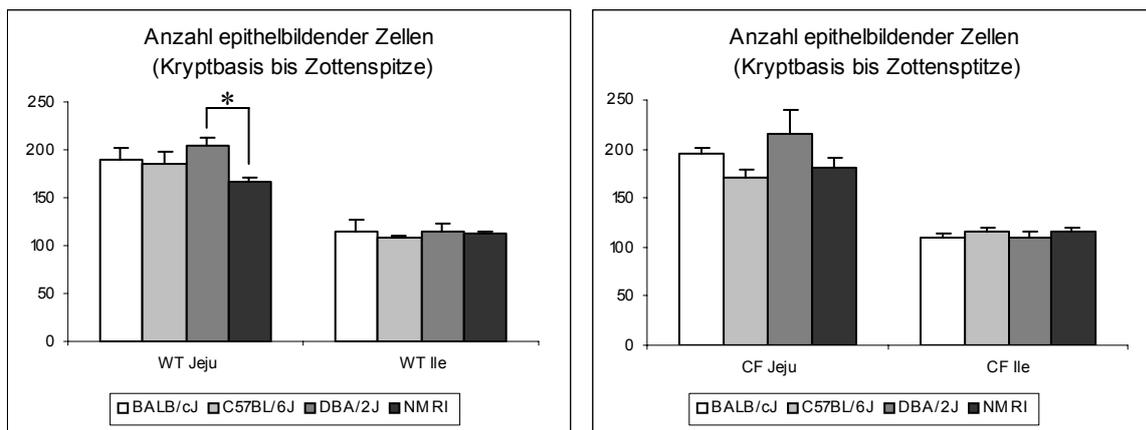


Die Säulen geben die arithmetischen Mittelwerte aus der Anzahl an epithelbildenden Zellen der Krypt-Villus-Achse von jeweils fünf Tieren einer Gruppe an. Der Fehlerindikator bezeichnet die Standardabweichung der Mittelwerte (SEM).

Beim Vergleich der vier Stämme untereinander wurden im Jejunum der WT-DBA/2J-Mäuse signifikant mehr Darmepithelzellen festgestellt als bei den WT-NMRI-Mäusen ($P = 0,037$).

Auch bei den CF-Mäusen dieses Stammes wird diese Tendenz im Jejunum deutlich, ohne dass der Wert hier signifikant wurde. Im Ileum zeigten alle Stämme bei beiden Genotypen eine sehr ähnliche Darmepithelzellzahl.

Abb. 20: Durchschnittliche Gesamtepithelzellzahl pro Krypt-Villus-Achse des Jejunums (Jeju) und Ileums (Ile), Vergleich zwischen den Wildtyp (WT) -Stämmen (links) und Zystische Fibrose (CF) -Stämmen (rechts)



Die Säulen geben die arithmetischen Mittelwerte aus der Anzahl an epithelbildenden Zellen der Krypt-Villus-Achse von jeweils fünf Tieren einer Gruppe an. Der Fehlerindikator bezeichnet die Standardabweichung der Mittelwerte (SEM). Über den Säulen eingezeichnete Linien mit einem Stern verbinden zu vergleichende Mausgruppen, bei denen statistisch signifikante Unterschiede mit einem P-Wert $\leq 0,05$ aufgetreten sind.

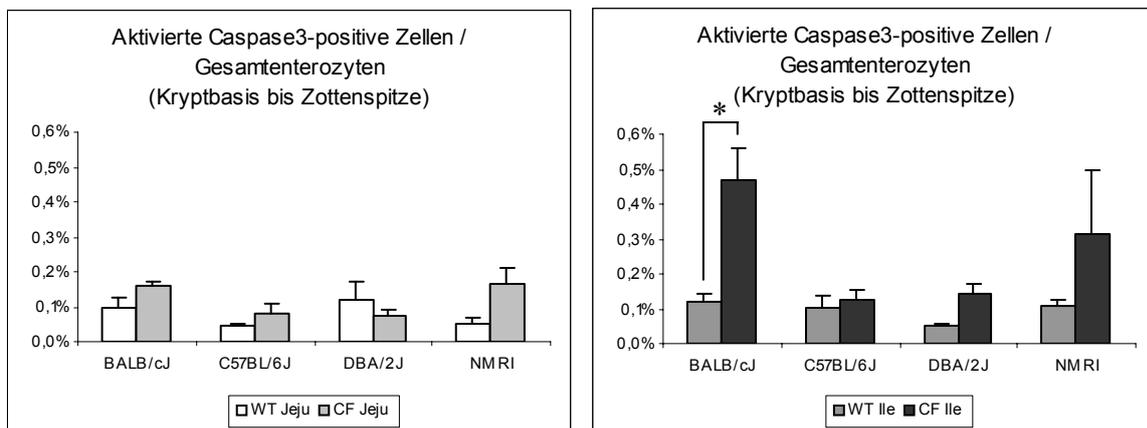
5.5 Histologische Quantifizierung der apoptotischen Darmepithelzellen

