

4 Material und Methoden

4.1 Versuchsplanung

Zunächst wurde eine Reverse Transkriptase-quantitative Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) im *real time* Modus etabliert, um eine spezifische quantitative Aussage über die mRNA-Expression der mCLCA-Vertreter 1 bis 4 treffen zu können. Dazu wurden spezifische, mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markierte *TaqMan* Sonden und Primer synthetisiert und nach ihren Spezifitätseigenschaften, zwischen den vier murinen Homologen zuverlässig diskriminieren zu können, ausgewählt. In gleicher Weise ist in unserer Arbeitsgruppe eine RT-qPCR für den murinen Elongationsfaktor-1 α (EF-1 α) etabliert worden (LEVERKOEHNE et al. 2002), der auch in dieser Untersuchung als *Housekeeping*-Gen diente. Das *Housekeeping*-Gen EF-1 α diente der Normalisierung der quantitativen Aussage der RT-qPCR über die mRNA-Expression der gesuchten Gene mCLCA1 bis 4 und wurde für die Untersuchungen ausgewählt, da es im Vergleich zu anderen *Housekeeping*-Genen für eine besonders konstante Expressionsrate in unterschiedlichen Geweben bekannt ist (GRUBER u. LEVINE 1997).

Das Untersuchungsmaterial stammte von Mäusen der Stämme BALB/cJ, C57BL/6J, DBA/2J und NMRI, und zwar jeweils von fünf Wildtyp- und fünf CF-Mäusen, die uns freundlicherweise vom Zentralen Tierlabor der Medizinischen Hochschule Hannover (Leitung: Prof. Hedrich) überlassen wurden. Die CF-Mäuse der Stämme BALB/cJ, C57BL/6J und DBA/2J waren dabei Träger der milden *cftr*^{TgH(neoim)1Hgu}-Mutation (DORIN et al. 1992), während in den Stamm NMRI die schwerwiegende *cftr*^{tm1Cam}-Mutation eingezüchtet worden war, die im Ursprungsstamm mit einer extrem hohen Sterblichkeit schon in den ersten Lebenstagen einhergeht (RATCLIFF et al. 1993). Die Mäuse wurden im Alter von 9 bis 11 Wochen euthanasiert, ein Zeitpunkt, zu dem die histopathologischen Veränderungen im Darm schon hochgradig ausgeprägt sind (DORIN et al. 1992; RATCLIFF et al. 1993; GRUBB u. GABRIEL 1997). Da bekannt ist, dass bei CF-Mäusen vor allem der distale Dünndarm von intestinalen Komplikationen (Mucus-Ileus) betroffen ist (zusammengefasst von RATCLIFF et al. 1993; GRUBB u. GABRIEL 1997), wurde in der vorliegenden Arbeit aus den Dünndarmabschnitten Jejunum und Ileum die totale RNA isoliert und in komplementäre DNA (cDNA)

umgeschrieben. An den so erhaltenen cDNA-Proben wurde eine qPCR durchgeführt und für jede Probe die gegen EF-1 α normalisierte mRNA-Kopienzahl der vier gesuchten CLCA-mRNA-Sequenzen ermittelt.

Im Rahmen der phänotypischen Charakterisierung wurden von denselben Darmabschnitten Paraffinschnitte hergestellt und mit einer Muzinfärbung (PAS-Reaktion) sowie einer hochsensitiven und hochspezifischen immunhistochemischen Färbung für den Becherzellvertreter mCLCA3 (LEVERKOEHNE u. GRUBER 2002) behandelt. Bei der histologischen Auswertung wurde jeweils der Anteil der positiven Zellen von einer einzelnen Person blind ausgezählt. An Paraffinschnitten derselben Serie wurden des Weiteren mittels immunhistochemischer Färbungen mitotische (phosphoryliertes Histon3-positive) und apoptotische (aktivierte Caspase3-positive) Zellen detektiert und in den beiden Darmabschnitten ausgezählt. Zusammen mit einer Erfassung der Darmepithelzellzahl wurde ermittelt, ob Zu- oder Abnahmen der qPCR-Daten entsprechend mit Zu- oder Abnahmen der Enterozyten (Expressionsort von mCLCA1, mCLCA2 und mCLCA4) oder Becherzellen (Expressionsort von mCLCA3) einhergehen.

Beim Menschen wurde kürzlich beschrieben, dass bestimmte Allelvarianten von Mikrosatelliten des humanen *clca*-Genlocus mit einer erhöhten Ca²⁺-aktivierbaren Cl⁻-Leitfähigkeit im Rektumepithel von CF-Patienten korreliert sind, und zwar mit hoher Wahrscheinlichkeit des *hclca1*-Gens (RITZKA et al. 2004). Ob bei dem entsprechenden Orthologen mCLCA3 der Maus Allelvarianten im offenen Leserahmen, die an den genetischen Hintergrund des Mausstammes gekoppelt sind, existieren, sollte durch eine vergleichende Sequenzanalyse der mCLCA3-cDNA der vier untersuchten Mausstämme geprüft werden. Dazu wurde der gesamte offene Leserahmen der mCLCA3-PCR-Produkte aller vier genetischen Hintergründe sequenziert und miteinander verglichen.

4.2 Chemikalien, Lösungen und Verbrauchsmaterialien

Eine Auflistung aller für die Entnahme und Konservierung von Untersuchungsorganen, die molekularbiologischen Arbeiten und die Immunhistochemie verwendeten Chemikalien, Lösungen und Verbrauchsmaterialien befindet sich im Anhang 10.1.1 bis 10.1.10.

4.3 Tiere und Untersuchungsmaterial

Es wurden die Dünndarmabschnitte Jejunum und Ileum von insgesamt 40 Mäusen untersucht, die im Zentralen Tierlabor (ZTL) der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH; Leitung: Prof. Hedrich) gezüchtet und gehalten wurden oder im Falle der NMRI-Mäuse in der S1-Tierhaltung des Instituts für Pathologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover vermehrt wurden (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Prof. U. Seidler, MHH). Dazu wurden jeweils zehn weibliche Mäuse der ingezüchteten Stämme BALB/cJ, C57BL/6J, und DBA/2J sowie des ausgezüchteten genetischen Hintergrundes NMRI verwendet. In den genannten genetischen Hintergründen wurden ausschließlich homozygote Merkmalsträger, jeweils 5 Wildtyp- und 5 *cftr*-Knockout-Tiere, untersucht.

Die drei ingezüchteten Stämme BALB/cJ, DBA/2J und C57BL/6J wurden alle Anfang des 20. Jahrhunderts in den Jackson Laboratories etabliert, wofür noch heute das J steht. Den Stämmen müsste nach dem J korrekterweise noch das Kürzel des ZTL der MHH folgen (Ztm), also BALB/cJZtm, C57BL/6JZtm und DBA/2JZtm, da diese seit Jahrzehnten dort etabliert sind und bereits Substämme darstellen.

Bei der Mutation der CF-Mäuse der drei ingezüchteten Stämme handelt es sich um eine partielle Duplikation des Exons 10 des *cftr*-Gens, genannt *cftr*^{TgH(neoim)1Hgu}, hervorgerufen durch eine Insertionsmutation, die mit einem milden Phänotyp einhergeht (DORIN et al. 1992). Das ZTL hat die Stämme C57BL/6J- und BALB/cJ-*cftr*^{TgH(neoim)1Hgu} mit der etablierten Mutation aus Edinburgh übernommen (DORIN et al. 1992). Der Stamm DBA/2J-*cftr*^{TgH(neoim)1Hgu} wurde im ZTL erzeugt und wird dort seit 1994 gezüchtet. Im Darmkanal variiert bei Mäusen mit dieser Mutation die Wildtyp-mRNA-Expression individuell zwischen 2% und 74%; eine altersassoziierte Expressionsvariation ist in anderen Organen, aber nicht im Darm beobachtet worden (LARBIG et al. 2002).