Bei dieser immunhistochemischen Färbung wurden die Enterozyten über die gesamte Länge von 20 Krypt-Villus-Achsen gezählt und anschließend die aktivierte Caspase3-positiven Zellen. Aus diesen beiden Werten für die zwanzig Krypt-Villus-Achsen pro Tier und Lokalisation wurde der Quotient gebildet, der einen Mittelwert aus jeweils fünf Tieren darstellte. Für diese Mittelwerte wurden die einfachen Standardabweichungen und Standardabweichungen der Mittelwerte (SEM) gebildet, wobei letztere als Fehlerindikator in die Graphen eingezeichnet wurden.

Die aktivierte Caspase3-positiven Zellen waren an braunen, im Zytoplasma verstreuten Punkten erkennbar (apoptotischen Körperchen), was mit dem Vorkommen der aktiven Form des Enzyms aktivierte Caspase3 im Zytoplasma zu erklären ist (siehe Abb. 23). Die positiven Zellen waren entweder sehr vereinzelt am Grunde der Krypten oder an den äußersten Zottenspitzen lokalisiert, wo sich teilweise regelrechte Ansammlungen apoptotischer Körperchen auch bereits ins Lumen abgegebener Zellen fanden. Diese wurden, sobald sie sich frei im Darmlumen befanden, nicht mitgezählt.

Die aktivierte Caspase3-positiven Zellen machten am Darmepithel einen sehr geringen Anteil aus. Beim Vergleich der beiden Genotypen konnte im Jejunum kein einheitlicher Einfluss des CF-Genotyps auf den Anteil apoptotischer Zellen festgestellt werden, im Ileum jedoch waren bei allen CF-Mausstämmen deutlich höhere Anteile apoptotischer Zellen zu vermerken. Dieser Unterschied war jedoch einzig bei den BALB/cJ-*cfr*^{TgH(neoim)¹Hgu}-Mäusen signifikant ($P = 0,012$) zu finden. Diese vermehrten apoptotischen Zellen waren in großer Anzahl in den äußersten Epithelspitzen lokalisiert.

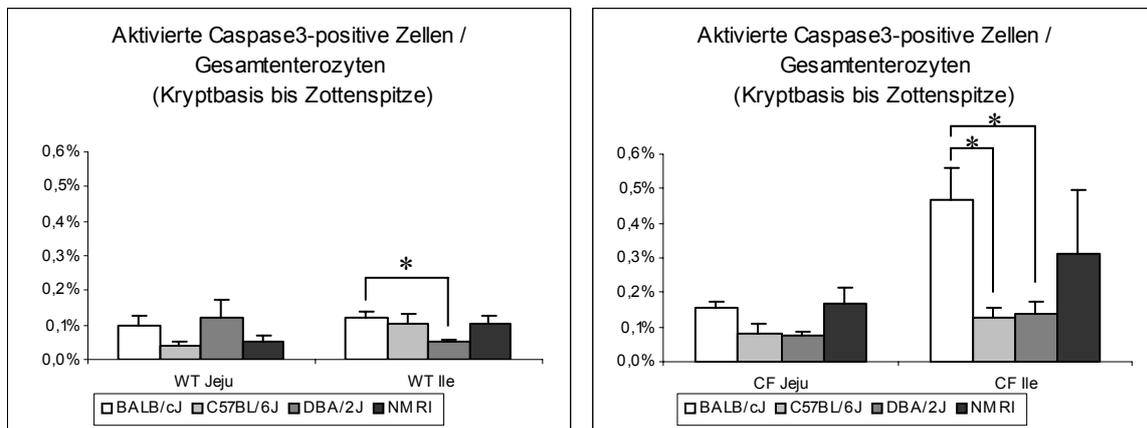
Abb. 21: Anteil aktivierte Caspase3-positiver Zellen am Darmepithel des Jejunums (Jeju; links) und Ileums (Ile; rechts) in Prozent, Vergleich zwischen Wildtyp (WT) - und Zystische Fibrose (CF) -Mäusen



Die Säulen geben die arithmetischen Mittelwerte der Quotienten aus der Anzahl aktivierte Caspase3-positiver Zellen/Enterozytenzahl der Krypt-Villus-Achse (angegeben in %) von jeweils fünf Tieren einer Gruppe an. Der Fehlerindikator bezeichnet die Standardabweichung der Mittelwerte (SEM). Über den Säulen eingezeichnete Linien mit einem Stern verbinden zu vergleichende Mausgruppen, bei denen statistisch signifikante Unterschiede mit einem P-Wert $\leq 0,05$ aufgetreten sind.

Beim Stammesvergleich wurde deutlich, dass sich die BALB/cJ-Mäuse insgesamt durch mehr Apoptosen auszeichneten als die übrigen Stämme. So lag der Anteil aktivierte Caspase3-positiver Zellen im Ileum der WT-BALB/cJ-Mäuse und im Jejunum der BALB/cJ-*cfr*^{TgH(neoim)1Hgu}-Tiere signifikant über dem der WT- und DBA/2J-*cfr*^{TgH(neoim)1Hgu}-Tiere in den jeweiligen Lokalisationen (P = 0,012 bzw. P = 0,022). Die Apoptosezahl im Ileum der BALB/cJ-*cfr*^{TgH(neoim)1Hgu}-Mäuse war außerdem signifikant höher als bei den C57BL/6J-*cfr*^{TgH(neoim)1Hgu} und DBA/2J-*cfr*^{TgH(neoim)1Hgu}-Mäusen (jeweils P = 0,012).

Abb. 22: Anteil aktivierte Caspase3-positiver Zellen am Darmepithel des Jejunums (Jeju) und Ileums (Ile) in Prozent, Vergleich zwischen den Wildtyp (WT) -Stämmen (links) und Zystische Fibrose (CF) -Stämmen (rechts)



Die Säulen geben die arithmetischen Mittelwerte der Quotienten aus der Anzahl aktivierte Caspase3-positiver Zellen/Enterozytenzahl der Krypt-Villus-Achse (angegeben in %) von jeweils fünf Tieren einer Gruppe an. Der Fehlerindikator bezeichnet die Standardabweichung der Mittelwerte (SEM). Über den Säulen eingezeichnete Linien mit einem Stern verbinden zu vergleichende Mausgruppen, bei denen statistisch signifikante Unterschiede mit einem P-Wert $\leq 0,05$ aufgetreten sind.