Der ausgezüchtete Stamm NMRI ist ebenfalls ein im ZTL seit langem verwendeter Zuchtstamm und ist korrekterweise mit Ztm:NMRI zu bezeichnen.

Die CF-Tiere des Stammes NMRI besitzen den Genotyp *cftr*^{tm1cam}, eine Mutation, bei der ein Stop-Kodon in das Exon 10 des *cftr*-Gens eingefügt wurde. Diese Mutation wurde erstmals von RATCLIFF et al. (1993) im Hintergrund MF1 beschrieben. Die *cftr*^{tm1cam}-Mutation geht mit einem schwerwiegendem Phänotyp einher (RATCLIFF et al. 1993), und sie ermöglicht

keinerlei Restexpression von Wildtyp-CFTR-Protein mehr. Das ZTL hat diese Tiere im Jahr 2002 von der Universität Tübingen bezogen und die Mutation vom Stamm Ztm:MF1 auf den Stamm Ztm:NMRI übertragen, der eine Selektion für höhere Überlebensraten ermöglichte. Alle Versuchstiere wurden im Alter von 9 bis 11 Wochen euthanasiert und untersucht.

Tabelle 2: Einzeltierdaten (alle weiblich)

Tiernummer * ¹⁾	V-Nummer * ²⁾	Stamm	Genotyp
1	1727/04	BALB/cJ	Wildtyp
2	1728/04		
3	1729/04		
4	1730/04		
5	1731/04		
6	1739/04	BALB/cJ	<i>cfr</i> ^{TgH(neoim)IHgu}
7	1740/04		
8	1741/04		
9	1742/04		
10	1743/04		
11	1535/03	C57BL/6J	Wildtyp
12	1536/03		
13	1537/03		
14	1538/03		
15	1539/03		
16	1548/03	C57BL/6J	<i>cfr</i> ^{TgH(neoim)IHgu}
17	1549/03		
18	1550/03		
19	1551/03		
20	1552/03		

Tabelle2: Fortsetzung

Tiernummer* ¹⁾	V-Nummer* ²⁾	Stamm	Genotyp
21	1540/03	DBA/2J	Wildtyp
22	1541/03		
23	1542/03		
24	654/04		
25	655/04		
26	1553/03	DBA/2J	<i>cfr</i> ^{TgH(neom)IHgu}
27	1554/03		
28	1555/03		
29	1556/03		
30	656/04		
31	657/04	NMRI	Wildtyp
32	658/04		
33	659/04		
34	660/04		
35	661/04		
36	663/04	NMRI	<i>cfr</i> ^{tm1Cam}
37	664/04		
38	665/04		
39	666/04		
40	1097/04		

*¹⁾ Tiernummer: Bezeichnung der Einzeltiere in den eigenen Experimenten

*²⁾ V-Nummer: Bezeichnung der Einzeltiere im Archiv der Paraffinschnitte der Stiftung
Tierärztliche Hochschule Hannover

4.3.1 Haltung und genetische Überwachung

Sowohl die Wildtyp- als auch die CF- Tiere der drei ingezüchteten Stämme wurden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen im ZTL der MHH gehalten, wobei die mikrobiologische

Überwachung nach den Richtlinien der *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA) durchgeführt wurde. Als Futter wurde pelletiertes Alleinfuttermittel, Altromin1314 (Altromin, Gesellschaft für Tierernährung mbH, Lage, Deutschland) eingesetzt.

Die Überprüfung der genetischen Authentizität der Inzuchtstämme erfolgte routinemäßig in jeder dritten Generation mit für den Stamm jeweils spezifischen Markern mittels PCR. Die Überwachung der eingekreuzten Mutation und ihre Etablierung in den drei Inzuchtstämmen *cftr*^{TgH(neoim)1Hgu} erfolgte mittels *Southern Blot*-Hybridisierung an Milz-DNA (DORIN et al. 1992), mittels PCR mit den Markern IMR013 und IMR014 (Jackson Laboratories) zur Identifizierung der Neomycin-Kassette und seit Kurzem mittels intragenetischer Genotypisierung über Mikrosatellitenmarker (CHARIZOPOULOU et al. 2004). Diese Methoden kamen bis zur 10. Rückkreuzungsgeneration zum Einsatz.

Aufgrund der geringen Anzahl an homozygoten CF-Tieren in den Würfen der Tiere des Stammes NMRI wurden diese Versuchstiere in der Mäusehaltung des Institutes für Pathologie (S1-Tierhaltung) mit heterozygoten Elterntieren, die aus dem zentralen Tierlabor der MHH stammten (Arbeitsgruppe Prof. Seidler), über einen längeren Zeitraum vermehrt. Die Tiere wurden in individuell mit Überdruck ventilierten Polycarbonatkäfigen auf Weichholzgranulat, das wöchentlich gewechselt wurde, gehalten. Die Haltung in klimatisierten Räumen erfolgte bei einer Raumtemperatur von 22°C +/- 2°C, einer Luftfeuchtigkeit von 55% +/- 5% und künstlicher Beleuchtung in der Zeit von 6.00-18.00 Uhr. Futter und Wasser standen *ad libitum* zur Verfügung, wobei ein pelletiertes Alleinfuttermittel für Ratten und Mäuse (ssniff R/M-H; ssniff Spezialitäten GmbH, Soest, Deutschland) eingesetzt wurde, das den Empfehlungen der Gesellschaft für Versuchstierkunde entspricht. Ab der dritten Lebenswoche bis zum Zeitpunkt der Euthanasie wurde den CF- und Kontrolltieren dieses Stammes ein orales Laxativum 1:1 mit dem Trinkwasser verdünnt (Oralav, Braun, Melsungen, Deutschland) zur Ileusprophylaxe verabreicht.

Die Mäuse wurden im Alter von drei Wochen mittels PCR an aus ihren Schwanzspitzen isolierter DNA genotypisiert. Die Genotypisierung wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Seidler in der MHH unter Verwendung alternativer Primersequenzen für WT-*cftr* und *cftr*^{tm1CAM} durchgeführt (siehe Tabelle 3). Die unterschiedlich großen Produkte wurden anschließend im Agarose-Gel identifiziert.

Tabelle 3: Primersequenzen für die Genotypisierung von WT-*cfr*- und *cfr*^{tm1Cam}-Mäusen

Primerbezeichnung	Primersequenz (5` nach 3`)	Produktlänge
Wild type up	TCCTGATGTTGATTTTGGGA	383 bp
Wild type down	TGGCTGTCTGCTTCCTGACTATGG	
Mutant up	TGCCGACCCGCAGTCCCAGCGTCG	508 bp
Mutant down	CGTGGGGGTCCTTTTCACCAGC	

Mit freundlicher Genehmigung: Auszug aus dem PCR-Protokoll zur Genotypisierung von WT-*cfr*- und *cfr*^{tm1CAM}-Mäusen der Arbeitsgruppe Prof. Seidler (MHH)

4.4 Methoden

4.4.1 Organentnahme und -konservierung

Die Mäuse wurden unter Berücksichtigung der tierschutzrechtlichen Bestimmungen mittels zervikaler Dislokation euthanasiert. Zuvor war ihnen für 3 bis 4 Stunden das Futter entzogen worden, freien Zugang zu Trinkwasser hatten die Tiere bis zum Zeitpunkt der Euthanasie. Die Organentnahme erfolgte möglichst schnell und unter sterilen Bedingungen. Die beiden Dünndarmabschnitte Jejunum und Ileum wurden halbiert und von Resten an Darminhalt mit einem sterilen Metallspatel gereinigt. Die aboral gelegenen Hälften der Proben wurden nach der Fixation in mit flüssigem Stickstoff gekühltem 2-Methyl-Buthan in sterile Aluminiumbriefchen verpackt und bei -85°C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Die oral gelegenen Hälften der Proben wurden ca. 24 Stunden in 10%igem, neutral gepuffertem Formalin fixiert, die anschließende Entwässerung und Einbettung erfolgte automatisiert (Protokoll siehe Anhang). Danach wurden die fertig fixierten Darmstücke in Metallförmchen in flüssiges Paraffinwachs eingeschlossen und auf einer Kühlplatte zum Aushärten gebracht. Die fertigen Paraffinblöcke wurden bei Zimmertemperatur gelagert.

4.4.2 RNA-Isolierung

Für die RNA-Isolierung wurde das Nucleo Spin RNA L Kit (Macherey Nagel, Düren, Deutschland) verwendet. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei Raumtemperatur. Zunächst wurden 50-70 mg eines Darmstückes in tiefgefrorenem Zustand in Lysispuffer mit 0,01% β -Mercaptoethanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) eingewogen. Der Lysispuffer inaktivierte RNasen, bewirkte durch seinen hohen Ionengehalt einen raschen Gewebeaufschluss und sorgte gleichzeitig für eine bessere Bindung an die Silikagel-Membran der RNA-Bindungssäule. Der mechanische Zellaufschluss erfolgte mit Hilfe eines Gewebehomogenisators, mit dem die Proben für ca. 1 Min. in Lysispuffer gemixt wurden. Dabei wurde für jede Probe ein neuer, autoklavierter Plastik-Rotoraufsatz (Südlaborbedarf, Gauting, Deutschland) verwendet. Das homogenisierte Probenmaterial wurde auf die im Kit enthaltene Filtersäule geladen und für 10 Min. bei 4500 x g zentrifugiert. Auf diese Weise wurden gröbere Partikel entfernt. Die Filtersäule wurde verworfen und das gereinigte Homogenisat mit 70%igem Ethanol (verdünnt mit DEPC-Wasser) gevortext. Die Proben wurden anschließend auf die Silicagel-Membran-Säule geladen, an deren Membran die RNA nun gebunden wurde. Nach Auftragen eines Entsalzungspuffers und erneutem Zentrifugieren erfolgte ein DNA-Verdau, wobei die im Kit enthaltene DNase (DNaseI™ RNase-free, 3200 Kunitz Units/mg) für 15 Min. bei Zimmertemperatur auf der Säule inkubiert wurde. Nach Inaktivierung der DNase mit Inaktivierungspuffer und weiteren Wasch- und Zentrifugationsschritten unter Verwendung der Puffer RA1 und RA2 wurde im letzten Schritt die auf der Säule gebundene reine, totale RNA mit 500 μ l RNase-freiem Wasser eluiert. Nach Bestimmung des RNA-Gehaltes und der Reinheit mit Hilfe von OD₂₆₀- und OD₂₈₀-Messungen im Photometer (Gene Quant Pro; Amersham, Cambridge, UK) wurden die Proben in sterilen 0,5 ml-Mikroreaktionsgefäßen kurz in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -85°C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

4.4.3 cDNA-Synthese

Zur reversen Transkription wurde das Omniscript Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Die im Kit enthaltene reverse Transkriptase (Omniscript™ RT, 4U/ μ l) wirkt zugleich als

RNA-abhängige DNA-Polymerase, RNase H und DNA-abhängige DNA-Polymerase. Für die *in vitro* reverse Transkription waren die ersten beiden Funktionen wichtig, wobei die RNase-H-Aktivität DNA-RNA-Hybride degradierte, während einzelsträngige RNA unversehrt blieb. Pro Ansatz wurden 4 µg totale RNA in complementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Alle Reaktionen wurden während des Ansetzens auf Eis gelagert. Zuerst wurde die nicht im Kit enthaltene RNase Out (40 U/µl; Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) mit DEPC-Wasser und 10fachem Puffer RT aus dem Kit auf 10 U/µl verdünnt. Dieses 50 kD-Protein diente der Inhibition ubiquitärer RNasen und wurde zu dem fertig pipettierten Mastermix zugefügt. Ebenfalls nicht im Kit enthalten waren die Random Primers (Promega, Madison, Wisconsin, USA), die zunächst mit DEPC-Wasser von 500 µg/µl auf 125 µg/µl verdünnt wurden. Zuletzt wurde die reverse Transkriptase zum Mastermix zugegeben und anschließend gründlich gemischt. Nach Aufteilung des Mastermixes und Zufügen des Templates wurden die Ansätze vorsichtig gemischt und kurz in einer Handzentrifuge zentrifugiert. Die Komponenten des Reaktionsansatzes und ihre Konzentrationen sind Tabelle 4 zu entnehmen.

Tabelle 4: Komponenten eines 40 µl-Ansatzes der RT-PCR

Reagenzien	Ausgangskonzentration	Volumen	Endkonzentration
Puffer RT	10fach	4 µl	1fach
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	je 5 mM	4 µl	je 0,5 mM
Random Hexamers	125 µg/ml	4 µl	12,5 µg/ml
Reverse Transkriptase	4 U/µl	2 µl	0,2 U/µl
RNase Out	10 U/µl	2 µl	0,5 U/ul
Template	ca. 200-400 ng	variabel	0,1 µg/µl
DEPC-Wasser		...ad 40µl	

Die Volumina von Template und DEPC-Wasser richteten sich nach dem Gesamt-RNA-Gehalt der zuvor isolierten Darmgewebeproben und dem daraus berechneten Volumen, das zur optimalen Auslastung der reversen Transkriptase erforderlich war. Die Reverse Transkription im Thermocycler erfolgte sofort nach dem Mischen des aufgeteilten Mastermixes nach dem im Tabelle 5 angegebenen Protokoll.

Tabelle 5: Temperatur-Zeitprotokoll der reversen Transkription

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Anlagerung	25°C	10 Min.
Transkription	37°C	60 Min.
Enzymaktivierung	93°C	5 Min.

Anschließend wurden die Proben im Thermocycler bis zur Entnahme bei 4°C gehalten. Das cDNA-Produkt wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

4.4.4 PCR zur Herstellung von Standardverdünnungsreihen

Als Standards für die Messungen der RT-qPCR wurden definierte Verdünnungsreihen der reinen PCR-Produkte für jede zu messende cDNA (mCLCA1, mCLCA2, mCLCA3, mCLCA4 sowie EF-1 α) hergestellt. Die jeweilige Standardverdünnungsreihe wurde in jedem RT-qPCR-Lauf neben den Proben mit auf die Mikrotiterplatte aufgetragen, um das in den Proben mit unbekannter mRNA-Kopienzahl gemessene Fluoreszenzsignal mit Hilfe des Standards in eine definierte Kopienzahl zu übersetzen.

Um ein möglichst reines Amplifikationsprodukt zu erhalten, wurden für die PCR von Teil-cDNA-Sequenzen von mCLCA1, mCLCA2 und mCLCA3 deren in den Vektor pcDNA3.1 klonierter gesamter offene Leserahmen als Template eingesetzt. Für mCLCA4 wurde mit spezifischen Primern ein 333 bp langes Amplifikat hergestellt. Hierfür wurde Gesamt-RNA aus der glatten Muskulatur eines Mäusedarmes isoliert, die mittels Laser-gesteuerter Gewebemikrodissektion aus Hämalaun-Eosin-gefärbten Kryostatschnitten ausgeschnitten worden war. In diesem Gewebe soll dieser Vertreter der murinen CLCA-Genfamilie besonders stark exprimiert werden (ELBLE et al. 2002). Die Gesamt-RNA wurde in diesem Fall mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert und anschließend, wie bereits in Abschnitt 4.4.3 beschrieben, revers transskribiert.