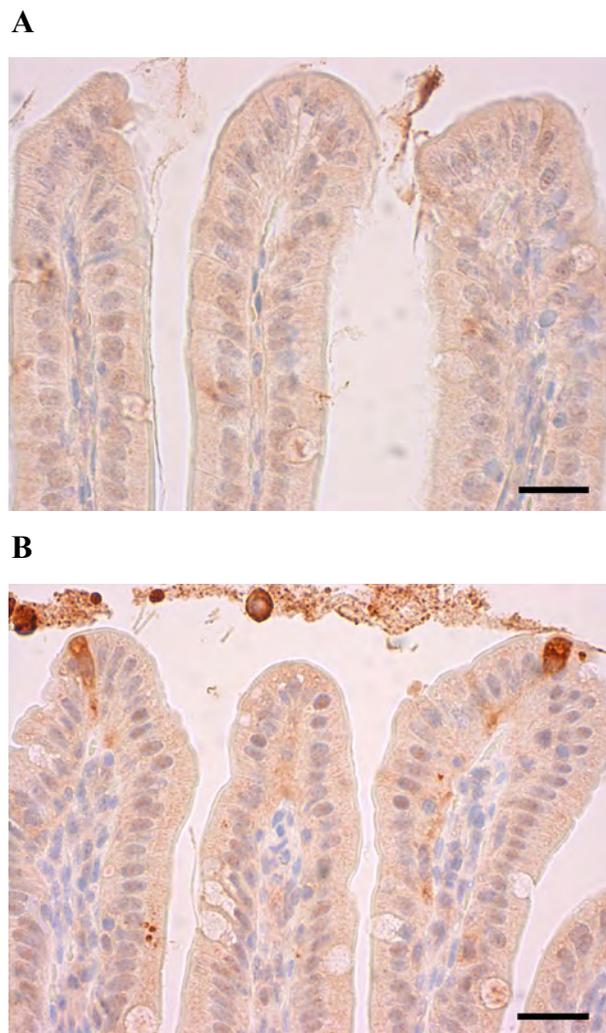


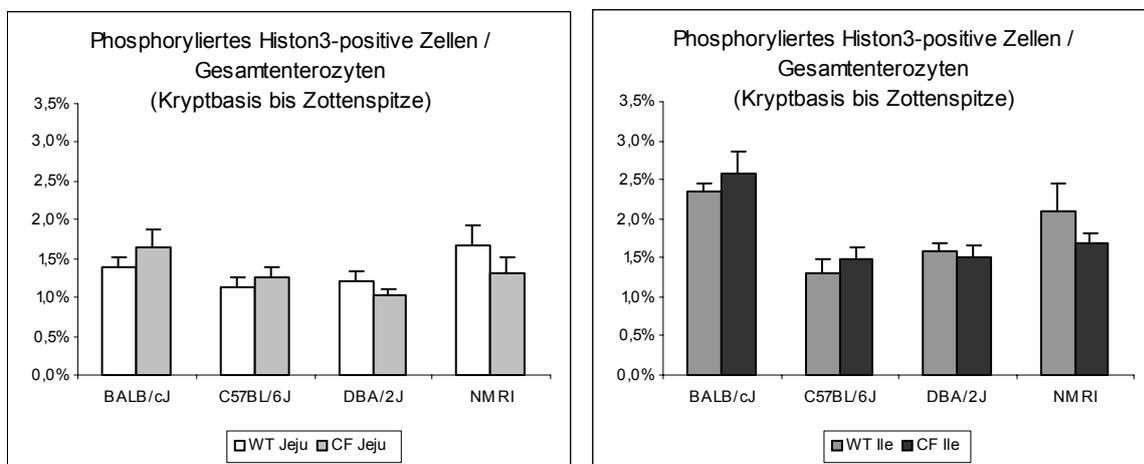
Abb. 23: Beispiel eines immunhistochemischen Nachweises der aktivierten Form des Enzyms Caspase3 (braunes Zytoplasma oder braune apoptotische Körperchen im Zytoplasma), welches als Marker für apoptotic bodies operiert. Es handelt sich um Gewebeschnitte des formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Ileums jeweils einer WT-BALB/cJ- (A) und einer BALB/cJ-*cfr*^{TgH(neoim)}1Hgu-Maus (B) bei gleicher Vergrößerung (Größenbalken = 50µm). Beim CF-Genotyp konnte bei der Quantifizierung eine signifikante Zunahme der aktivierte Caspase3-positiven Zellen im Darmepithel dieses Mausstammes nachgewiesen werden, die durchschnittlich 0,04% betrug. Apoptosen fanden sich vor allem im Epithel der Zottenspitzen und nur ganz vereinzelt in den Darmkrypten.

5.6 Histologische Quantifizierung proliferationsaktiver Darmepithelzellen

Die Auswertung des immunhistochemischen Nachweises des phosphorylierten Histon3-Proteins erfolgte auf dieselbe Weise wie bei dem immunhistochemischen Nachweis des aktivierte Caspase3-Proteins. Die phosphoryliertes Histon3-positiven Zellen stellten sich mit braunen oder gesprenkelten Zellkernen dar, was mit dem ausschließlich nukleären Vorkommen dieses Proteins zu erklären ist. Positive Zellen fanden sich vor allem im mittleren Drittel der Krypten, wo die Stammzellzone des Darmepithels gelegen ist (siehe Abb. 26).

Beim Vergleich der beiden Genotypen wurden keine allgemeinen Trends oder signifikante Unterschiede bei der Mitosehäufigkeit beobachtet.

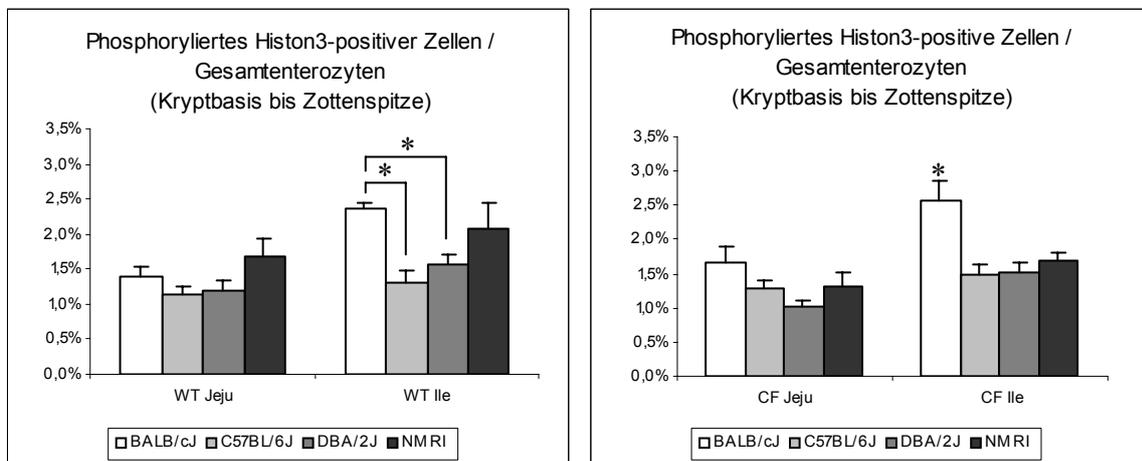
Abb. 24: Anteil phosphoryliertes Histon3-positiver Zellen am Darmepithel des Jejunums (Jeju; links) und Ileums (Ile; rechts) in Prozent, Vergleich zwischen Wildtyp- (WT) - und Zystische Fibrose (CF) -Mäusen



Die Säulen geben die arithmetischen Mittelwerte der Quotienten aus der Anzahl an phosphorylierten Histon3-positiven Zellen/Enterozytenzahl der Krypt-Villus-Achse (angegeben in %) von jeweils fünf Tieren einer Gruppe an. Der Fehlerindikator bezeichnet die Standardabweichung der Mittelwerte (SEM). Über den Säulen eingezeichnete Linien mit einem Stern verbinden zu vergleichende Mausgruppen, bei denen statistisch signifikante Unterschiede mit einem P-Wert $\leq 0,05$ aufgetreten sind.

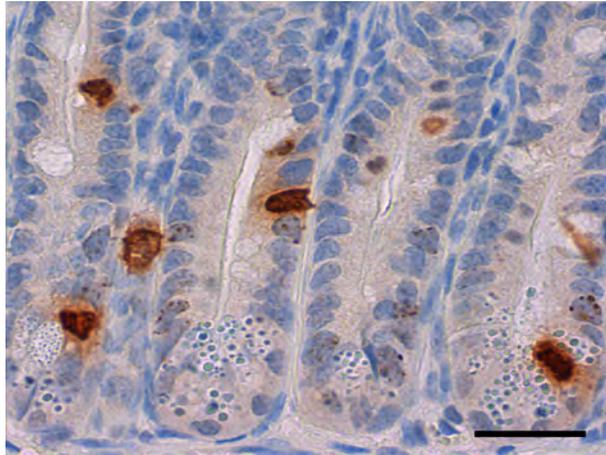
Beim Vergleich der Stämme untereinander zeigten die WT-BALB/cJ- und BALB/cJ-*cfr*^{TgH(neoim)1Hgu}-Mäuse deutlich mehr phosphoryliertes Histon3-positive Zellen im Ileum als die übrigen Stämme. Dies war in folgenden Fällen signifikant: Die WT-BALB/cJ Tiere zeigten signifikant mehr Zellteilungen im Ileumepithel als die WT-C57BL/6J- und die WT-DBA/2J-Mäuse (jeweils $P = 0,012$). Die BALB/cJ-*cfr*^{TgH(neoim)1Hgu}-Mäuse wiesen signifikant mehr Zellteilungen als alle drei anderen CF-Stämme in dieser Lokalisation auf (jeweils $P = 0,012$).