Für die Amplifikation von murinem Elongationsfaktor-1 α (EF-1 α), der bei der quantitativen PCR als *Housekeeping*-Gen diente, wurde als Template-cDNA Darmgewebe der Maus eingesetzt, aus dem wie zuvor in Abschnitt 4.4.2 und 4.4.3 RNA isoliert und anschließend cDNA

gewonnen wurde. Das Primerpaar für die PCR zur Herstellung der EF-1 α - Standardreihe wurde aus dem bereits in unserer Arbeitsgruppe etablierten Protokoll übernommen (LEVERKOEHNE et al. 2002). Die übrigen Primerpaare für die mCLCA-Standardreihen wurden mit Hilfe eines online frei zugänglichen Primersuchprogrammes ausgesucht (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3.www.cgi>), wobei von den vom Programm ermittelten Sequenzen diejenigen mit dem geringsten Anteil an identischen Nukleotiden gegenüber den jeweils übrigen mCLCA-Homologen ausgesucht wurden. Primersequenzen für die PCR sowie deren Schmelztemperaturen sind Tabelle 6 zu entnehmen.

Für den Versuch zur Absicherung der Spezifität der qPCR-Primer- und Sondenkombinationen wurden als Standardverdünnungen die klonierten Sequenzen des offenen Leserahmens für mCLCA1, mCLCA2 und mCLCA3 eingesetzt. Für mCLCA4 wurde ein 1812 Basenpaare langes Stück mit Hilfe spezifischer Primer (Upstream Primer: 5'GTGCCAGGGCTGCAGGT CCTTCTG 3', T_m 74°C; Downstream Primer: 3'GAGCGGTGGCGTTGACTGGGAGTG 5', T_m 75°C) hergestellt, das in seiner Länge die cDNA-Sequenzen miteinschließt, in der alle qPCR-Primer- und Sondenkombinationen hinsichtlich ihrer Lage auf den übrigen Homologen lokalisiert sind. Alle Primer wurden von der Firma Invitrogen synthetisiert. Alle im Folgenden angegebenen Schmelztemperaturen in den Tabellen beziehen sich auf eine Pufferlösung mit 100 mM NaCl.

Tabelle 6: Primer zur Herstellung der cDNA-Mengenstandards mittels PCR

Primerbezeichnung	Sequenz (forward 5`-3` reverse-complementary 5`-3`)	Tm [°C] in 100 mM NaCl	Annealing Temperatur [°C]
SD mCLCA1 Fw	GCGGATCCTCACCTGCAA	63,3	57,0
SD mCLCA1 Rev	CCTTCTGGACTTGAGCAGTGAAA	62,9	
SD mCLCA2 Fw	GCAGACGTCATAGTTGCGGAT	62,4	57,0
SD mCLCA2 Rev	GACGGTCTTCTTTGTCCATGCT	62,4	
SD mCLCA3 Fw	GAATCTTTGAAGAGTCCTGTCTTC	57,5	54,0
SD mCLCA3 Rev	GCAGGAAAGAAGCTGACTCAG	59,1	
SD mCLCA4 Fw	CTTAGGAAGCCCCATCACTC	58,8	57,0
SD mCLCA4 Rev	GACCTCCTGAAAGCACGAG	58,2	
SD EF-1 α Fw	GAAGAGATACGAGGAAATCG	70,6	57,0
SD EF-1 α Rev	GATGCATTGTTATCATTAACCAG	60,9	

Tabelle 7: Länge und Lage der Standard-cDNA-Amplifikate

Genbank Nr.	Länge cDNA	Länge Standard- cDNA	Basenpaar von/bis
mCLCA1: AF_047838	3022 Bp	594 Bp	334-925
mCLCA2: AF_108501	3058 Bp	673 Bp	317-990
mCLCA3: AB_017156	2937 Bp	444 Bp	18-425
mCLCA4: AY_008277	2782 Bp	333 Bp	977-1310
EF-1 α : BC_003969	1722 Bp	1021 Bp	530-1553

Die optimalen Anlagerungstemperaturen der Primerpaare wurden mit Hilfe eines Gradientencyclers und nach Visualisierung der PCR-Produkte in einem Tris-Borat-Puffer-Gel ermittelt. Anschließend wurde in einem erneuten PCR-Ansatz die Amplifikation der gewünschten cDNA unter den optimierten Bedingungen durchgeführt. Alle Reagenzien wurden während des Pipettierens auf Eis gekühlt und in speziellen PCR-Mikroreaktionsgefäßen zusammengefügt. Pro 50 μ l-Ansatz wurde 1 μ l Template bzw. als Negativkontrolle 1 μ l Aqua dest. zugegeben. Um der Verdunstung von Flüssigkeit während der PCR vorzubeugen,

wurden die Ansätze jeweils mit einem Tropfen Paraffinöl überschichtet. Die Zugabe der Taq-Polymerase (Promega, Madison, Wisconsin, USA) erfolgte erst nach einer initialen zweiminütigen Denaturierung bei 95 °C (sogenannter *Hot Start*). Dazu wurde die Polymerase zuvor mit einer entsprechenden Menge Mastermix verdünnt, so dass 5 µl des Polymerase-Mixes mit einer Konzentration von 0,1 U/µl pro Reaktion hinzugefügt wurden. Die Komponenten der PCR und ihre Konzentrationen sind Tabelle 8 zu entnehmen. Die in Tabelle 9 protokollierten Zeit-Temperatur-Schritte erfolgten von der Denaturierung zur Elongation zyklisch 40 mal hintereinander.

Tabelle 8: Komponenten eines 50 µl-Ansatzes der PCR zur Herstellung der cDNA-Mengenstandards

Reagenzien	Ausgangskonzentration	Volumen	Endkonzentration
Puffer (Mg-frei)	10fach	5,0 µl	1fach
MgCl	25 mM	3,0 µl	1,5 mM
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	je 10 mM	8,0 µl	je 1,7 mM
Primer Fw	20µm	2,5 µl	1,0 µM
Primer Rw	20µm	2,5 µl	1,0 µM
Aqua dest., steril		27,0 µl	
Taq-Polymerase	0,1 U/µl	5,0 µl	0,01 U/µl

Tabelle 9: Temperatur-Zeitprotokoll der PCR zur Herstellung der cDNA-Mengenstandards

Programmschritt	Temperatur [°C]	Zeitdauer	
Initiale Denaturierung	95	2 Min.	
Zugabe der Polymerase	80	3 Min.	
Denaturierung	94,5	45 Sec.	40 Zyklen
Primeranlagerung	57* ¹⁾ oder 54* ²⁾	1 Min.	
Elongation	72	45 Sec.	
Finale Elongation	72	10 Min.	

*1) zur Herstellung der cDNA-Standards für mCLCA1, mCLCA2 und mCLCA4

*2) zur Herstellung des cDNA-Standards für mCLCA4

Anschließend wurde die Temperatur bis zur Entnahme bei 4°C gehalten.

4.4.5 Präzipitation der PCR-Produkte

Die 50 µl-PCR-Ansätze wurden möglichst ohne Ölkontamination in ein 2,0 ml- Mikroreaktionsgefäß überführt. Dann wurde ein Volumen 3 molare Natriumazetat-Lösung, pH 5,2 dazugegeben, das 10% des PCR-Gesamtansatzvolumens entsprach. Nach Zufügen des doppelten Volumens an 96%igem Ethanol (-20°C) wurde gründlich gemischt und dann für mindestens 8 Stunden bei -20°C präzipitiert. Nun wurde die Lösung bei 20 000 xg für 10 Min. zentrifugiert. Das so erhaltene Pellet wurde getrocknet und in 20 µl 8 mM Tris-Puffer (pH 8,0) resuspendiert.

4.4.6 Gelelektrophorese und Gelextraktion

Zur Herstellung präparatorischer Gele wurde 0,5fach konzentrierter Tris-Azetat-Puffer (TAE-Puffer) verwendet. Auf 100 ml TAE-Puffer wurde 1g Agarose für ein 1%iges Gel eingewogen. Die Agarose wurde in der Mikrowelle erhitzt, bis sie sich vollständig im Puffer gelöst hatte. Nach Abkühlen auf ca. 60°C wurden 2 µl Ethidiumbromid (Konzentration 5 mg/µl) pro 100 ml Gellösung hinzupipettiert und gemischt. Die Gellösung wurde zum Erkalten blasenfrei in ein dafür vorgesehene Gelkammer mit eingestecktem Kamm gegossen und unter einen Plexiglassturz gestellt. Nach dem Aushärten wurde der Kamm entfernt und das resuspendierte Pellet 4:1 mit einem Farbpuffer (Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland) gemischt und auf das Gel geladen. Als Längenstandard wurde eine 100 bp-Leiter (oder eine 1000 bp-Leiter für den EF-1α-cDNA-Standard) der Firma Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Als Laufpuffer wurden immer die gleichen Lösungen verwendet, die zur Herstellung des Gels benutzt wurden. Die Gelkammer wurde dann für ca. 45 Min. an eine Spannung von 80 V angeschlossen. Die gesuchte Bande wurde für jedes Gen auf einem UV-Licht-Betrachter identifiziert und mit einer sterilen Skalpellklinge für die Gelextraktion ausgeschnitten.

Die Extraktion erfolgte mit Hilfe des Qia Quick Gel Extraktions Kits der Firma Qiagen, einem auf dem Silicagel-Membran-Säulenprinzip beruhendem Kit. Zunächst wurde das ausgeschnittene Gelstück in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß gewogen und die dreifache Menge an QG-Puffer dazupipettiert. Das Gefäß wurde im 60°C warmen Wasserbad abwechselnd 3 Min. erwärmt und 1 Min. gevortext, bis sich das Gelstück vollständig aufgelöst hatte. Dann wurde ein Volumen an Isopropanol hinzugegeben, das dem Gelgewicht in mg entsprach. Nun wurde die Lösung auf die im Kit enthaltene Säule geladen und bei 13000 xg für eine Minute zentrifugiert. Das Eluat wurde nach jedem Zentrifugationsschritt verworfen. 500 µl QG-Puffer wurden auf die Säule geladen und wieder zentrifugiert. Anschließend wurden 750 µl ethanolhaltiger PE-Puffer auf die Säule gegeben, 5 Minuten inkubiert und wieder eine Minute zentrifugiert. Die Säule wurde zum vollständigen Trocknen einmal leer zentrifugiert und anschließend in ein neues Auffanggefäß überführt. Dann wurde die DNA mit 50 µl Elutionspuffer von der Säule gewaschen. Die Konzentration und die Reinheit der so aufgereinigten DNA wurde mittels OD₂₆₀- und OD₂₈₀-Messungen im Photometer bestimmt. Die Angabe ng/µl wurde nun in die Kopienzahl des entsprechenden DNA Produkts umgerechnet und eine Verdünnungsreihe von 10³ bis 10⁹ hergestellt.

4.4.7 Quantitative Real-Time PCR

Untersucht wurde die Genexpression der murinen Ca²⁺-aktivierten Cl⁻-Kanäle mCLCA1, mCLCA2, mCLCA3 und mCLCA4 in den Dünndarmabschnitten Jejunum und Ileum von 40 Mäusen. Als *Housekeeping*-Gen diente der Elongationsfaktor-1α (EF-1α), der sich durch eine äußerst konstante Expression in unterschiedlichen Geweben auszeichnet (GRUBER u. LEVINE 1997). Die Primer-Sonden-Kombinationen wurden so gewählt, dass eine Diskriminierung zwischen den vier homologen CLCA-Sequenzen ermöglicht wurde. Zur Auswahl der verwendeten Primer und Sonden wurde die Software des Beacon Designer 3.0 der Firma Premier Biosoft International (Palo Alto, Californien, USA) verwendet. Die Synthese der Primer erfolgte durch die Firma Invitrogen, die Sondenherstellung durch die Firma Eurogentech (Liège, Belgien). Es wurden ausschließlich 5'FAM-3'TAMRA-markierte TaqMan-Sonden verwendet. Bei dem PCR-Cycler handelte es sich um den Mx 4000

(Stratagene, Californien, USA), einen mit einer Halogenlampe ausgestatteten, multiplexfähigen Fluoreszenzdetektor mit integrierter 96-Well-Wärmeplatte. Durch die Halogenlampe erfolgt die Anregung des FAM-Farbstoffes bei einer definierten Wellenlänge. Dieser Farbstoff wiederum sendet ebenfalls (Fluoreszenz-) Licht einer bestimmten Wellenlänge aus, das vom Gerät jedoch erst detektiert werden kann, sobald das Quencher-Molekül TAMRA durch Spaltung der Sonde von FAM getrennt wird. Dieser Schritt kann erst erfolgen, wenn die Sonde nach erfolgter Anlagerung an die komplementäre Sequenz, von der Polymerase, die zugleich Endonuklease-Aktivität besitzt, gespalten wird. Zur Relativierung der Hintergrundfluoreszenz (zum Beispiel Transparenz-/Reflexionseigenschaften der verwendeten Mikroreaktionsgefäße) wurde ROX als passiver Referenzfarbstoff eingesetzt. Die Wellenlängen der vom Gerät emittierten und für die einzelnen Farbstoffe empfangenen Signale liegen für den Reporter FAM jeweils bei 492 nm und 516 nm, für den Quencher TAMRA bei 556 nm und 580 nm und für die Referenz ROX bei 585 nm und 610 nm. Die Sequenzen der ausgewählten Primer und Sonden sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: Primer und Sonden der qPCR

Primerbezeichnung	Sequenz (forward 5`-3` reverse-complementary 5`-3`)	Tm [°C] in 100 mM NaCl	Elongation [°C]
QPCR M1 Fw	GTGGACCAGCCTTTCTACATGTCTAG	63,5	64,0
QPCR M1 Rev	TGTGACACAGTTGCCTCTCTCTCA	64,6	
Sonde M1	ATCACTGGCACCAATGTGGTTCACAAC	82,0	
QPCR M2 Fw	GGACCGGCCTTTCTACATTTCTAG	63,3	64,0
QPCR M2 Rev	CACACAGCTGCCTCTCTGACA	62,7	
Sonde M2	CACAGGCAAGAAGGTGGTCCCACGA	76,0	
QPCR M3 Fw	TTCTGGAAGGAGTTCTGAGTG	56,8	55,0
QPCR M3 Rev	CGGGAATCAAAATGGCAACA	63,9	
Sonde M3	ATCCAACCTGAACAACAACGGCTATGAGG	82,0	
QPCR M4 Fw	ACTAACCTAATAAGGATCATCAATGA	55,1	58,0
QPCR M4 Rev	AGTTCCGCCATTTGGGTATT	55,4	
Sonde M4	CTCCTACCTAGCGATCAGCACAAAGC	80,0	
QPCR EF-1 α Fw	CAAAAACGACCCACCAATGG	63,3	64,0
QPCR EF-1 α Rev	GGCCTGGATGGTTCAGGATA	62,0	
Sonde EF-1 α	AGCAGCTGGCTTCACTGCTCAGGTG	80,0	

Pro 96-Well-Platte wurde stets eine cDNA-Standardverdünnungsreihe (von 10^3 bis 10^9 Kopien) mit jeder Stufe jeweils als Duplikat, die zu messenden Proben als Triplikate und eine Negativkontrolle ebenfalls als Duplikat angesetzt. Die Mehrfachmessungen dienen der Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Außerdem wurden alle Messdurchgänge im identischen Ansatz wiederholt. Die in den beiden Messdurchgängen für eine Probe ermittelten *Threshold Cycle*-Werte (CT-Werte) durften dabei nicht mehr als eine Standardabweichung und im Variationskoeffizienten nicht mehr als 5% voneinander abweichen (BUSTIN 2000). Waren diese Kriterien nicht erfüllt, wurden diese Triplikate erneut in zwei Messdurchgängen nachgemessen.