Abb. 25: Anteil phosphoryliertes Histon3-positiver Zellen am Darmepithel des Jejunums (Jeju) und Ileums (Ile) in Prozent, Vergleich zwischen Wildtyp (WT) -Stämmen (links) und Zystische Fibrose (CF) -Stämmen (rechts)



Die Säulen geben die arithmetischen Mittelwerte der Quotienten aus der Anzahl an phosphorylierten Histon3-positiven Zellen/Enterozytenzahl der Krypt-Villus-Achse (angegeben in %) von jeweils fünf Tieren einer Gruppe an. Der Fehlerindikator bezeichnet die Standardabweichung der Mittelwerte (SEM). Über den Säulen eingezeichnete Linien mit einem Stern verbinden zu vergleichende Mausgruppen, bei denen statistisch signifikante Unterschiede mit einem $P\text{-Wert} \leq 0,05$ aufgetreten sind.

A



B

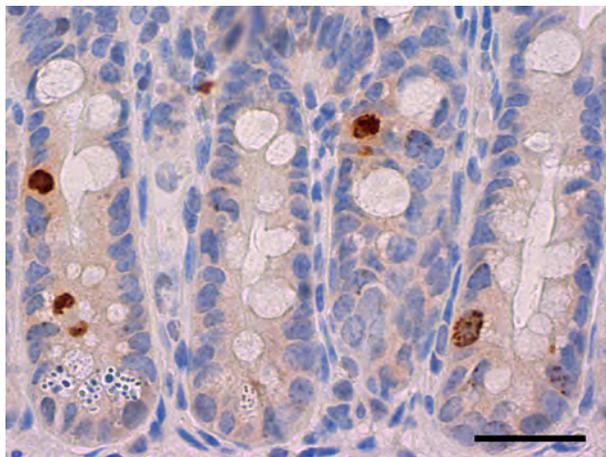


Abb. 26: Beispiel eines immunhistochemischen Nachweises des phosphorylierten Histon3-Proteins (braune Zellkerne, teils in der Anaphase, oder braune Sprengelung der Zellkerne), welcher als Marker für mitotische Zellen operiert. Es handelt sich um Gewebeschnitte des formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Ileums (Kryptbereich) jeweils einer WT-BALB/cJ- (A) und einer BALB/cJ-*cfr*^{TgH(neoim)1Hgu}-Maus (B) bei gleicher Vergrößerung (Größenbalken = 50µm). Bei CF- und WT-Mäusen aller untersuchten Mausstämme konnte morphometrisch keine signifikante Zunahme der phosphoryliertes Histon3-positiven Zellen im Darmepithel nachgewiesen werden. Mitosen fanden sich ausschließlich im Epithel der Darmkrypten, nicht in den Zotten.

5.7 Ergebnisse der Sequenzierungen der mCLCA3-kodierenden cDNA-Sequenzen bei den eingesetzten Mausstämmen

Bei kürzlich veröffentlichten Ergebnissen von Sequenzanalysen bestimmter Mikrosatelliten des *hclca1*-Gens beim Menschen konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen bestimmten Allelen und dem Ausprägungsgrad einer Ca^{2+} -aktivierbaren Cl^- -Leitfähigkeit im Rektumepithel von CF-Patienten gefunden werden (RITZKA et al. 2004). Aufgrund dieser Beobachtung sollte untersucht werden, ob Allelvariationen in den kodierenden Abschnitten des *mclca3*-Gens, also dem entsprechenden Maus-Ortholog, bei unterschiedlichen Mausstämmen bestehen und diese möglicherweise für die beobachteten Stammesvariationen verantwortlich sein könnten. Dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst nur die kodierende Sequenz (offener Leserahmen) der mRNA beziehungsweise cDNA mittels RT-PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Die Sequenzierprodukte wurden dabei aus gepoolten cDNA-Proben der fünf WT-Mäuse der vier untersuchten Mausstämme BALB/cJ, C57BL/6J, DBA/2J und NMRI mittels PCR hergestellt. Bei der Sequenzierung des offenen Leserahmens von mCLCA3 wurde bei allen vier genetischen Hintergründen dieselbe cDNA-Sequenz gefunden, die der in der Gendatenbank der Maus abgelegten Sequenz entspricht (Genbank Accession No. AB_017156). Es gab keinen Hinweis auf eine bestehende Allelvariation in der kodierenden Sequenz bei diesen vier untersuchten Mausstämmen. Die Mikrosatellitensequenzen oder andere nicht kodierende Abschnitte des *mclca3*-Gens oder der mRNA wurden nicht untersucht.