Alle Pipettierschritte wurden unter besonderen Hygienevorschriften und nur in den ausschließlich dafür vorgesehenen Räumlichkeiten vorgenommen. So wurde das Mastermix in einem gesonderten Raum auf Eis gekühlt zusammenpipetiert, erst in einem zweiten Raum wurde die Proben-cDNA zugefügt. Alle Flächen und verwendeten Geräte wurden vor und nach Benutzung mit 10%iger Natriumhypochloridlösung gesäubert. Pro 25 µl-Reaktion wurde 1 µl Template oder 1 µl Aqua dest. für die Negativkontrolle hinzugegeben. Die Reaktionen wurden in speziellen 2-ml-Strip-Tubes mit den passenden Optical Caps (Stratagene) angesetzt.

Für das Mastermix wurden mit Ausnahme des Aqua dest. und der gesondert synthetisierten Sonden und Primer nur Komponenten aus dem Brilliant Core Reagent Kit der Firma Stratagene eingesetzt. Während der Etablierung wurden unterschiedliche Konzentrationen von Sonden, Primern und Magnesiumchlorid getestet sowie die Anlagerungs- und Elongationstemperaturen variiert. Die optimierten Reaktionen sind Tabelle 11 zu entnehmen, wobei sich die angegebenen Volumina auf einen 25 µl-Ansatz beziehen, der entsprechend für die Probenansätze verdreifacht und für die Standardreihen und Negativkontrollen verdoppelt wurde.

Tabelle 11: Komponenten eines 25 µl-Reaktionsansatz der qPCR

Reagenzien	Ausgangskonzentration	Volumen	Endkonzentration
TaqMan-Puffer	10fach	2,50 µl	1fach
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	20 mM	1,00 µl	200 µM
MgCl ₂	50 mM	2,50 µl	5,0 mM
je Primer	20 µM	0,38 µl	300 nM
Sonden (außer mCLCA3)	50 µM	0,10 µl	200 nM
mCLCA3-Sonde	50 µM	0,08 µl	150 nM
ROX	200fach	0,13 µL	1fach
Sure Start Taq	5 U/µl	0,13 µl	0,025 U/µl
Aqua dest.		ad 25 µl	

Erst nach Zugabe des Templates und gründlichem Durchmischen wurden die Ansätze als Triplikate und Duplikate aus herkömmlichen Mikroreaktionsgefäßen in die Strip-Tubes überführt. Diese wurden in einer Handzentrifuge kurz zentrifugiert und dann in die Vertiefungen der Heizplatte des Cyclers gesteckt. Nach Auswahl der Fluoreszenzfilter für FAM und ROX und Benennung von ROX als Referenzfarbstoff wurde das Cyclerprogramm gestartet. Die Zeit-Temperaturprotokolle sind in Tabelle 12, 13 und 14 aufgeführt. Die PCR wurde im Zwei-Schritt-Modus durchgeführt, wodurch eine höhere Spezifität der Primer bei stabiler Sondenanlagerung gewährleistet wird. Die Detektierung des Fluoreszenzsignals erfolgte im Echtzeit-Modus, so dass zu jedem gewählten Zeitpunkt während der PCR die Zwischenmessungen verfolgt werden konnten.

Tabelle 12: Temperatur-Zeitprotokoll der qPCR für mCLCA1, mCLCA2 und EF-1 α

Programmschritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95 °C	10 Min.
Zyklische Denaturierung	95 °C	15 Sec.
Anlagerung/Elongation	65 °C	1 Min.

Tabelle13: Temperatur-Zeitprotokoll der qPCR für mCLCA3

Programmschritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95 °C	10 Min.
Zyklische Denaturierung	95 °C	15 Sec.
Anlagerung/Elongation	55 °C	1 Min.

Tabelle14: Temperatur-Zeitprotokoll der qPCR für mCLCA4

Programmschritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95 °C	10 Min.
Zyklische Denaturierung	95 °C	15 Sec.
Anlagerung/Elongation	58 °C	1 Min.

Die Zyklenzahl betrug für mCLCA1 und mCLCA2 40 Zyklen, für die qPCR von mCLCA3, mCLCA4 und EF-1 α wurden 35 Zyklen gewählt.

Mit Hilfe der zum Mx 4000 gehörigen Software wurden die Fluoreszenzsignale ermittelt und einem CT-Wert zugeordnet. Durch Quotientenbildung aus dem sondengekoppelten Reporter-signal (FAM) mit dem passiven Referenzsignal (ROX) wurde automatisch ein normalisiertes Reportersignal (Rn-Wert) berechnet. Aus diesem normalisierten Fluoreszenzsignal wurde der ΔRn -Wert ermittelt, der sich aus dem Rn(+)-Wert (relatives Reportersignal der gemessenen Probe) abzüglich der Hintergrundfluoreszenz (Rn(-)-Wert) der ersten PCR-Zyklen berechnet. In einem Koordinatensystem, in dem der logarithmierte ΔRn -Wert (Abszisse) gegen die Zyklenzahl (Ordinate) aufgetragen wurde, erstellte das Programm eine Amplifikationskurve. Diese Amplifikationskurve entspricht der graphischen Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Zunahme an Reaktionsprodukt im jeweiligen Reaktionsgefäß. In diesem Graphen wurde aus mindestens 5 der ersten 12 Zyklen in einem schwankungsarmen Bereich eine Basislinie berechnet. Diese Basislinie diente der Ermittlung eines Messgrenzwertes (sogenannter *Threshold*). Der *Threshold Cycle* (CT), der die Grundlage für die Berechnung der Ausgangskopienzahl bildete, stellte den Schnittpunkt des *Thresholds* mit der Amplifikationskurve dar. Da auf jeder Platte eine Standardkurve mit zuvor festgelegten Ausgangskopienzahlen mitgemessen wurde, also jeder Verdünnungsstufe ein CT-Wert zugeordnet wurde, konnten anschließend in den Proben die Ausgangskopienzahlen anhand der gemessenen *Threshold*-Zyklen berechnet werden.

4.4.8 Quantifizierung der Genexpression

Durch Extrapolieren der gemessenen CT-Werte für die einzelnen Standardverdünnungsstufen auf die Proben mit unbekannter Kopienzahl wurden die Kopienzahlen für jede Probe als Dreifachmessung ermittelt. Die Standardreihe musste dabei für den ihr vorher zugeordneten *Threshold* die erwartete Effektivität von $> 90\%$ und Linearität mit einem *r squared value* ($Rsq=R^2$, Pearson Korrelationskoeffizient) von $> 0,9$ erfüllen, um als valider Versuchsdurchgang zu gelten. Die Steigung der Kurven für mCLCA1 bis 3 durften außerdem nicht mehr als 0,1 voneinander abweichen, um die Vergleichbarkeit der Genexpressionen untereinander zu optimieren. Für mCLCA4 wurde im Spezifitätsversuch ein sehr hoher *Threshold* ermittelt, der nötig war, um Kreuzreaktionen auszuschließen, so dass hier eine niedrigere Effektivität ($>$

79%) und eine Steigung von -4,0 akzeptiert wurden. Für die Doppelläufe mit den jeweils als Triplikate gemessenen CT-Werten und Kopienzahlen wurden für den einzelnen Lauf und anschließend für den Doppellauf aus den zwei gemessenen Triplikaten arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Für die Doppelläufe wurden außerdem die Variationskoeffizienten ermittelt ($100 \times SD / \bar{x} \%$). Sowohl die Triplikate eines Laufes als auch die beiden Triplikate einer Probe eines Doppellaufes durften nicht mehr als eine Standardabweichung im CT-Wert voneinander abweichen. Der Variationskoeffizient der CT-Werte durfte nicht größer als 5% sein. Um Schwankungen zwischen den einzelnen Proben hinsichtlich Qualität und cDNA-Menge auszugleichen, wurden aus den Mittelwerten der Kopienzahlen für mCLCA 1 bis 4 aus den Doppelläufen Quotienten mit den ebenso gemessenen Kopienzahlwerten für EF-1 α gebildet. Die normalisierten Kopienzahlwerte sind also relativ zu dem *Housekeeping*-Gen angegeben, dessen CT- und Kopienzahlwerte in den einzelnen Proben ebenfalls mit Hilfe einer Standardverdünnungsreihe und in doppelten Messdurchgängen ermittelt wurden.

4.4.9 Statistik

Zum Vergleich der Stammes- und Genotypeinflüsse wurde ein Wilcoxon *two sample*-Test zum Vergleich unabhängiger, nicht normalverteilter Stichproben durchgeführt.

4.4.10 Sequenzierungen der mCLCA3-kodierenden cDNA-Sequenzen bei den eingesetzten Mausstämmen

Um eventuelle Nukleotidpolymorphismen in der kodierenden Sequenz des mCLCA3-Gens bei den vier unterschiedlichen genetischen Hintergründen der verwendeten Mausstämme festzustellen, wurde eine PCR durchgeführt, bei der der gesamte offene Leserahmen von 2,7 kbp amplifiziert wurde. Dies erfolgte analog für jeden Mausstamm, wobei als Template gepoolte Darm-cDNA von den fünf Tieren des jeweiligen WT-Stammes verwendet wurde. Die so erhaltenen Produkte wurden zur Sequenzierfirma Sequence Laboratories (Göttingen,

Deutschland) zusammen mit drei Primerpaaren geschickt. Die Primer wurden zuvor mit der Software Primer 3 ausgewählt und von der Firma Invitrogen synthetisiert. Das äußerste Primerpaar flankierte den Offenen Leserahmen von mCLCA3, das nächste Primerpaar diente der Synthese des mittleren Abschnitts und das dritte Primerpaar lag jeweils tausend Basenpaare vom 5` und 3`-Ende entfernt und war auf die Enden des ORF gerichtet. Da die sechs Primer zur vollständigen Sequenzierung der kodierenden Nukleotidbasen nicht ausreichten, wurden von der Sequenzierfirma weitere Primer synthetisiert und in den Reaktionen eingesetzt. Die Elektropherogramme wurden mit Hilfe kommerzieller DNA-Softwareprogramme ausgewertet (Chromas Version 1.45 und DNA Star Seq Man II). Die Primersequenzen und das Zeit-Temperatur-Protokoll sind den Tabellen 15, 16 und 17 zu entnehmen. Die Mengenangaben beziehen sich auf einen PCR-Ansatz von 500 µl, aufgeteilt auf 50 µl-Reaktionsansätze.

Tabelle 15: Primer zur Herstellung eines mCLCA3-Sequenzierproduktes mittels PCR

Primerbezeichnung	Sequenz (forward 5`-3` reverse-complementary 5`-3`)	Tm [°C] in 100 mM NaCl
SEQ M3 Fw	ATGGAATCTTTGAAGAGTCCTGTCTTC	51,7
SEQ M3 Rev	TCAGTGCAAACCTAGTGTACCTGCAT	55,7
SEQ M3 B-	GCTTTGTACATAGGCAGCACTGT	60,01
SEQ M3 B+	ACACAACCACTAAGGTGGCCTA	60,01
SEQ M3 C-	CACTGTAATAGGAGGCAGTGTAGC	59,4
SEQ M3 C+	GAATCTGAGGACTTCAAGCAAAC	59,4
F371*	TGGATTGAGGATGGTGAAG	50,0
1440seq*	TGACTTAGCAGGAAAG	49,0

* Primer von Sequenz Laboratories (Göttingen, Deutschland) ausgewählt und synthetisiert

Die PCR wurde wie bereits beschrieben durchgeführt, nur wurde als Enzym hier PWO-Polymerase anstelle Taq-Polymerase verwendet. PWO-Polymerase aus dem Tiefseebakterium *Pyrococcus woesei* ist mit einer Halbwertszeit von 2 Stunden bei 100°C wesentlich hitzestabiler als Taq-Polymerase und besitzt durch ihre 3`-5`-Exonukleaseaktivität sehr hohe

Proofreading-Kapazität. Die statistische Fehlerquote bei der Einzelstrang-Synthese ist um ca. ein 10faches geringer als bei Einsatz der Taq-Polymerase.

Tabelle 16: Komponenten eines zehnfachen 50 µl-Ansatzes zur Herstellung eines mCLCA3-Sequenzierproduktes mittels PCR

Mastermix I

Reagenzien	Ausgangskonzentration	Menge	Endkonzentration
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	je 10 mM	11,00 µl	je 200 µM
Primer jeweils	20 µM	11,00 µl	400 NMRI
Template	unbekannt	2,75 µl	unbekannt
Aqua dest., steril		239,25 µl	
gesamt		275,00 µl	

Mastermix II

Reagenzien	Ausgangskonzentration	Menge	Endkonzentration
Puffer komplett	10fach	55,0 µl	1fach
PWO	1 U/µl	5,5 µl	0,01 U/µl
Aqua dest. steril	-----	214,5 µl	-----
gesamt		275,0 µl	

Das Gesamtvolumen wurde auf 10 PCR-Reaktionsgefäße zu jeweils 25 µl aufgeteilt, mit Paraffinöl überschichtet und das Cyclyer-Protokoll gestartet. Nach der initialen Denaturierung wurde während des 80°C-Schrittes das Mastermix II, das die PWO-Polymerase enthält, zugegeben.

Tabelle 17: Temperatur-Zeitprotokoll der PCR zur Herstellung eines mCLCA3-Sequenzierproduktes

Programmschritt	Temperatur	Dauer	Sonstiges
Initiale Denaturierung	95°	2 Min.	
Zugabe der PWO-Polymerase	80°	3 Min.	
Denaturierung	95°	40 Sec.	35 Zyklen mit je 8 Sek. Verlängerung der Elongationszeit
Anlagerung	65°	40 Sec.	
Elongation	72°	2 Min.	
Terminale Elongation	72°	10 Min.	
Kühlung	4°		

Der PCR-Ansatz wurde anschließend in einem 2,0 ml-Reaktionsgefäß zusammengefasst und wie bereits beschrieben, präzipitiert. Nach der Präzipitation wurde das erhaltene Pellet in 20 µl 8 mM Tris-Chlorid aufgenommen und auf ein Tris-Azetat-Puffer-Gel geladen. Die Gelextraktion erfolgte wie bereits in Abschnitt beschrieben mit dem Qia Quick Gelextraktionskit. Nach der photometrischen Bestimmung des DNA-Gehaltes wurde das aufkonzentrierte und gereinigte PCR-Produkt bis zum Verschicken an die Sequenzierfirma Sequence Laboratories (Göttingen, Deutschland) bei -20°C gelagert.

4.4.11 Histologische Methoden

4.4.11.1 Anfertigung von Paraffinschnitten

Für die Immunhistochemie, Hämalaun-Färbung (HE-Färbung) und Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS-Reaktion) wurden 2 µm dicke Paraffinschnitte mit Hilfe eines Heidelberger Rotationsmikrotoms (MICROM GmbH, Heidelberg, Deutschland) angefertigt. Dabei wurden pro Lokalisation 30 Serienschritte vom längs angeschnittenen, gut sichtbaren Darmlumen hergestellt. Nach Glättung für einige Sekunden in einem 60°C warmen Wasserbad wurden die Schnitte auf Superfrost Plus Objektträger (Menzel, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen.

Dann wurden die Schnitte in einem Wärmeschrank für eine halbe Stunde bei 55°C inkubiert, so dass das überschüssige Paraffin zum Abfließen gebracht wurde. Die Schnitte wurden zum Auskühlen bei Zimmertemperatur für einige Stunden stengelassen und bei Zimmertemperatur bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.4.11.2 Hämalaun-Eosin-Färbung

Jeder zehnte der Paraffinserienschnitte wurde mit Hämalaun-Eosin (HE) gefärbt. Die HE-Färbung erfolgte automatisiert in einem Färbegerät der Firma Leica (Nussloch, Deutschland) im Diagnostiklabor des Institutes für Pathologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover. Auch die anschließende Eindeckung mit Deckgläschen erfolgte automatisch.

4.4.11.3 Perjodsäure-Schiff-Reaktion nach Mc Manus

Zunächst wurden die Schnitte entparaffiniert und in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert. Dazu wurden die Objektträger zweimal in Rotihistol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) und einmal in Isopropanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) für jeweils 5 Minuten eingetaucht. Anschließend folgten 96- und 70 %iges Ethanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) für jeweils 2 Minuten und ein kurzes Eintauchen in *Aqua dest.*. Danach wurden die Schnitte für 10 Minuten in 1%ige Perjodsäure (Riedel de Haën, Seelze, Deutschland) gegeben und 10 Minuten unter fließendes Leitungswasser gestellt. Nach zweimaligem, kurzem Spülen in *Aqua dest.* erfolgte eine 20-minütige Behandlung mit Schiff'schem Reagenz (Waldeck, Münster, Deutschland). Die Farbreaktion fand anschließend unter fließendem Leitungswasser bei ca. 50 °C für 5 Minuten statt. Nach erneutem kurzen Spülen in *Aqua dest.* erfolgte die Gegenfärbung in unverdünntem Hämalaun (Merck, Darmstadt, Deutschland) für 5 Minuten. Nachdem die Objektträger für 12 Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült worden waren, wurden die Präparate in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 96%), Isopropanol und schließlich zweimal in Essigsäurebutylester (Roth, Karlsruhe, Deutschland) entwässert

(alle Schritte ca. 3. Minuten). Dann erfolgte die automatisierte Eindeckung mit Deckgläschen.

4.4.11.4 Immunhistochemie

Die Schnitte wurden zunächst wie beschrieben entparaffiniert und rehydriert. Zur Hemmung der endogenen Peroxidase-Aktivität erfolgte eine 30-minütige Inkubation der Schnitte bei langsamem Rühren in 85 % igem Methanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) mit 0,15 % Wasserstoffperoxid (Merck, Darmstadt, Deutschland). Anschließend wurden die Schnitte dreimal für 5 Minuten in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS, pH 7,0-7,2) gespült. Die Demaskierung der Antigene wurde in 10 mM Citratpuffer (pH 6,0) in der Mikrowelle (800 Watt) durchgeführt, wobei je nach Erstantikörper die Kochzeit von 10 bis 15 Minuten variierte. Nach erneutem Spülen in PBS wurden die Objektträger in *Coverplates* überführt. Nun wurde das Blockserum aufgetragen, in diesem Fall 100 µl Ziegennormalserum pro *Coverplate*, das 1:5 mit PBS verdünnt war. Nach einer Inkubationszeit von einer halben Stunde bei Raumtemperatur wurde der Erstantikörper aufgetragen, wobei folgende Verdünnungen mit 1 %igem bovinem Serumalbumin (Serva, Heidelberg, Deutschland) in PBS verwendet wurden:

Tabelle 18: Erstantikörper

Antikörper*	Verdünnung
polyklonal, Kaninchen-anti-Mensch, aktivierte Caspase 3	1:2000
polyklonal, Kaninchen-anti-Mensch, phosphoryliertes Histon 3	1:1000
polyklonal, Kaninchen anti-Maus, mCLCA3	1:5000

*Genaue Herkunft, Firma, Bestellnummer, siehe Anhang 10.1.7

Die Inkubationszeit betrug ca. 18-20 Stunden über Nacht bei 8°C. Als Negativkontrolle wurde der Erstantikörper weggelassen. Am nächsten Tag wurden die *Coverplates* zunächst für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur stehengelassen und dreimal mit PBS gespült. Nun wurde der biotinylierte Zweitantikörper zugegeben und anschließend für 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Es handelte sich hier um einen 1:200 mit PBS verdünnten polyklonalen Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper. In der Zwischenzeit wurde das Avidin-Biotin-Peroxidase-Reagenz (Vectastain ELITE ABC Kit, Biologo, Kronshagen, Deutschland) vorbereitet. Dazu wurden 15 µl Reagenz A zu einem Milliliter PBS gegeben, einmal kurz gevortext, 15 µl Reagenz B dazugegeben, ebenfalls gut gemischt und die Lösung bei Raumtemperatur für eine halbe Stunde stehengelassen. Nach abgelaufener Inkubationszeit des Zweitantikörpers, erfolgte wieder dreimaliges Spülen der *Coverplates* mit PBS. Dann wurde das ABC-Reagenz auf die Schnitte gegeben und wieder für eine halbe Stunde inkubiert. Nach erneutem, zweimaligen Spülen wurden die Objektträger wieder in Glasküvetten überführt, noch ein drittes Mal gespült und dann in eine 0,05%ige 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid-Dihydrat-Lösung (DAB, Fluka-Chemika, Buchs, Schweiz) gestellt. Diese wurde als 50 ml Vorratslösung bei -20° Celsius aufbewahrt und frisch für die Reaktion angesetzt. Dafür wurden 50 ml DAB-Vorratslösung und 150 ml PBS zusammengegeben und durch zwei Filterpapiere filtriert. Nach Verwerfen von zwei Millilitern der filtrierten Lösung wurden 2 ml 10%iges Wasserstoffperoxid (Merck, Darmstadt, Deutschland) dazugegeben. In dieser Lösung wurden die Schnitte für 5 Minuten unter langsamem Rühren belassen. Danach folgte ein gründliches Spülen der Präparate in PBS und fließendem Leitungswasser für insgesamt 15 Minuten. Die Gegenfärbung wurde mit unverdünntem Hämalaun für 20 Sekunden und anschließendem Bläuen für 15 Minuten in fließendem Leitungswasser durchgeführt. Wie bereits beschrieben, wurden die Schnitte im letzten Schritt entwässert und anschließend automatisch eingedeckt.

4.4.11.5 Lichtmikroskopische Beurteilung

Alle lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden mit einem Mikroskop der Firma Zeiss (Göttingen, Deutschland) bei 400facher Vergrößerung vorgenommen. Die mit HE-gefärbten

Präparate dienten der Identifizierung optimaler Transversalschnitte durch das Darmlumen. Die benachbarten Paraffinschnitte aus dem optimalen Bereich der Serie wurden für die Immunhistochemie und PAS-Färbung ausgewählt.

In den beiden Darmlokalisationen Jejunum und Ileum wurden bei der PAS-Reaktion und der mCLCA3-Immunhistochemie jeweils 10 Zotten und 20 Krypten ausgezählt. Bei der Zählung wurde zum einen die Gesamtenterozytenzahl und zum anderen die Zahl der angefärbten Zellen ermittelt. Da von Interesse war, in welchem Kompartiment sich die Zu- oder Abnahmen der positiven Zellen abspielten, wurde die statistische Auswertung nach Zotte und Krypte getrennt vorgenommen. Bei den mit aktivierte Caspase3 und den mit phosphoryliertes Histon3 behandelten Schnitten wurden 20 Zotten, allerdings über die gesamte Länge von der Kryptbasis bis zur Zottenspitze, auf dieselbe Art und Weise ausgezählt. Hier interessierte vor allem die Gesamtenterozytenzahl, die die Zotten in ganzer Länge besitzen, um Zu- oder Abnahmen im Zusammenhang mit erhöhter Mitose-oder Apoptoserate ermitteln zu können. Aus der Summe an positiv gefärbten Zellen und der Summe der Gesamtenterozyten wurde für jede Lokalisation der Quotient gebildet. Von diesen Quotienten wurden für die fünf Tiere einer Gruppe der Mittelwert, die einfache Standardabweichung und Standardabweichung der Mittelwerte berechnet.

4.4.11.6 Statistik

Zur Ermittlung von signifikanten Einflüssen der vier unterschiedlichen genetischen Hintergründe und der CF-Genotypen wurde ein Wilcoxon *two sample*-Test für unabhängige, nicht normalverteilte Stichproben durchgeführt (mit freundlicher Unterstützung von Herrn Dr. Rohn, Institut für Biometrie, Epidemiologie und Informationsverarbeitung der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover).