

Splenomegalie assoziierte Anämie in Folge der Defizienz des PKGI β /IRAG1-Signalweges



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.) DER FAKULTÄT
CHEMIE UND PHARMAZIE

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von

Dipl.-Pharm. Michael Majer

aus Calw

im Jahr 2022

Die vorliegende Doktorarbeit entstand im Zeitraum von Januar 2016 bis Januar 2022 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Jens Schloßmann am Lehrstuhl für Pharmakologie und Toxikologie des Instituts für Pharmazie der Universität Regensburg.

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 18.02.2022

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender:	Herr Prof. Dr. rer. nat. Sigurd Elz
1. Gutachter (1. Prüfer):	Herr Prof. Dr. rer. nat. Jens Schloßmann
2. Gutachter (2. Prüfer):	Herr PD Dr. rer. nat. Max Keller
3. Prüfer:	Herr Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Ekkehard Haen

*Für meine Mutter
und im Gedenken an meinen Vater*

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Eisenmangelanämie	1
1.2 Der NO/cGMP/PKG-Signalweg.....	3
1.3 cGMP-abhängige Proteinkinasen	6
1.3.1 Struktur der cGMP-abhängigen Proteinkinasen.....	6
1.3.2 Expression der cGMP-abhängigen Proteinkinasen	7
1.3.3 Substrate der cGMP-abhängigen Proteinkinasen.....	8
1.3.4 Funktion der cGMP-abhängigen Proteinkinasen im Gastrointestinaltrakt	9
1.4 Das Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor assoziierte cGMP Kinase Substrat 1.....	10
1.4.1 Struktur und molekulare Funktion von IRAG1.....	10
1.4.2 Lokalisation und Expression von IRAG1	11
1.4.3 Funktion von IRAG1	12
2 Ziel der Arbeit	14
3 Materialien	15
3.1 Geräte.....	15
3.2 Software.....	16
3.3 Allgemeines Verbrauchsmaterial und versuchsspezifische Materialien	16
3.3.1 Allgemeines Verbrauchsmaterial	16
3.3.2 Genotypisierung	17
3.3.3 Organentnahme	17
3.3.4 RNA-Analytik	18
3.3.5 Proteinbiochemische Methoden	18
3.3.6 Haemocult [®] -Test, hämatologische und klinisch chemische Methoden	20
3.3.7 Histologie	21
4 Methoden	22
4.1 Tierhaltung.....	22
4.1.1 Haltung von Mäusen	22
4.1.2 Zucht von <i>Irag1</i> -defizienten Mäusen.....	22
4.1.3 Ermittlung der Wurfdaten und der Lebensdauer der IRAG1-KO Mauslinie.....	23
4.2 Genotypisierung der Versuchstiere.....	25
4.2.1 Isolation der DNA aus Ohrbiopsien.....	25
4.2.2 Polymerase-Kettenreaktion	26
4.2.3 Agarose-Gelelektrophorese zur Detektion der DNA	28
4.3 Organentnahme.....	29
4.4 RNA-Analytik.....	31
4.4.1 Isolierung von RNA	31
4.4.2 Synthese der cDNA	32
4.4.3 Quantitative Real-Time-PCR	33
4.5 Proteinbiochemische Methoden.....	35

4.5.1	Proteinisolation aus murinem Gewebe.....	35
4.5.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry.....	36
4.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	37
4.5.4	Western Blot.....	41
4.6	Haemocult®-Test.....	45
4.7	Hämatologische und klinisch chemische Methoden.....	46
4.7.1	Blutabnahme.....	46
4.7.2	Bestimmung des Hämatokritwertes	47
4.7.3	Bestimmung der Konzentration von Hämoglobin	47
4.7.4	Bestimmung der Anzahl der Erythrozyten.....	48
4.7.5	Berechnung von MCH und MCV	49
4.7.6	Bestimmung der Retikulozyten.....	50
4.7.7	Berechnung des Retikulozytenproduktionsindex.....	51
4.7.8	Bestimmung der Anzahl der Leukozyten.....	51
4.7.9	Bestimmung der Eisenkonzentration im Plasma.....	52
4.7.10	Bestimmung von Vitamin B12 und Folat mittels ELISA	54
4.8	Histologie.....	55
4.8.1	Herstellung histologischer Präparate.....	55
4.8.2	Eisenfärbung der Milz.....	56
4.8.3	PAS-Färbung des Duodenums	57
4.9	Statistische Auswertung.....	58
5	Ergebnisse	59
5.1	Zucht <i>Irag1</i> -defizienter Mäuse	59
5.1.1	Überlebensrate der Würfe der IRAG1-KO Mauslinie	59
5.1.2	Verteilung der Geschlechter in der IRAG1-KO Mauslinie.....	59
5.1.3	Verteilung der Genotypen in der IRAG1-KO Mauslinie.....	59
5.1.4	Vergleich des Überlebens von IRAG1-WT und IRAG1-KO Mäusen.....	60
5.2	Nachweis von okkultem Blut bei <i>Irag1</i> -defizienten Mäusen	61
5.2.1	Nachweis von okkultem Blut bei 14 Wochen alten Mäusen	61
5.2.2	Nachweis von okkultem Blut bei sechs Wochen alten Mäusen.....	62
5.3	Bestimmung des Gewichtes von Milz und Körper von <i>Irag1</i> -defizienten Mäusen ..	63
5.3.1	Milz- und Körpergewicht von 15 Wochen alten Mäusen	63
5.3.2	Milz- und Körpergewicht von sieben Wochen alten Mäusen	64
5.4	Hämatologische Untersuchung von globalen <i>Irag1</i> -defizienten Mäusen	66
5.4.1	Hämatologische Parameter von 15 Wochen alten Mäusen.....	66
5.4.2	Hämatologische Parameter von sieben Wochen alten Mäusen.....	69
5.4.3	Hämatologische Parameter von über 54 Wochen alten Mäusen.....	71
5.5	Charakterisierung der Anämie <i>Irag1</i> -defizienter Mäuse.....	74
5.5.1	Plasmaeisenkonzentration von IRAG1-WT und IRAG1-KO Mäusen	74
5.5.2	Proteinexpression der Ferritin Light Chain in Milz und Leber	75
5.5.3	Expression der mRNA von <i>Hamp</i> und <i>Tfr1</i> in der Leber	76
5.5.4	Eisenfärbung der Milz.....	77
5.5.5	Konzentration von Vitamin B12 und Folat im Plasma	78
5.6	Histologische Untersuchung des Duodenums	79
5.7	Expression von Proteinen des cGMP/PKGI-Signalweges in verschiedenen Organen <i>Irag1</i> -defizienter Mäuse	80
5.7.1	Expression von Proteinen des cGMP/PKGI-Signalweges im Colon.....	81

5.7.2	Expression von Proteinen des cGMP/PKGI-Signalweges in der Milz	82
5.7.3	Expression von Proteinen des cGMP/PKGI-Signalweges im Magen.....	84
5.8	Analyse der mRNA-Expression relevanter Gene des cGMP/PKGI- Signalweges ...	85
6	Diskussion	88
6.1	Zucht <i>Irag1</i> -defizienter Mäuse	88
6.2	<i>Irag1</i> -Defizienz führt zu gastrointestinalen Blutungen	90
6.3	Anämie assoziierte Splenomegalie in Folge einer <i>Irag1</i> -Defizienz	91
6.3.1	<i>Irag1</i> -Defizienz führt zu einer Eisenmangelanämie	91
6.3.2	<i>Irag1</i> -Defizienz führt in Folge der Eisenmangelanämie zu einer Splenomegalie	98
6.4	Einfluss der <i>Irag1</i> -Defizienz auf die Expression von Proteinen im cGMP/PKGI-Signalweg	101
6.5	Hypothese zur Bedeutung des PKGI β /IRAG1-Signalweges.....	104
7	Zusammenfassung.....	105
8	Anhang	107
8.1	Totalproteinaufnahmen.....	107
9	Literaturverzeichnis.....	111
10	Veröffentlichungen.....	121
10.1	Publikationen	121
10.1.1	Publikationen im Rahmen der Dissertation.....	121
10.1.2	Weitere Publikationen	121
10.2	Kongressteilnahmen	121
11	Danksagung.....	122
12	Eidesstattliche Erklärung.....	123

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Übersicht der Faktoren für einen Eisenmangel.....	2
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des NO/NP/cGMP/PKG-Signalweges.	5
Abbildung 1.3: Schematischer Aufbau der cGMP-abhängigen Proteinkinasen.	7
Abbildung 1.4: Strukturmodell von IRAG1.....	11
Abbildung 4.1: Reaktionsgleichung zur Bildung von Guajakblau.	45
Abbildung 5.1: Kaplan-Meier-Kurve von IRAG1-WT und IRAG1-KO Mäusen.	60
Abbildung 5.2: Haemocult [®] -Test von 14 Wochen alten Mäusen.	62
Abbildung 5.3: Haemocult [®] -Test von sechs Wochen alten Mäusen.....	62
Abbildung 5.4: Milzgewicht, Körpergewicht und Ratio von 15 Wochen alten Mäusen.	64
Abbildung 5.5: Milzgewicht, Körpergewicht und Ratio von sieben Wochen alten Mäusen...	65
Abbildung 5.6: Hämatologische Parameter von 15 Wochen alten Mäusen.....	67
Abbildung 5.7: Hämatologische Parameter von sieben Wochen alten Mäusen.	70
Abbildung 5.8: Hämatologische Parameter von über 54 Wochen alten Mäusen.....	72
Abbildung 5.9: Konzentration von Eisen im Plasma von 15 Wochen alten Mäusen.	74
Abbildung 5.10: Proteinexpression der Ferritin Light Chain in Milz und Leber.....	75
Abbildung 5.11: mRNA-Expression von Hpcidin und des Transferrin-Rezeptors 1.....	76
Abbildung 5.12: Eisenfärbung der Milz von IRAG1-WT und IRAG1-KO Mäusen.....	77
Abbildung 5.13: Plasmakonzentration von Vitamin B12 und Folat.	78
Abbildung 5.14: Histologische Untersuchung des Duodenums.....	80
Abbildung 5.15: Expression von Proteinen des cGMP/PKGI-Signalweges im Colon.....	81
Abbildung 5.16: Expression von Proteinen des cGMP/PKGI-Signalweges in der Milz.	83
Abbildung 5.17: Expression von Proteinen des cGMP/PKGI-Signalweges im Magen.	84
Abbildung 5.18: Expression der mRNA relevanter Gene des cGMP/PKGI-Signalweges.....	86
Abbildung 6.1: Schematische Darstellung der Entstehung der Eisenmangelanämie.....	98
Abbildung 6.2: Hypothese zur Funktion des PKGI β /IRAG1-Signalweges.	104
Abbildung 8.1: Totalproteinaufnahmen von Milz und Leber.	107
Abbildung 8.2: Totalproteinaufnahmen von Cola.....	108
Abbildung 8.3: Totalproteinaufnahmen von Milzen.....	109
Abbildung 8.4: Totalproteinaufnahmen vom Magen.....	110

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
× g	x-fache der Erdbeschleunigung
<	kleiner als
>	größer als
®	registrierte Marke
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
‰	Promille
A	Ampere
AG	Arbeitsgruppe
AI	Autoinhibitorische Bindungsstelle
al.	andere
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ANP	atriales natriuretisches Peptid
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Az.	Aktenzeichen
B	Breite
BNP	<i>Brain natriuretic peptide</i>
BSA	Rinderserumalbumin
c	Konzentration
Ca ²⁺	Calcium-Ion
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cDNA	komplementäre DNA
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
cGK	cGMP-abhängige Proteinkinase
cGKI	cGMP-abhängige Proteinkinase I
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat
chron.	chronisch
Cit	Citrullin
CNG	durch zyklische Nukleotide gesteuerte Ionenkanäle
CNP	C-Typ natriuretisches Peptid
CRP2	Cystein-reiches Protein 2
CRP4	Cystein-reiches Protein 4
Ct	<i>Cycle threshold</i>
Cu ¹⁺	Kupfer(I)-Ion
Cu ²⁺	Kupfer(II)-Ion
ddH ₂ O	Reinstwasser
dl	Deziliter
DMT1	Divalenter Metallionentransporter 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure

dNTP	Desoxyribonukleotid
<i>E</i>	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fe ²⁺	Eisen(II)-Ion
Fe ³⁺	Eisen(III)-Ion
FELASA	<i>Federation of European Laboratory Animal Science Associations</i>
FHC	Schwere Ferritin Kette (<i>Ferritin Heavy Chain</i>)
fl	Femtoliter
FLC	Leichte Ferritin Kette (<i>Ferritin Light Chain</i>)
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
ges.	gesamt
GI	gastrointestinal
GIT	Gastrointestinaltrakt
GMP	Guanosin-5'-monophosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
G α	α -Untereinheit des G-Proteins
h	Stunde
H	Höhe
H ⁺	Wasserstoffion, Proton
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Hb	Hämoglobin
HCN4	<i>Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 4</i>
HEPA	<i>High efficient particulate air</i>
HK	Hämatokrit
HRP	Meerretichperoxidase
<i>I</i>	Strom
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
int	intestinal
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IP ₃ R-I	Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor I
IP ₃ R-III	Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor III
IRAG	Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor assoziierte cGMP Kinase Substrat
IRAG1	Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor assoziierte cGMP Kinase Substrat 1
<i>Irag1</i> ^{-/-}	IRAG1 Knockout
<i>Irag1</i> ^{+/-}	IRAG1 Heterozygot
<i>Irag1</i> ^{+/+}	IRAG1 Wildtyp
IRIDA	<i>Iron refractory iron deficiency anemia</i>
IVC	<i>Inhalator ventilation cages</i>
katalyt. D.	Katalytische Domäne
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KO	Knockout

L	Länge
L-Arg	L-Arginin
LZM	Leucin-Zipper-Motiv
M	Molar
<i>m</i>	Masse
mA	Milliampere
männl.	männlich
MCH	Mittleres korpuskuläres Hämoglobin
MCV	Mittleres korpuskuläres Volumen
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium-Ion
min	Minute
ml	Milliliter
MLCP	Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MRVI1	<i>Murine retrovirus integration site 1</i>
MYPT1	Myosin-Leichtkettenphosphatase 1
<i>n</i>	Anzahl
<i>N</i>	Anzahl an Zellen
Na ⁺	Natrium-Ion
NHE3	Na ⁺ /H ⁺ -Austauscher 3
nm	Nanometer
nNOS	Neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NO-GC	Lösliche Guanylylzyklase
NOS	NO-Synthase
NOS1	Neuronale NO-Synthase
NOS2	Induzierbare NO-Synthase
NOS3	Endotheliale NO-Synthase
NP	Natriuretisches Peptid
NSAID	Nichtsteroidale Antirheumatika
OP	Operation
<i>p</i>	Signifikanzwert
p.a.	<i>pro analysi</i>
PAH	Pulmonale arterielle Hypertonie
PAS	<i>Periodic acid-Schiff reaction</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
pg	Pikogramm
pGC	Partikuläre Guanylylzyklase
PKA	Proteinkinase A
PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase
PKGI α	cGMP-abhängige Proteinkinase I α

PKGI β	cGMP-abhängige Proteinkinase I β
pmol	Pikomol
PPI	Protonenpumpeninhibitor
<i>Prkg1</i> ^{-/-}	PKGI Knockout
PS	Phosphatidylserin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit PCR
regulator. D.	Regulatorische Domäne
rER	Raues endoplasmatisches Retikulum
RGS2	<i>Regulator of G-protein signaling</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RPI	Retikulozytenproduktionsindex
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
s	Sekunde
s.	siehe
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
Ser	Serin
sGC	Lösliche Guanylylzyklase
SPF	spezifisch pathogenfrei
Stammlsg.	Stammlösung
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TfR1	Transferrin-Rezeptor 1
TiBUR	Tierbestand Uni Regensburg
TM	nicht registrierte Marke
TM	Transmembrandomäne
TP	Totalprotein
U	Unit
UV	ultraviolett
V	Volt
<i>V</i>	Volumen
weibl.	weiblich
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp
λ	Wellenlänge

1 Einleitung

1.1 Eisenmangelanämie

Der Eisenmangel ist die weltweit häufigste Mangelerkrankung des Menschen und somit auch die häufigste Ursache für eine Anämie. Weltweit sind etwa eine Milliarde Menschen davon betroffen. Daten aus Europa zeigen, dass die Gesamtprävalenz in der Bevölkerung bei 5-10% liegt, wovon Frauen im gebärfähigen Alter mit einer Prävalenz von 20% die Gruppe darstellen, die am stärksten betroffen ist. Bei Heranwachsenden liegt die Prävalenz für einen Eisenmangel bei 4-8%. Weltweit hat die Eisenmangelanämie große medizinische und soziale Auswirkungen. So kann sie zu kognitiven Beeinträchtigung von Kindern, den Verlauf einer Schwangerschaft für Mutter und Kind nachteilig beeinflussen, zu einer Abnahme der physischen Kraft bei Erwachsenen und zum kognitiven Verfall bei älteren Menschen führen (McLean et al. 2009; Vos et al. 2017; Camaschella 2019; Hastka et al. 2021).

Laut Definition der World Health Organization (WHO) liegt eine Eisenmangelanämie vor, wenn die Konzentration des Hämoglobins bei Frauen $< 12 \text{ g}\cdot\text{dl}^{-1}$ und bei Männern $< 13 \text{ g}\cdot\text{dl}^{-1}$ liegt und die Ferritinkonzentration weniger als $15 \mu\text{g}\cdot\text{dl}^{-1}$ beträgt (Benson et al. 2021; Hastka et al. 2021).

Ein Eisenmangel entsteht durch ein Missverhältnis zwischen Eisenaufnahme und -bedarf. Die Ursachen für einen Eisenmangel können vielfältig sein (s. Abbildung 1.1). Eine der häufigsten Ursachen ist ein chronischer Blutverlust. Dieser kann ausgelöst sein durch Blutungen im Gastrointestinaltrakt (GIT), beispielsweise durch eine chronische Gastritis oder Tumore. Aber auch Infektionen können als Folge zu chronischen Blutungen führen. So kann ein parasitärer Befall des GITs mit Hakenwürmern zu Blutungen führen oder eine Infektion mit *Helicobacter pylori*, in deren Folge es zur Bildung eines Ulcus kommen kann. Arzneistoffe wie nichtsteroidale Antirheumatika (NSAID) oder Antikoagulantien können ebenfalls eine Ursache sein. Ein erhöhter Bedarf an Eisen kann ebenfalls eine Ursache darstellen, betroffen sind hiervon vor allem Kleinkinder und Heranwachsende, Blutspender und Leistungssportler. Neben diesen Faktoren spielt auch die mangelnde Aufnahme von Eisen eine große Rolle. So kommt es durch vegane oder vegetarische Ernährung oder eine allgemeine Unterernährung ebenfalls zu einem Eisenmangel. Aber auch Erkrankungen wie Zöliakie, Autoimmunerkrankungen oder Folgen von operativen Eingriffen (OP), wie die Gastrektomie oder am Duodenum, sowie die Gabe von Protonenpumpeninhibitoren (PPI) können die Eisenaufnahme stören und so zu einem Eisenmangel führen.

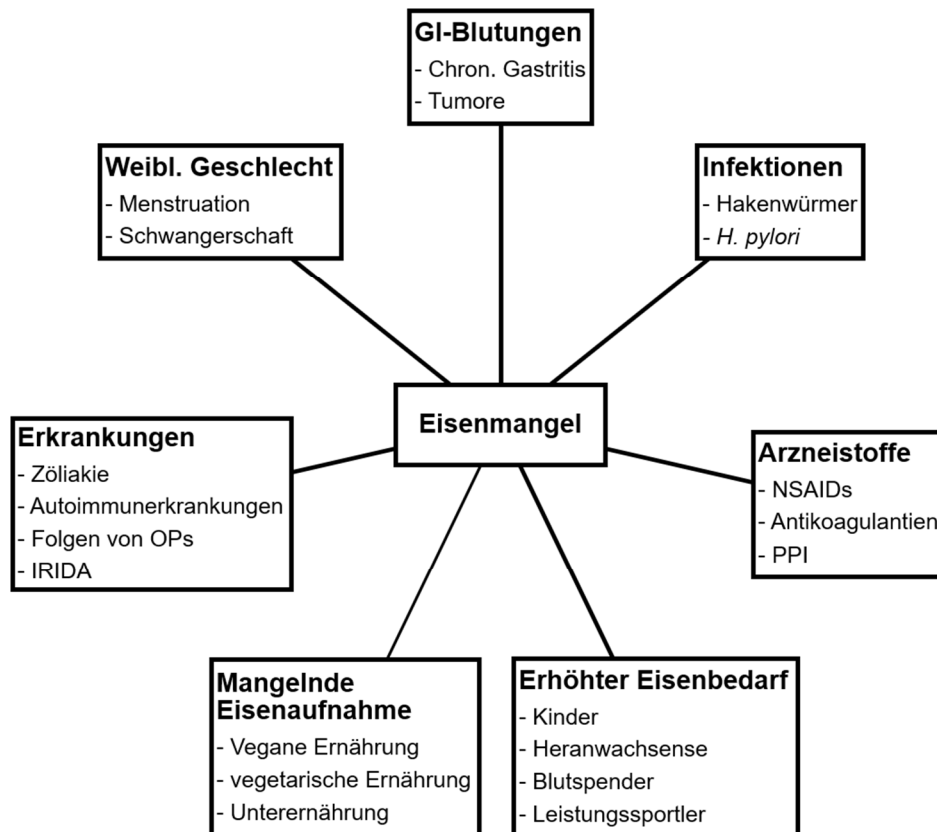


Abbildung 1.1: Übersicht der Faktoren für einen Eisenmangel.

Schematische Darstellung von Faktoren, die zu einem Eisenmangel führen. Weitere Erläuterungen befinden sich im Text.

Genetische Faktoren, wie sie beim hereditären eisenrefraktären Eisenmangelsyndrom (*iron refractory iron deficiency anemia*, IRIDA) vorliegen, können ebenfalls eine Ursache darstellen. Generell sind Frauen besonders betroffen, aufgrund der Menstruationsblutung, einer Schwangerschaft oder abnormalen Uterusblutungen (Clark 2008; Camaschella 2019; Benson et al. 2021).

Die wichtigste Maßnahme für eine erfolgreiche Behandlung ist eine gründliche Ursachenabklärung. Dabei darf aufgrund der klinischen Relevanz ein chronischer Blutverlust im GIT nicht ausgeschlossen werden, weshalb empfohlen wird, dass im Rahmen der Diagnostik eine Gastro- und Koloskopie durchgeführt werden.

Das Ziel der Therapie ist die Normalisierung und Stabilisierung der Konzentration des Hämoglobins und des Gesamtkörpereisens. Dazu zählt als erste Maßnahme die Beseitigung der Ursachen und von Kofaktoren, wie Ernährungsumstellung, Verbesserung der Eisenresorption und Beseitigung der chronischen Blutverluste. Eine medikamentöse Substitution von Eisen ist aber nur durchzuführen, wenn eine eisendefizitäre Erythropoese vorliegt, wie sie beispielsweise bei einer Schwangerschaft oder dialysepflichtigen Patienten vorkommen kann. Die Eisensubstitution sollte möglichst oral durchgeführt werden. Sie kann aber auch bei einer Unverträglichkeit

von oralen Wirkstoffen oder bei einer Eisenresorptionsstörung intravenös erfolgen und muss die jeweilige Ursache – beispielsweise Schwangerschaft, renale Anämie oder Tumorerkrankung – mitberücksichtigen (Hastka et al. 2021).

1.2 Der NO/cGMP/PKG-Signalweg

Das gasförmige Molekül Stickstoffmonoxid (NO) wird schon über viele Jahrzehnte therapeutisch eingesetzt. Der mit Abstand bekannteste Wirkstoff ist in diesem Zusammenhang das Nitroglycerin, welches als NO-Donor angewendet wird. Die Wirkung von NO beruht dabei auf einer dilatierenden Wirkung an den Gefäßen, weshalb Nitroglycerin zur Therapie pektanginöser Beschwerden eingesetzt wird (Marsh and Marsh 2000; Hofmann et al. 2006). Erst in der Mitte der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts ist NO innerhalb von zehn Jahren durch drei Arbeitsgruppen als funktionelles Molekül im Organismus identifiziert worden (Katsuki et al. 1977; Furchgott and Zawadzki 1980; Ignarro et al. 1986; Ignarro et al. 1987).

Welche physiologische Funktion NO und die davon abhängigen Signalwege im Körper haben, ist immer noch größtenteils unbekannt und Gegenstand aktueller Forschung. Gesichert ist, dass NO die Produktion von zyklischem Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP) stimuliert. cGMP moduliert dann je nach Zelltyp Phosphodiesterasen (PDEs), cGMP-abhängige Proteinkinasen (cGK oder PKG) oder durch zyklische Nukleotide gesteuerte Ionenkanäle (CNG-Kanäle) (Hofmann et al. 2000).

Die Bildung von NO erfolgt im Körper aus der Aminosäure L-Arginin (L-Arg) (s. Abbildung 1.2). Dabei kommt es durch eine Katalyse zur Oxidation des terminalen Stickstoffs an der Guanidinogruppe, so dass L-Citrullin (Cit) und NO entstehen (Palmer et al. 1988; Nathan and Xie 1994; Lloyd-Jones and Bloch 1996; Ignarro et al. 1999). Als Katalysator fungieren dabei NO-Synthasen (NOS), von denen drei Isoformen bekannt sind – die neuronale NO-Synthase (nNOS, NOS1), die induzierbare NO-Synthase (iNOS, NOS2) und die endotheliale NO-Synthase (eNOS, NOS3). eNOS und nNOS werden dabei als konstitutive NO-Synthasen bezeichnet, da beide Isoformen konstitutiv exprimiert werden, während die iNOS auf der transkriptionellen Ebene induzierbar ist. Die ursprüngliche Namensgebung bezieht sich dabei auf die Gewebe, in denen die NO-Synthasen erstmalig beschrieben worden sind.

Die Funktion der iNOS ist im kardiovaskulären System und im Immunsystem von Bedeutung. Während die nNOS an der neuronalen Zellkommunikation beteiligt ist, ist die eNOS unter anderem in die Vasodilatation involviert (Förstermann et al. 1991; Green et al. 2004; Chanrion et

al. 2007; Rastaldo et al. 2007; Tripathi et al. 2007). Nach ihrer Aktivierung leiten eNOS und nNOS eine durch Ca^{2+} /Calmodulin NO-vermittelte Signalübertragung ein (Förstermann et al. 1991; Marletta 1994). Die iNOS wird dagegen unabhängig von Ca^{2+} /Calmodulin reguliert und zwar über immunmodulierende Substanzen wie bakterielle Lipopolysaccharide und Zytokine. Durch ihre Induktion bei Entzündungsprozessen und im Rahmen der Immunabwehr werden deutlich höhere Mengen an NO gebildet, die dann zytotoxisch auf Bakterien und infizierte Zellen wirken (Radomski et al. 1990; Förstermann et al. 1991; Förstermann and Sessa 2012).

Die physiologische Wirkung von NO liegt unter anderem in der Regulation der gastrointestinalen Motilität, der Hemmung der Thrombozytenaggregation und der Relaxation von Glattmuskulzellen (Hofmann et al. 2006). Da NO ein Molekül mit einer sehr kurzen Halbwertszeit ist, kann es sehr schnell durch die Zellmembranen in das Zytosol diffundieren. Dort kommt es dann zur Aktivierung der löslichen Guanylylzyklase (sGC oder NO-GC), die als NO-Rezeptor fungiert, in dem NO an die prosthetische Häm-Gruppe bindet (Ignarro et al. 1982; Friebe and Koesling 2003; Kuhn 2003; Koesling et al. 2004; Krumenacker et al. 2004). Bei der NO-GC handelt es sich um ein heterodimeres Enzym, von dem je eine α_1 - und α_2 - sowie eine β_1 - und β_2 -Untereinheit beschrieben sind. Die prosthetische Häm-Gruppe befindet sich dabei an der β -Untereinheit. Von der NO-GC existieren zwei Heterodimere – NO-GC1 ($\alpha_1\beta_1$) und NO-GC2 ($\alpha_2\beta_1$). Ein funktionelles Dimer, das eine β_2 -Untereinheit aufweist, ist bisher aber noch nicht beschrieben worden. Die NO-GC1 wird ubiquitär exprimiert, während die NO-GC2 hauptsächlich in Gehirn und Lunge exprimiert wird (Friebe and Koesling 2003; Mergia et al. 2003). Bindet nun NO an die Häm-Gruppe, so kommt es zur Umwandlung von Guanosin-5'-triphosphat (GTP) in cGMP (Friebe and Koesling 2003; Kuhn 2003; Mergia et al. 2003; Krumenacker et al. 2004; Russwurm and Koesling 2004). Die Bildung von cGMP kann aber nicht nur durch die NO-GC erfolgen, sondern auch über die partikuläre Guanylylzyklase (pGC). Diese ist in der Zellmembran verankert und fungiert als spezifischer Rezeptor für die natriuretischen Peptide (NP) – Atriales natriuretisches Peptid (ANP), *brain natriuretic peptide* (BNP) und C-Typ natriuretisches Peptid (CNP) (Friebe and Koesling 2003; Kuhn 2003; Krumenacker et al. 2004). Wie bereits erwähnt, moduliert cGMP, in Abhängigkeit vom jeweiligen Gewebe und Zelltyp, entweder die PDEs oder die PKGs sowie CNG-Kanäle (s. Abbildung 1.2) (Sonnenburg and Beavo 1994; Biel et al. 1999; Hofmann et al. 2000; Schlossmann et al. 2003; Hofmann et al. 2006).

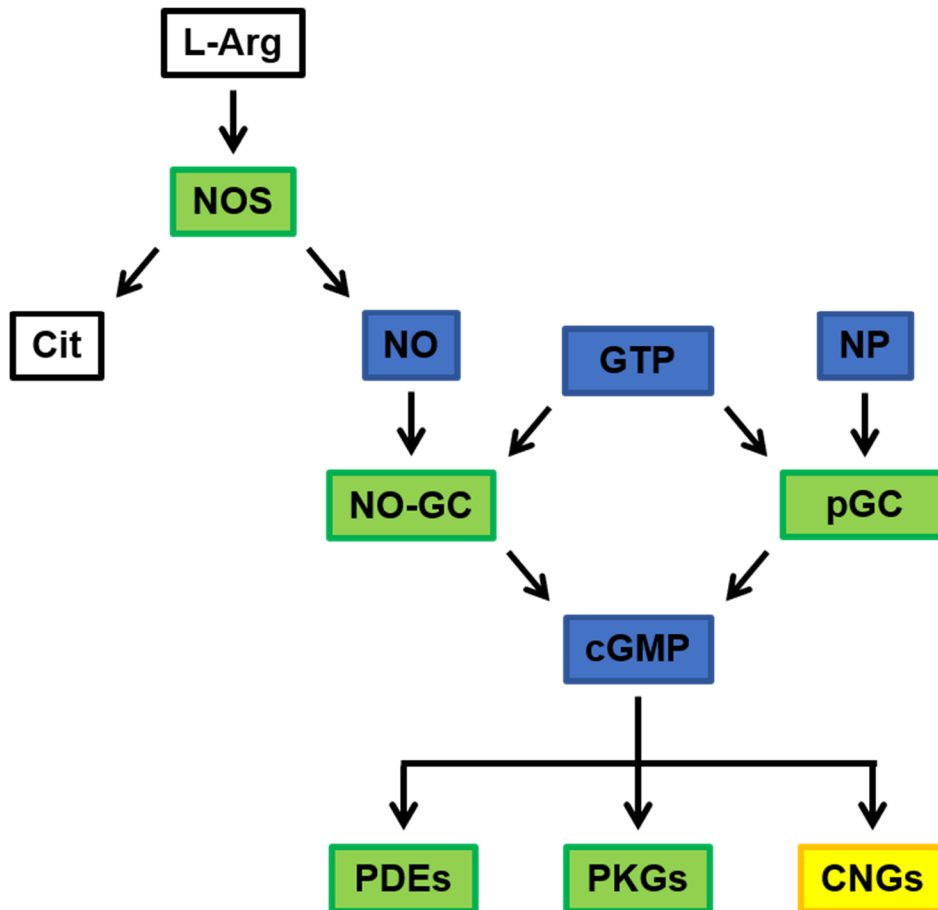


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des NO/NP/cGMP/PKG-Signalweges.

Dargestellt ist die Synthese von cGMP und dessen Effektoren. Enzyme sind mit grüner und weitere Proteine mit gelber Farbe dargestellt. Signalmoleküle sind mit blauer Farbe gekennzeichnet.

Wie lange die Wirkung von cGMP in einer Zelle anhält, ist abhängig von den Phosphodiesterasen (PDEs). PDEs sind eine Gruppe von Enzymen, die in der Lage sind, zyklische Nukleotide durch Hydrolyse abzubauen. So wird zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP) zu Adenosin-5'-monophosphat (AMP) hydrolysiert, während cGMP zu Guanosin-5'-monophosphat (GMP) hydrolysiert wird (Soderling et al. 1998). Bisher sind elf Genfamilien der PDEs beschrieben. Die Hydrolyse von cGMP wird dabei hauptsächlich spezifisch über PDE5, 6 und 9 vermittelt, während cAMP hauptsächlich von der PDE4, 7 und 8 spezifisch hydrolysiert wird. Die restlichen PDEs sind in der Lage sowohl cAMP als auch cGMP zu hydrolysieren (Kass et al. 2007). Die Konzentration von cAMP in einer Zelle kann dabei durch cGMP beeinflusst werden, da cGMP in der Lage ist die Hydrolyseaktivität der PDE2 und PDE3 zu modulieren. Diese beiden PDEs hydrolysieren cAMP spezifisch. Durch cGMP kommt es zu einer Stimulation der PDE2 oder zu einer Hemmung der PDE3, was sich somit auf die Konzentration von cAMP auswirkt. Neben cAMP – dem Hauptaktivator der Proteinkinase A (PKA) – kann auch cGMP die PKA aktivieren (Sonnenburg and Beavo 1994; Bender and Beavo 2006; Wörner et al. 2007).

1.3 cGMP-abhängige Proteinkinasen

1.3.1 Struktur der cGMP-abhängigen Proteinkinasen

Die cGMP-anhängigen Proteinkinasen (cGK oder PKG) sind mit Abstand die wichtigsten cGMP-Effektoren (Hofmann et al. 2006). In Säugern kommen drei verschiedene PKGs vor, obwohl nur zwei Gene für diese Enzyme codieren. Der Grund liegt darin, dass zwei der PKGs Spleißvarianten sind. Das Gen *Prkg1* codiert für die PKGI, von der zwei Isoformen aufgrund von alternativem Spleißen vorkommen – PKGI α und PKGI β . Die PKGII wird von dem Gen *Prkg2* codiert. PKGI α und PKGI β liegen gelöst im Zytoplasma vor. Die PKGII dagegen ist in der Plasmamembran verankert, aufgrund einer Myristoylierung der N-terminalen Aminosäure Glycin2 (Wernet et al. 1989; Vaandrager et al. 1996; Feil et al. 2003; Hofmann 2005; Hofmann et al. 2006). Alle drei PKGs werden zur Klasse der Serin/Threonin-Kinasen gezählt. Das heißt, dass sie nach ihrer Aktivierung durch cGMP die Übertragung einer Phosphatgruppe von Adenosintriphosphat (ATP) auf die Aminosäure Serin oder Threonin katalysieren (Scott 1991; Lohmann et al. 1997).

Bei den PKGs handelt es sich um Homodimere, die aus jeweils zwei identischen Untereinheiten zusammengesetzt sind, mit einem Molekulargewicht von etwa 75 kDa für die PKGI und etwa 85 kDa für die PKGII (Ruth et al. 1991; Feil et al. 2003).

Alle PKGs weisen drei funktionelle Domänen auf – eine N-terminale, eine regulatorische und eine katalytische Domäne (s. Abbildung 1.3) (Hofmann 2005; Hofmann et al. 2006). Die regulatorische Domäne (regulator. D.) enthält zwei Bindestellen für cGMP, die sich in ihrer Affinität für cGMP unterscheiden. Eine Bindestelle weist eine hohe und die andere Bindestelle eine niedrige Affinität für cGMP auf. Bindet cGMP an diese beiden Bindestellen, so kommt es zu einer Konformationsänderung der Sekundärstruktur. Durch die Bindung von cGMP an die regulatorische Domäne wird die Inhibierung des katalytischen Zentrums durch die N-terminale Autoinhibitorische-/Pseudosubstratbindungsstelle (AI) aufgehoben. An der katalytischen Domäne (katalyt. D.) befinden sich die Bindestellen für Mg²⁺-ATP und das Substrat. Hier wird die Übertragung des γ -Phosphats von ATP auf das Serin und/oder Threonin des Substrats katalysiert. Die N-terminale Domäne hat drei Funktionen. Zum einen die Blockade des katalytischen Zentrums bei Abwesenheit von cGMP. Zum anderen befindet sich an dieser Domäne ein Leucin-Zipper-Motiv (LZM), welches es ermöglicht, dass die als Monomere vorliegenden PKGs

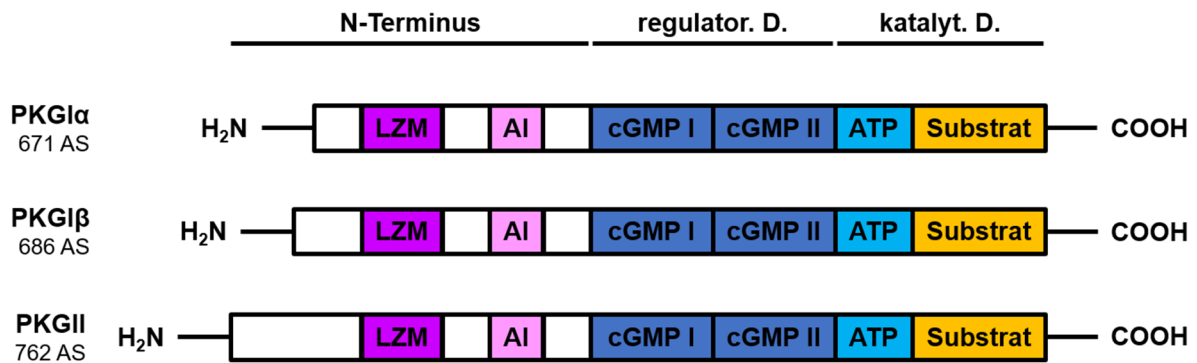


Abbildung 1.3: Schematischer Aufbau der cGMP-abhängigen Proteinkinasen.

Die katalytische Domäne (katalyt. D.) beinhaltet die Bindestelle für das Substrat und ATP, während sich in der regulatorischen Domäne (regulator. D.) die beiden Bindestellen für cGMP (cGMP I und cGMP II) befinden. Im N-Terminus befindet sich das Leucin-Zipper-Motiv (LZM) und die autoinhibitorische Bindestelle (AI). Die ausführliche Erklärung ist im Text beschrieben.

zu Homodimeren dimerisieren können. Es sind aber nur zwei identische PKGs in der Lage zu dimerisieren. Des Weiteren wird über den N-Terminus die Zielsteuerung der Enzyme zu verschiedenen subzellulären Strukturen vermittelt. Außerdem weisen die PKGs an diesem Ende die größte strukturelle Vielfalt auf. PKGIα und PKGIβ unterscheiden sich nicht nur strukturell, sondern auch in ihrer Sensitivität gegenüber cGMP. Die PKGIα wird etwa um den Faktor zehn sensitiver durch cGMP aktiviert als die PKGIβ (Ruth et al. 1991; Hofmann 2005; Hofmann et al. 2006).

1.3.2 Expression der cGMP-abhängigen Proteinkinasen

Im Gegensatz zu ihren strukturellen Gemeinsamkeiten, unterscheiden sich die PKGs in der Verteilung in den Geweben jedoch deutlich.

Die PKGI ist in großen Mengen in der glatten Muskulatur, in Thrombozyten, dem Cerebellum, dem Hippocampus, den Spinalganglien, der neuromuskulären Endplatte und in den Nieren exprimiert. In geringer Menge ist die Expression im Herzmuskel, dem vaskulären Endothel, in Granulozyten, Chondrozyten, Osteoklasten und in verschiedenen Hirnnervenkernen nachgewiesen worden. Die PKGIα ist insbesondere in der Lunge, dem Herzen, im Spinalganglion und dem Cerebellum gefunden worden. PKGIα und PKGIβ sind gemeinsam exprimiert in glattmuskulärem Gewebe, inklusive Uterus, Blutgefäßen, im Darm und der Trachea, wobei die PKGIβ dort stärker exprimiert ist. In Thrombozyten, den Neuronen des Hippocampus und dem *Bulbus olfactorius* liegt hauptsächlich die PKGIβ vor (Waldmann et al. 1986; Keilbach et al. 1992; Draijer et al. 1995; Kumar et al. 1999; Hofmann et al. 2000; Feil et al. 2003; Geiselhöringer et al. 2004a; Feil et al. 2005; Werner et al. 2005; Hofmann et al. 2006).

Die PKGII findet man hauptsächlich in mehreren Hirnnervenkernen, der intestinalen Mucosa, den Nieren, der Nebennierenrinde, der Lunge und in Chondrozyten (el-Husseini et al. 1995; Markert et al. 1995; Gambaryan et al. 1996; Lohmann et al. 1997; Vente et al. 2001; Werner et al. 2004).

1.3.3 Substrate der cGMP-abhängigen Proteinkinasen

Für die PGKI ist eine Vielzahl an Substratproteinen bekannt. Einige Substratproteine können nur spezifisch von einer der beiden Isoformen phosphoryliert werden, von vielen anderen Substraten ist die genaue Spezifität bisher aber noch nicht bekannt. Die Substratspezifität der PKG hängt dabei vom jeweiligen N-Terminus des PKGI-Isoenzym ab (Hofmann et al. 2006; Schlossmann and Desch 2011).

Spezifische Substrate der PKGI α sind die Myosin-Leichtkettenphosphatase 1 (MYPT1) und der *Regulator of G-protein signalling* (RGS2). MYPT1 ist in der glatten Muskulatur vorzufinden und die Phosphorylierung hat eine Hemmung der Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase (MLCP) zur Folge, was zu einer Abnahme der Calciumsensitivität führt (Wooldridge et al. 2004). RGS2 ist ebenfalls in Glattmuskeln exprimiert. Dessen Phosphorylierung führt zu einer Hemmung der Bildung von Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und somit zu einer Abschwächung der rezeptor-gesteuerten Gefäßkontraktion (Tang et al. 2003).

Das Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor assoziierte cGMP Kinase Substrat 1 (IRAG1) ist das bisher einzige beschriebene Substratprotein der PKGI β , das hauptsächlich in der glatten Muskulatur vorzufinden ist und die Ca²⁺-Freisetzung aus IP₃-sensitiven Speichern reguliert (Schlossmann et al. 2000; Geiselhöringer et al. 2004b). Näheres zu IRAG1 wird in Kapitel 1.4 beschrieben.

Der ubiquitär im endoplasmatischen Retikulum vorkommende Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor I (IP₃R-I) ist sowohl ein Substratprotein der PKGI als auch der PKA. Die Phosphorylierung des IP₃R-I durch die beiden Enzyme führt zu einer Freisetzung von Ca²⁺-Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum. Dieser Effekt hängt jedoch vom jeweiligen Subtyp des IP₃R-I ab. Der Subtyp 1 kann durch die PKA und PKGI phosphoryliert werden, so dass es zur Ca²⁺-Freisetzung kommt, während der Subtyp 2 keine Effekte auf eine Phosphorylierung durch die PKGI zeigt (Haug et al. 1999; Wagner et al. 2003)

Auch das Cystein-reiche LIM-Protein 4 (CRP4) – das früher auch als CRP2 bezeichnet worden ist – ist als ein Interaktionspartner der PKGI in Glattmuskeln und enterischen Neuronen des Dünndarms nachgewiesen worden. Es kann sowohl von der PKGI α wie auch von der PKGI β

phosphoryliert werden. Funktionell hat es einen Einfluss auf die Regulation des Tonus der glatten Muskulatur (Huber et al. 2000; Sausbier et al. 2005). Mittlerweile ist CRP4 auch als Substrat der PGKI im Herzmuskel identifiziert und wirkt dort als antihypertrophischer und antifibrotischer Faktor (Straubinger et al. 2017).

Für die PKGII ist unter anderem der *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR) als Substrat beschrieben. Bei CFTR handelt es sich um einen Chloridkanal, der sich in den sekretorischen Epithelien von verschiedenen Organen beispielsweise der Lunge befindet und bei der Entstehung der Mukoviszidose eine entscheidende Funktion einnimmt (Vaandrager et al. 1998).

1.3.4 Funktion der cGMP-abhängigen Proteinkinasen im Gastrointestinaltrakt

Die Funktionen der PKGs sind aufgrund ihrer nahezu ubiquitären Expression sehr unterschiedlich und variabel. Eine entscheidende Bedeutung haben sie im Nervensystem, dem kardiovaskulären System und in der Niere (Hofmann et al. 2006; Hofmann and Wegener 2013).

Die PKGI ist in allen Organen des Rumpfdarmes nachweisbar, die Glattmuskelzellen besitzen. Dazu zählen Ösophagus, Magen, Dünndarm, Colon und Caecum sowie das enterische Nervensystem (Pfeifer et al. 1998; Salmhofer et al. 2001; Geiselhöringer et al. 2004a). Eine Deletion der PKGI hat zur Folge, dass globale *Prkg1*-defiziente Mäuse einen starken pathologischen Phänotyp entwickeln. Die Tiere leiden dabei an einer Vergrößerung des Magens, einer verstärkten Kontraktion und Hypertrophie des Pylorus, einer Dilatation des Duodenums und Caecums sowie an Kontraktionen der Ileozökalregion. In Folge dieser pathologischen Veränderungen ist bei diesen Tieren die Magen-Darm-Passage erhöht (Pfeifer et al. 1998; Ny et al. 2000). Verantwortlich für diesen Phänotyp ist sehr wahrscheinlich eine gestörte und/oder defekte Relaxation der Glattmuskelzellen. Es konnte nämlich beobachtet werden, dass die Ca^{2+} -abhängige und Ca^{2+} -unabhängige intestinale Relaxation durch die *Prkg1*-Defizienz beeinträchtigt gewesen ist (Bonnevier et al. 2004). Die glattmuskelspezifische *Prkg1*-Deletion führt dagegen zu einem etwas anderen Phänotyp. Diese Tiere weisen keine veränderte gastrointestinale Motilität auf, während die Relaxation der intestinalen Glattmuskelzellen ebenfalls vermindert ist. Ursache ist in diesem Fall wohl eine Störung im Zusammenspiel zwischen dem enterischen Nervensystem und den Glattmuskelzellen (Schlossmann et al. 2005).

Die *Prkg1*-Defizienz führt aber nicht nur zu Motilitätsstörungen im Gastrointestinaltrakt. Globale *Prkg1*-defiziente Mäuse entwickeln auch gastrointestinale Blutungen, als Folge von Ulcera

im Duodenum (Singh et al. 2012; Angermeier et al. 2016). Diese sind auch bei PKGI-Rescue Mäusen zu beobachten gewesen. Bei diesen Tieren handelt es sich um globale *Prkg1*-defiziente Mäuse, bei denen unter der Kontrolle des glattmuskulären Sm22 α -Promotors die PKGI α oder PKGI β überexprimiert wird, so dass es in den Glattmuskelzellen trotzdem zu einer Expression der PKGI α/β kommt (Weber et al. 2007). Durch die Gabe eines Protonenpumpenhemmers (PPI) können die Blutungen und die Ulcera unterbunden werden. Ursache für die Ulcera ist eine gestörte Regulation des pH-Wertes im Duodenum, aufgrund einer gestörten Sekretion von Bicarbonat, die über den *Nervus vagus* reguliert wird (Singh et al. 2012; Angermeier et al. 2016). In Folge der *Prkg1*-Defizienz kommt es auch zu einer Anämie und Splenomegalie. Diese beiden Symptome sind ebenfalls eine Folge der gastrointestinalen Blutungen, da durch die Gabe von PPI sowohl die Anämie als auch die Splenomegalie verhindert werden können (Föllner et al. 2008; Angermeier et al. 2016).

Die Funktion der PKGII im Gastrointestinaltrakt ist nicht so vielfältig wie die der PKGI. Durch Phosphorylierung des CFTR stimuliert die PKGII die Sekretion von Chloridionen und Wasser. Zudem reguliert sie die Aufnahme von Na⁺-Ionen im Dünndarm durch Hemmung des Na⁺/H⁺-Austauschers 3 (NHE3) (Pfeifer et al. 1996; Vaandrager et al. 1998; Vaandrager et al. 2000; Cha et al. 2005).

1.4 Das Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor assoziierte cGMP Kinase Substrat 1

1.4.1 Struktur und molekulare Funktion von IRAG1

Das Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor assoziierte cGMP Kinase Substrat 1 (IRAG1), das bis vor kurzem auch als IRAG bezeichnet wurde und dessen humanes Homolog die Bezeichnung MRVII (*murine retrovirus integration site 1*) trägt, ist erstmals im Jahr 2000 beschrieben worden (Schlossmann et al. 2000). Es handelt sich dabei um ein Protein mit einer mittleren Molekülmasse von 125 kDa. Von IRAG1 werden zwei Formen exprimiert – IRAG1a und IRAG1b. Diese beiden Formen unterscheiden sich in ihrem N-terminalen Ende und entstehen in Folge von alternativem Spleißen. Interessanterweise unterscheidet sich die tatsächliche Molekülmasse der beiden Formen von IRAG1 von den berechneten Molekülmassen. IRAG1a weist eine apparente Molekülmasse von 130 kDa auf, während die errechnete Molekülmasse bei 97 kDa

liegt. Die Molekülmasse von IRAG1b soll in der Theorie bei 93 kDa liegen, während sie apparent bei 125 kDa liegt (Shaughnessy et al. 1999; Schlossmann et al. 2000).

IRAG1 ist über eine Transmembrandomäne (TM), die sich am C-terminalen Ende befindet, im endoplasmatischen Retikulum (ER) verankert. Zudem weist es eine coiled-coil-Domäne auf, die Protein-Protein-Interaktionen erlaubt, sowie zwei Phosphorylierungsstellen für die PKGI β (s. Abbildung 1.4). Weiterhin bildet IRAG1 einen Komplex mit der PKGI β und dem Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor I (IP₃R-I) (Schlossmann et al. 2000; Ammendola et al. 2001).

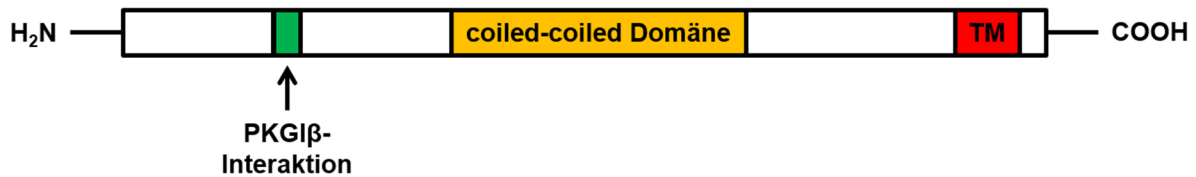


Abbildung 1.4: Strukturmodell von IRAG1.

IRAG1 ist über die Transmembrandomäne (TM) im ER verankert. Die für die Interaktion mit der PKGI β und dem IP₃R-I verantwortlichen Strukturen sind grün- und orangefarben dargestellt. Weitere Erläuterungen finden sich im Text.

Die Interaktion zwischen IRAG1 und der PKGI β erfolgt dabei ausschließlich über die Leucin-Zipper Region am Aminoterminus der PKGI β . Eine Interaktion zwischen IRAG1 und PKGI α oder der PKGI γ ist dagegen nicht nachweisbar gewesen. So wie IRAG1 unabhängig von der PKGI β über die coiled-coil-Domäne mit dem IP₃R-I interagiert, bildet es auch eine cGMP-unabhängige stabile Verbindung mit der PKGI β . In Folge dieser stabilen Interaktionen kommt es nach der Phosphorylierung von IRAG1 am Ser696 durch die PKGI β zu einer Hemmung der über den IP₃R-I vermittelten Ca²⁺-Freisetzung. Mutiert man den N-terminalen Teil der coiled-coil-Domäne, so kann IRAG1 nicht mehr mit dem IP₃R-I interagieren, was zur Folge hat, dass die PKGI β die Ca²⁺-Freisetzung nicht mehr modulieren kann. Gleichzeitig verhindert die Anwesenheit von IRAG1 auch, dass die PKGI β cGMP-vermittelt in den Zellkern transloziert (Schlossmann et al. 2000; Ammendola et al. 2001; Fritsch et al. 2004; Geiselhöringer et al. 2004b; Casteel et al. 2008).

1.4.2 Lokalisation und Expression von IRAG1

IRAG1 ist bei der Erstbeschreibung in der Trachea, der Aorta und dem Uterus detektiert worden sowie in Glattmuskelzellen des Colons. Eine großangelegte Expressionsanalyse hat ergeben, dass IRAG1 in einer Vielzahl von Geweben exprimiert wird. Hierbei hat sich gezeigt, dass IRAG1 in großen Mengen in Geweben mit einem hohen Anteil an glatter Muskulatur vorkommt, zum Beispiel im Magen, der Lunge oder der Harnblase. In kleineren Mengen ist IRAG1 aber auch in der Milz nachweisbar. In Thrombozyten ist dagegen ebenfalls eine große Menge

an IRAG1 gefunden worden. Zudem hat sich bei dieser Expressionsanalyse gezeigt, dass die Lokalisation und die Intensität der Expression von IRAG1 und der PKGI β sehr eng miteinander korrelieren (Schlossmann et al. 2000; Fritsch et al. 2004; Geiselhöringer et al. 2004a). Neuere Daten zeigen, dass IRAG1 auch im murinen Sinusknoten detektiert werden konnte (Peters et al. 2020).

1.4.3 Funktion von IRAG1

Die genaue (patho-)physiologische Funktion von IRAG1 ist noch unklar und Gegenstand der aktuellen Forschung.

Erste funktionelle Untersuchungen sind an *Irag1* ^{Δ 12/ Δ 12}-Mausmutanten durchgeführt worden. Bei diesen Mäusen liegt eine Deletion des Exons 12 von *Irag1* vor, welches für den N-Terminus der coiled-coil-Domäne codiert. Diese Deletion hat zur Folge, dass die Interaktion zwischen IRAG1 und dem IP₃R-I unterbrochen ist. *Irag1* ^{Δ 12/ Δ 12}-Mausmutanten haben dadurch eine Vergrößerung des Gastrointestinaltraktes und eine verlangsamte Magen-Darm-Passage entwickelt. Die Vergrößerung des Gastrointestinaltraktes ist auch bei globalen *Irag1*-defizienten Mäusen – bei denen das Exon 3 von *Irag1* deletiert worden ist – zu beobachten gewesen. Zudem war bei beiden Mauslinien die gastrointestinale Relaxation vermindert (Geiselhöringer et al. 2004b; Desch et al. 2010). Mittlerweile ist auch eine Beteiligung von IRAG1/MRVII im Zusammenhang mit einer Achalasie identifiziert worden (Koehler et al. 2020; Palmieri et al. 2020). Diese Befunde deuten darauf hin, dass IRAG1 für die Funktion des Gastrointestinaltraktes von großer Bedeutung ist.

Es sind aber auch Effekte von IRAG1 auf das kardiovaskuläre System beschrieben. In vaskulären Glattmuskelzellen von *Irag1*-Mausmutanten ist die NO/cGMP-abhängige Relaxation stark vermindert, wenn die Kontraktion durch Hormone induziert worden ist (Geiselhöringer et al. 2004b; Desch et al. 2010). Der basale Blutdruck von *Irag1*-defizienten Mäusen unterscheidet sich nicht gegenüber dem von Wildtypmäusen. Nach der Induktion einer Sepsis kommt es bei Wildtyp-Mäusen zu einem Blutdruckabfall, der bei *Irag1*-defizienten Mäusen nicht zu beobachten war. Weiterhin kommt es in Folge der *Irag1*-Defizienz bei Mäusen zur Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie und rechtsventrikulärer Dysfunktion, Hypertrophie und Zunahme des systolischen Blutdrucks (Desch et al. 2010; Biswas et al. 2020). *MRVII* – das humane Gen von IRAG1 – ist außerdem als ein Risikogen für koronare Herzkrankheit im Zusammenhang mit Thrombosen identifiziert worden (Wobst et al. 2018). Durch die Expression von IRAG1 im

Sinusknoten, konnte bei Mäusen gezeigt werden, dass IRAG1 die Funktion von HCN4-Kanälen (*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 4*) verstärkt (Peters et al. 2020). Von großer Bedeutung ist auch die Funktion von IRAG1 in den Thrombozyten. IRAG1 reguliert die NO/cGMP-vermittelte Hemmung der Thrombozytenaggregation und die Bildung von Thromben. Dies ist auch vermutlich die Ursache, warum *Irag1*-defiziente Mäuse eine verkürzte Blutungszeit aufweisen (Antl et al. 2007; Schinner et al. 2011).

Weiterhin gibt es Hinweise, dass die *Irag1*-Defizienz auf Organebene zu einer Splenomegalie führt und auf molekularer Ebene eine veränderte Expression der PKGI β bewirkt (Geiselhöringer et al. 2004b; Desch et al. 2010; Biswas et al. 2020).

2 Ziel der Arbeit

Defekte im NO/cGMP/PKGI-Signalweg sind für die Entstehung von gastrointestinalen Erkrankungen und daraus resultierenden Folgeerkrankungen von großer Bedeutung. Erste Hinweise deuten darauf hin, dass IRAG1 in diesem Kontext ebenfalls von Bedeutung ist, da eine *Iragl*-Defizienz zu ähnlichen Symptomen führt, wie sie auch von *Prkg1*-defizienten Mäusen bekannt sind.

Aus diesem Grund soll an *Iragl*-defizienten Mäusen untersucht werden, ob und inwieweit IRAG1 an der Entwicklung von gastrointestinalen Blutungen, einer Anämie und einer Splenomegalie beteiligt ist. Des Weiteren soll untersucht werden, ob und in welcher Form die *Iragl*-Defizienz zu einer Veränderung von relevanten Proteinen des NO/cGMP/PKGI-Signalweges führt. Ziel soll dabei sein, Signalwege oder Mechanismen zu identifizieren, die bei der Entstehung dieser Symptome von Bedeutung sein könnten.

3 Materialien

3.1 Geräte

Gerät	Gerätebezeichnung, Hersteller
Absaugeinrichtung Detektionssystem (Western Blot)	Eppendorf EOM-P 4153, Eppendorf AG ChemiDoc™ MP Imaging System, Bio-Rad Laboratories, Inc.
Elektrodenplatten Western Blot Elektrophoresekammer (Genotypisierung)	Semi-Dry-Blotter MAXI, Carl Roth® GmbH Casting System Compact Biometra, Biometra GmbH
Elektrophoresekammer (SDS-PAGE)	Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell, Bio-Rad Laboratories, Inc.
Heizblock	Thermomixer® comfort, Eppendorf AG ThermoMixer® C, Eppendorf AG
Heizplatte	VWR International
Homogenisator Magnetrührer	Ultra-Turrax®, IKA-Werke GmbH & Co. KG Heidolph MR 3000, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
Mikroskope	Axio Observer.Z1, Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH OLYMPUS CH, OLYMPUS EUROPA SE & CO. KG
Mikrotiterplatten-Photometer	Tecan Sunrise Remote™, Tecan Deutschland GmbH
Mikrowelle	Moulinex Micro-Chef, GROUPE SEB DEUTSCHLAND GmbH
PCR-Thermocycler pH-Meter Photometer	Biometra T1 Thermocycler, Biometra GmbH pH 526, WTW Eppendorf BioPhotomer® plus, Eppendorf AG Shimadzu™ UVmini-1240 Model, Shimadzu Europa GmbH
Pipetten	Rainin Pipet Lite Classic, Mettler-Toledo GmbH
Präparierbesteck qPCR-Thermocycler	Fine Science Tools GmbH Lightcycler® 480 System, Roche Diagnostics GmbH
Reinstwasseraufbereitungsanlage	arium® basic, Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG
Rotationsmikrotom Schüttler	Microm HM355S, ThermoFisher Scientific IKA® KS 260 Basic, IKA®-Werke GmbH & CO.KG IKA® HS 260 Basic, IKA®-Werke GmbH & CO.KG
Schüttler für Blutmischpipetten Spiegelreflexkamera	Rotor-mix II/8, BRAND GMBH + CO KG EOS 1200D, Canon Inc.

Strom-/Spannungsquelle	Biometra PS 305 T, Biometra GmbH PowerPac™ 200, Bio-Rad Laboratories, Inc
Trockenschrank	Memmert GmbH + Co. KG
UV-Transluminator	Biometra TI 1, Biometra GmbH
Waagen	Sartorius 1202 MP, Sartorius AG Sartorius BP 211 D, Sartorius AG Sartorius Extend, Sartorius AG
Wärmeschrank	Heraeus UB6 Function Line, ThermoFisher Scientific
Wasserbad	GFL® 1052, GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH
Zentrifugen	Centrifuge + Vortexer CM-70M, neoLab Migge GmbH Centrifuge 5415D, Eppendorf AG Centrifuge 5417R, Eppendorf AG Heraeus Multifuge 1 L-R, Heraeus MIKRO 22 R, Andreas Hettich GmbH & Co.KG

3.2 Software

Software	Hersteller
AxioVision Release 4.8	Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH
BioDocAnalyze 2.67.5.0	Biometra GmbH
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, Inc.
Image Lab 6.1.0	Bio-Rad Laboratories, Inc.
LightCycler® 480 Sw 1.5	Roche Diagnostics GmbH
Magellan 5	Tecan Deutschland GmbH
Microsoft Office	Microsoft Corporation

3.3 Allgemeines Verbrauchsmaterial und versuchsspezifische Materialien

3.3.1 Allgemeines Verbrauchsmaterial

Alle verwendeten gängigen Verbrauchsmaterialien sind, sofern sie nicht gesondert aufgeführt sind, von folgenden Firmen bezogen worden:

- Carl Roth® GmbH
- Sarstedt AG & Co
- VWR International

3.3.2 Genotypisierung

Lösung/Material/Substanz	Bestellnummer	Hersteller/Lieferant
PCR-Reaktionspuffer 10×	D1806	Sigma-Aldrich®
Biozym LE Agarose	840004	Biozym Scientific GmbH
dNTP Set 100 mM	R0182	ThermoFisher Scientific
Essigsäure ($c \geq 99,8\%$) p.a.	33209-2.5L-M	Sigma-Aldrich®
GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Größenstandard)	SM0241	ThermoFisher Scientific
MIDORI Green Advance	MG04	NIPPON Genetics EUROPE
Natriumhydroxid (NaOH)	6771.1	Carl Roth® GmbH
ROTI® Load DNA (Gelladepuffer)	X904.1	Carl Roth® GmbH
Taq DNA-Polymerase	D1806-1.5KU	Sigma-Aldrich®
Titriplex® III (EDTA)	1.08418.1000	Merck KGaA
Trizma®-Base (Tris)	T1503-1KG	Sigma-Aldrich®

Primer zur Genotypisierung

Primer	Sequenz
KS 34f	5'-AAGGAGCTCCGTGTTTTGCA-3'
KS 42r	5'-CACTACGCCATTCTGCTGCC-3'
KS 43r	5'-AAGGTGAAACTCAAATACCA-3'

3.3.3 Organentnahme

Lösung/Material/Substanz	Bestellnummer	Hersteller/Lieferant
Dikaliumhydrogenphosphat ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$)	1.05099.1000	Merck KGaA
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	E8145-50G	Sigma-Aldrich®
Feather disposable scalpel No. 22	02.001.30.022	FEATHER Safety Razor, Co., LTD.
Kaliumchlorid (KCl)	1.04936.1000	Merck KGaA
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	P5379-100G	Sigma-Aldrich®
Magnesiumchlorid ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	1.05833.1000	Merck KGaA
Methanol 100% (MeOH)	10284580	ThermoFisher Scientific
Natriumchlorid (NaCl)	31434-5KG-R	Sigma-Aldrich®
Natriumdihydrogenphosphat ($Na_2HPO_4 \cdot H_2O$)	1.06346.1000	Merck KGaA
Paraformaldehyd (PFA)	158127-500G	Sigma-Aldrich®
RNAlater™	R0901-500ML	Sigma-Aldrich®
Saccharose	S1888	Sigma-Aldrich®

3.3.4 RNA-Analytik

Lösung/Material/Substanz	Bestellnummer	Hersteller/Lieferant
M-MLV RT 5× buffer	M531 A	Promega Corporation
Chloroform	1.02445.2500	Merck KGa
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	D5758-25ML	Sigma-Aldrich®
dNTP Set 100 mM	R0182	ThermoFisher Scientific
Ethanol 100%	32205-2,5L-M	Sigma-Aldrich®
Isopropanol 100%	33539-1L-M	Sigma-Aldrich®
LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white	04729692001	Roche Diagnostics GmbH
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	04707516001	Roche Diagnostics GmbH
M-MLV Reverse Transcriptase (RT) (200 U·µl ⁻¹)	M170B	Promega Corporation
Oligo(dT) ₁₈ Primer	SO132	ThermoFisher Scientific
PeqGOLD TriFast™	30-2010	VWR International
RNasin® Ribonuclease Inhibitor	N251B	Promega Corporation

Primer für qRT-PCR

Gen	Forward-Primer	Reverse-Primer
<i>Gapdh</i>	5'-CACCAGGGCTGCCATTTGCA-3'	5'-GCTCCACCCTTCAAGTGG-3'
<i>Gucyl1b1</i>	5'-TGCAAGCAAAGTCCTCAACCT-3'	5'-ATCCCAGGACACGCAAGATG-3'
<i>Hamp</i>	5'-TGAGCAGCACCACTATCTC-3'	5'-ACAGCAGAAGATGCAGATGG-3'
<i>Irag1</i>	5'-GAGGCTTTCCACCGACAC-3'	5'-TTGGAGAAACAGCTGATGGGG-3'
<i>Itpr1</i>	5'-CCACAGAGCAGGAGCTTGAA-3'	5'-GTGACACTGAACCTCAGCCA-3'
<i>Itpr3</i>	5'-CTGGATCAGGACTGGTCAGC-3'	5'-GAGGACACGCGGCCTTT-3'
<i>Prkg1a</i>	5'-CGCCAGGCGTTCCGGAAGTT-3'	5'-GTGCAGAGCTTCACGCCTT-3'
<i>Prkg1b</i>	5'-TGGACAAGTATCGCTCGGTG-3'	5'-GATCCTTCGACTGTGGGCTC-3'
<i>Tfr1</i>	5'-TACCTGGGCTATTGTAAGCG-3'	5'-TTTGAGATCCAGCCTCACG-3'

3.3.5 Proteinbiochemische Methoden

Lösung/Material/Substanz	Bestellnummer	Hersteller/Lieferant
1,4-Dithiothreitol (DTT)	1008.0025	GERBU Biotechnik GmbH
2,2,2-Trichlorethanol	T54801-100G	Sigma-Aldrich®
6-Aminocapronsäure	07260-500G	Sigma-Aldrich®
Acrylamid-Lösung 40% (AA)	01697-500ML	Sigma-Aldrich®
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	A3678-25G	Sigma-Aldrich®
Benzamidin	04036-72	Nacalai Tesque, Inc.
biostep® Glasplatte	20-30-114	biostep® GmbH
biostep® Glasplatte mit 0,75 mm Spacer	20-30-116	biostep® GmbH

3 Materialien

Bromphenolblau	B8026-5G	Sigma-Aldrich®
Clarity™ Western ECL Substrate	1705061	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Glycerol 87% p.a.	A3561,1000	AppliChem GmbH
Glycin	1.04201.1000	Merck KGaA
Isopropanol 100%	1.09634.2511	Merck KGaA
Leupeptin	CN33.2	Carl Roth® GmbH
Magermilchpulver	- - -	J. M. Gabler-Saliter Milchwerk GmbH & Co.KG
Methanol (MeOH)	10284580	ThermoFisher Scientific
N-(2-Hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl)glycin (Tricin)	1071.1000	GERBU Biotechnik GmbH
N,N'-Methylenbisacrylamid (BisAA)	6667	Fluka Chemie AG
Natriumazid p.a. (NaN ₃)	1.06688.0100	Merck KGaA
Natriumchlorid (NaCl)	31434-5KG-R	Sigma-Aldrich®
Natriumdodecylsulfat ultrapure (SDS)	A1112,0100	AppliChem GmbH
Nonaethylene glycol monododecyl ether (Lubrol)	P9641-100G	Sigma-Aldrich®
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	26619	ThermoFisher Scientific
PageRuler™ ungefärbte Proteinleiter	26614	ThermoFisher Scientific
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	78830-5G	Sigma-Aldrich®
PhosSTOP™	04906837001	Roche Diagnostics GmbH
Ponceau S	141194-25G	Sigma-Aldrich®
ProSieve™ QuadColor™ Protein Marker	00193837	Lonza Rockland, Inc.
Protein Assay Reagent A	500-0113	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Protein Assay Reagent B	500-0114	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Protein Assay Reagent S	500-0115	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Rinderserumalbumin (BSA)	1501.0100	GERBU Biotechnik GmbH
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	T9281-100ML	Sigma-Aldrich®
Titriplex® III (EDTA)	1.08418.1000	Merck KGaA
Transfermembran ROTI®PVDF 0.45	T830.1	Carl Roth® GmbH
Trichloressigsäure 100%	1.00807.0250	Merck KGaA
Trizma®-Base (Tris)	T1503-1KG	Sigma-Aldrich®
Tween® 20	8.22184.0500	Merck KGaA
Whatman™ Chromatography paper	3030-6188	GE Healthcare Life Sciences

Primärantikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller/Lieferant
Anti-FLC	Kaninchen	1:2000	Abcam (#69090)
Anti-IP ₃ R-I	Kaninchen	1:250	Cell Signaling Technology [®] , Inc. (#3763S)
Anti-IP ₃ R-III	Maus	1:100	BD Biosciences (#610313)
Anti-IRAG91	Kaninchen	1:200	Pharmakologie AG Schlossmann
Anti-PKGIβ (104-5)	Kaninchen	1:200	Pharmakologie AG Schlossmann
Anti-PKGIα (2003)	Kaninchen	1:80	Pharmakologie AG Schlossmann
Anti-sGC-β-1	Kaninchen	1:500	Sigma-Aldrich [®] (#G4405)

Sekundärantikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller/Lieferant
Anti-Kaninchen	Ziege	1:10000	Dianova GmbH (#111-035-003)
Anti-Maus	Ziege	1:10000	Sigma-Aldrich [®] (#A4416)

3.3.6 Haemocult[®]-Test, hämatologische und klinisch chemische Methoden

Lösung/Material/Substanz	Bestellnummer	Hersteller/Lieferant
Blutmischpipetten nach Thoma, rot	HECH40356710	VWR International
Blutmischpipetten nach Thoma, weiß	HECH40357710	VWR International
Brillantkresylblau-Lösung	1.01384.0100	Merck KGaA
Folic Acid (FA) ELISA Kit	ABIN6966851	antibodies-online GmbH
Haemocult [®]	1771	Beckman Coulter, Inc.
Hämatokrit-Versiegelungskitt	749510	BRAND GMBH + CO KG
Kaliumcyanid (KCN)	207810-25G	Sigma-Aldrich [®]
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	1.04873.1000	Merck KGaA
Kaliumhexacyanoferrat(III) (K ₃ [Fe(CN) ₆])	244023-100G	Sigma-Aldrich [®]
Microvette [®] CB 300 LH	16.443	Sarstedt AG & Co
Mikrohämatokrit-Kapillare	749311	BRAND GMBH + CO KG
Mikropipetten, BLAUBRAND [®] , intra-MARK	708718	BRAND GMBH + CO KG
NaCl 0,9% B. Braun, Ecolav [®]	BRAU3570130	VWR International
Objektträger (ohne Mattrand)	631-1552P	VWR International
Pipettierhelfer micro-classic, komplett	25900	BRAND GMBH + CO KG
QuantiChrom [™] Iron Assay Kit	BAS-DIFE	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH
Türks Lösung	1.09277.0100	Merck KGaA
Vitamin B12 ELISA Kit	ABIN367778	antibodies-online GmbH
Zählkammer, BLAUBRAND [®] , Neubauer improved	717805	BRAND GMBH + CO KG

3.3.7 Histologie

Lösung/Material/Substanz	Bestellnummer	Hersteller/Lieferant
Deckgläschen	631-0146	VWR International
DePeX	18243	SERVA Electrophoresis GmbH
Einbettformen Macro	AEK8.1	Carl Roth® GmbH
Einbettkassetten Macrosette™	EE16.1	Carl Roth® GmbH
Embedding Ring (Einbettring)	M460	Simport® Scientific Inc.
Ethanol 100% p.a. (EtOH)	32205-2.5L	Sigma-Aldrich®
Färbetrog	MARI4200004	VWR International
Färbezyylinder	631-9130	VWR International
Isopropanol	1.09634.2511	Merck KGaA
Kaliumhexacyanoferrat(II) Trihydrat (K ₄ [Fe(CN) ₆]·3H ₂ O)	7974.1	Carl Roth® GmbH
Menzel Gläser Polysine Slides® (Objekt-träger)	J2800AMNZ	ThermoFisher Scientific
Methanol 100% (MeOH)	10284580	ThermoFisher Scientific
Microm SEC35™ (Klingen)	152200	ThermoFisher Scientific
Paraplast X-TRA®	P3808-1KG	Sigma-Aldrich®
PAS-Färbekit	HP01.1	Carl Roth® GmbH
Safranin O	S2255-25G	Sigma-Aldrich®
Salzsäure 37% (HCl)	UN1789	ThermoFisher Scientific
Xylol	CN80.5	Carl Roth® GmbH

4 Methoden

4.1 Tierhaltung

4.1.1 Haltung von Mäusen

Alle für dieses Promotionsvorhaben genutzten Mäuse sind in den Zentralen Tierlaboratorien der Universität Regensburg am Standort Vorklinikum in der Barriere-Haltung, unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen (SPF-Haltung), gemäß den Richtlinien der *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA) gehalten worden (Voipio et al. 2008; Guillen 2012). Weiterhin erfolgte die Einhaltung aller tierschutzrechtlichen Vorgaben gemäß dem Tierschutzgesetz und der Tierschutzversuchstierverordnung. Die Haltung und Zucht (s. 4.1.2) der Tiere ist durch die zuständige Überwachungsbehörde (Regierung von Unterfranken) genehmigt (Az.: RUF-55.2.2-2532-2-1205-18, „Zucht und Haltung genetisch-veränderter Tiere: IRAG-KO“).

In den Räumen der Tierhaltung wird ein Lichtprogramm durchgeführt – von 12 Stunden hell im Wechsel zu 12 Stunden dunkel –, um so einen Tag-Nacht-Rhythmus zu simulieren. Die klimatischen Bedingungen werden mittels HEPA-gefilterter Luft reguliert und zeichnen sich durch eine konstante Temperatur von $21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, einer relativen Luftfeuchtigkeit von $50\% \pm 10\%$ und einer Luftwechselrate von $> 8 \text{ AC/h}$ aus. Um den Hygienestatus zu gewährleisten, werden alle Käfige und das dazugehörige Zubehör, Futter, mit Wasser gefüllte Trinkflaschen und die Einstreu autoklaviert in die Barriere-Haltung eingebracht.

Für die Haltung der Tiere werden ausschließlich Filter-Top-Käfige der Kategorie Macro-lon Typ III-Käfig ($425 \text{ mm} \times 265 \text{ mm} \times 180 \text{ mm}$; Maße in $L \times B \times H$) verwendet, mit einer maximalen Belegung von acht Mäusen pro Käfig. Den Tieren steht in den Käfigen Futter und Wasser *ad libitum* zur Verfügung.

4.1.2 Zucht von *Irag1*-defizienten Mäusen

Die Zucht der *Irag1*-defizienten Mäuse erfolgt mit der bereits etablierten transgenen IRAG1-KO Mauslinie. Im Rahmen der Targeting-Strategie ist dabei das Exon 3 deletiert worden. Dies hat eine Frameshift-Mutation zur Folge und führt so zur Generierung von *Irag1*-Knockout (KO) Mausmutanten (Desch et al. 2010).

Für die Zucht der *Irag1*-defizienten Tiere werden Dauerverpaarungen – Einzel- oder Doppelverpaarungen – vorgenommen mit jeweils heterozygoten (Genotyp: *Irag1*^{+/-}) männlichen und weiblichen Mäusen. Bei Einzelverpaarungen befinden sich ein Männchen und ein Weibchen in einem Zuchtkäfig, während sich in den Zuchtkäfigen mit einer Doppelverpaarung ein Männchen und zwei Weibchen befinden. Heterozygote Verpaarungen werden vorgenommen, da mit diesem Zuchtschema Wildtyp-Mäuse (Genotyp: *Irag1*^{+/+}; IRAG1-WT) und *Irag1*-defiziente (Genotyp: *Irag1*^{-/-}; IRAG1-KO) Wurfgeschwister („*litter-matched*“) zu erwarten sind. Die bei diesem Verpaarungsschema geborenen heterozygoten Mäuse (Genotyp: *Irag1*^{+/-}) werden für die Zucht der Mauslinie verwendet. Jeder Wurf eines Zuchtkäfigs wird mit dem Datum des Wurfs und dessen Größe in der Rubrik „Zuchtverwaltung“ in der Software Tierbestand Universität Regensburg (TiBUR) dem entsprechenden Zuchtkäfig zugeordnet und so erfasst.

Mit einem Alter von etwa drei bis vier Wochen wird der Nachwuchs aus den Zuchtkäfigen nach Geschlechtern getrennt abgesetzt und mittels Ohrlochung gekennzeichnet. Das biologische Material, welches bei der Ohrlochung gewonnen wird, wird für die Genotypisierung der Mäuse weiterverwendet (s. 4.2). Die Anzahl der abgesetzten Tiere eines jeden Wurfs wird ebenfalls in TiBUR dokumentiert.

Für die durchgeführten Experimente sind, soweit nicht anders angegeben, 14 Wochen alte männliche und weibliche IRAG1-WT Mäuse und deren IRAG1-KO Wurfgeschwister für den Haemocult®-Test verwendet worden (s. 4.6). Im Alter von 15 Wochen ist dann die Organentnahme (s. 4.3) und Blutabnahme (s. 4.7) erfolgt. Der jeweilige Genotyp ist zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführungen nicht bekannt, um so eine mögliche Verzerrung der Versuchsergebnisse auszuschließen. Erst bei der Auswertung der Ergebnisse der einzelnen Versuchsteile ist eine Zuordnung der Mäuse entsprechend deren Genotypen erfolgt.

Die Verwaltung und Dokumentation der Zuchtlinie erfolgt dabei ausschließlich über die Software TiBUR.

4.1.3 Ermittlung der Wurfdaten und der Lebensdauer der IRAG1-KO Mauslinie

Für die Ermittlung der Wurfdaten – Überlebensrate der Würfe, Verteilung der Geschlechter und der Genotypen sowie das Überleben der IRAG1-WT und IRAG1-KO Tiere – sind die in TiBUR hinterlegten Daten ausgewertet worden. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich über das gesamte Jahr 2019.

Überlebensrate der Würfe der IRAG1-KO Mauslinie

Um die Überlebensrate der Würfe in diesem Zeitraum zu ermitteln, werden in der Rubrik „Zuchtverwaltung“ der Software TiBUR von sämtlichen Zuchtkäfigen die Wurfgröße bei der Geburt und beim Absatz erfasst. Aus den Daten der einzelnen Würfe wird die Gesamtsumme der geborenen und abgesetzten Tiere berechnet. Die Überlebensrate errechnet sich dann wie folgt:

$$\text{Überlebensrate} [\%] = \frac{n_{\text{Absatz}}}{n_{\text{Geburt}}} \cdot 100\%$$

Dabei beschreibt n_{Geburt} die Anzahl der Mäuse zum Zeitpunkt der Geburt und n_{Absatz} die Anzahl der Mäuse, die von den Elterntieren abgesetzt worden sind.

Verteilung der Geschlechter in der IRAG1-KO Mauslinie

Zur Bestimmung der Geschlechtsverteilung werden die abgesetzten männlichen oder weiblichen Mäuse aller Würfe in dem Beobachtungszeitraum aufsummiert und anschließend durch die Gesamtzahl aller abgesetzten Mäuse geteilt. Der Anteil an männlichen oder weiblichen Mäusen berechnet sich dabei folgendermaßen:

$$\text{Anteil}_{\text{Geschlecht}} [\%] = \frac{n_{\text{Geschlecht}}}{n_{\text{ges}}} \cdot 100\%$$

$\text{Anteil}_{\text{Geschlecht}}$ beschreibt den Anteil männlicher oder weiblicher Mäuse an der Gesamtzahl der Tiere in Prozent, während $n_{\text{Geschlecht}}$ die Anzahl männlicher oder weiblicher Mäuse und n_{ges} die Gesamtzahl aller abgesetzten Mäuse beschreibt.

Verteilung der Genotypen in der IRAG1-KO Mauslinie

Für die Ermittlung der Verteilung der Genotypen wird im Beobachtungszeitraum für jeden Genotyp ($\text{Irag1}^{+/+}$, $\text{Irag1}^{+/-}$ und $\text{Irag1}^{-/-}$) die Summe aller abgesetzten männlichen und weiblichen Mäuse berechnet und dann durch die Gesamtzahl aller abgesetzten Mäuse dividiert:

$$\text{Anteil}_{\text{Genotyp}} [\%] = \frac{n_{\text{Genotyp}}}{n_{\text{ges}}} \cdot 100\%$$

Der $\text{Anteil}_{\text{Genotyp}}$ beschreibt dabei den Anteil einer der drei Genotypen in Prozent, während n_{Genotyp} die Anzahl der abgesetzten Mäuse eines der Genotypen und n_{ges} die Gesamtzahl aller abgesetzten Mäuse im Beobachtungszeitraum darstellt.

Bestimmung der Lebensdauer von IRAG1-KO Mäusen im Vergleich zu IRAG1-WT Mäusen

Für die Untersuchung, inwieweit eine *Irag1*-Defizienz die Lebensdauer der Mäuse beeinträchtigt, werden alle IRAG1-WT und IRAG1-KO Mäuse erfasst, die im Beobachtungszeitraum geboren werden und so lange leben, bis sie entweder für Versuchszwecke getötet oder verendet sind. Hierfür wird in TiBUR einmal nach dem Suchkriterium der Austragung „Tötung zu wissenschaftlichen Zwecken“ und „Tier ist verendet“ oder „Tötung aus medizinischen Gründen“ selektiert. Anhand dieser Daten wird mit Hilfe der Software GraphPad Prism 5.0 eine Kaplan-Meier-Kurve erstellt, um so zu ermitteln, ob die *Irag1*-Defizienz einen Einfluss auf die Lebensdauer dieser Mäuse hat.

4.2 Genotypisierung der Versuchstiere

Im Vorfeld der folgenden Versuche ist es notwendig gewesen, dass von allen Tieren der Genotyp bestimmt wird. Wie bereits in 4.1.2 beschrieben, werden die Tiere in einem Alter von etwa drei Wochen abgesetzt und mittels Ohrlochung markiert. Aus dem so gewonnen biologischen Material wird dann für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) die Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*, DNA) isoliert und anschließend zur Identifikation der Genotypen mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

4.2.1 Isolation der DNA aus Ohrbiopsien

Die Isolation der DNA aus den Ohrbiopsien erfolgt im Alkalischen unter Verwendung von Natronlauge, durch die es zur Denaturierung von Peptiden kommt.

Reagenzien

Lysepuffer 10×

Substanz	Menge	[c]
NaOH	1 g	250 mM
EDTA	74 mg	2 mM
ddH ₂ O	ad 100 ml	

Lysepuffer 1×: 1:10 verdünnen

Tris-Puffer pH 5,5 10×

Substanz	Menge	[c]
Tris	4,9 g	400 mM
ddH ₂ O	ad 100 ml	
Lösung auf pH 5,5 einstellen		

Tris-Puffer pH 5,5 1×: 1:10 verdünnen

Durchführung

Es werden 25 µl 1× Lysepuffer in das 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben, in dem sich das biologische Material aus der Ohrstanzung befindet, und dieses für eine Stunde bei 95°C lysiert. Im Anschluss an die Lyse wird der Ansatz mit 25 µl 1× Tris-Puffer pH 5,5 neutralisiert. Gewebeteile, die nicht lysiert worden sind, werden bei 1500 × g abzentrifugiert. Der Überstand, der die DNA enthält, wird in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

4.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Bei der Polymerasen-Kettenreaktion handelt es sich um ein Verfahren zur Vervielfältigung von ausgewählten DNA-Abschnitten (Mullis and Faloona 1987).

Mit diesem Verfahren wird mittels einer DNA-Polymerase ein komplementärer Strang zu dem ausgewählten DNA-Abschnitt (Template) synthetisiert. Das Template wird dabei von zwei Primern eingegrenzt. Die gesamte Reaktion findet dabei in mehreren sich wiederholenden Zyklen statt, welche sich in mehrere Reaktionsschritte unterteilen. Initial kommt es im Rahmen der PCR durch Erhitzen auf 94°C zum Lösen der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren der DNA, so dass die DNA einzelsträngig vorliegt. Der nächste Schritt wird als Annealing – Hybridisierung der Primer – bezeichnet. Dabei hybridisieren die beiden Primer – es handelt sich hierbei um Oligonukleotide – an die bekannten Sequenzen der DNA. Der Forward-Primer hybridisiert dabei an das 3'-Ende des gewünschten DNA-Abschnitts auf dem codierenden DNA-Strang, während der Reverse-Primer an die entsprechende Sequenz des komplementären DNA-Strangs hybridisiert. So markieren beide Primer das zu amplifizierende Template. Die Temperatur während diesem Schritt ist dabei von den verwendeten Primern abhängig. Mit der Elongation wird die PCR abgeschlossen. Dabei synthetisiert eine hitzestabile DNA-Polymerase, ausgehend von den Primern, Komplementärstränge der DNA mit Hilfe der im Reaktionsansatz befindlichen Desoxyribonukleotide (dNTPs). Die notwendige Temperatur bei der Elongation hängt dabei von der verwendeten DNA-Polymerase ab. Dieser gesamte Zyklus wird insgesamt mindestens dreißigmal wiederholt, so dass eine ausreichende Menge des gewünschten DNA-Abschnitts amplifiziert ist.

Reagenzien*dNTP-Mix*

Substanz	Volumen	[c]
ATP 100 mM	100 µl	10 mM
CTP 100 mM	100 µl	10 mM
GTP 100 mM	100 µl	10 mM
TTP 100 mM	100 µl	10 mM
H ₂ O (PCR-grade)	600 µl	

aliquotieren, Lagerung bei -20°C

H₂O (PCR-grade)

ddH ₂ O	1. autoklavieren
	2. sterilfiltrieren

Durchführung

In ein 0,2 ml Reaktionsgefäß wird der Mastermix gemäß dem folgenden Pipettierschema pipettiert:

Substanz	Volumen [µl]
H ₂ O (PCR-grade)	18,8
10× PCR Puffer	2,5
dNTP-Mix	0,5
Primer KS 34f 25 pmol·µl ⁻¹	0,3
Primer KS 42r 25 pmol·µl ⁻¹	0,3
Primer KS 43r 25 pmol·µl ⁻¹	0,3
Taq DNA-Polymerase 5 U·µl ⁻¹	0,3

Zu dem Mastermix werden anschließend je 2 µl der DNA hinzugefügt, deren Genotyp zu bestimmen ist (s. 4.2.1). Zusätzlich werden noch Kontrollproben vorbereitet. Für die Negativkontrolle, die dazu dient eine Verunreinigung der Reagenzien auszuschließen, werden statt der DNA 2 µl H₂O (PCR-grade) zu dem Mastermix pipettiert. Als Positivkontrollen werden jeweils die DNA einer *Iragl*^{+/+}-, einer *Iragl*^{+/-}- und einer *Iragl*^{-/-}-Maus verwendet. Dazu werden 2 µl der jeweiligen DNA in je ein separates 0,2 ml Reaktionsgefäß, das ebenfalls den Mastermix enthält, hinzugefügt.

Die Reaktionsgefäße werden kurz gemischt, zentrifugiert und dann für die PCR in den vorbereiteten Thermocycler gestellt. Folgendes Programm ist dann im Thermocycler gestartet worden:

	Temperatur [°C]	Zeit	Wiederholung
1.	90	Pause	
2.	94	5 min	
3.	94	10 s	30×
4.	56	30 s	
5.	75	5 min	
6.	10	Pause	

Im Anschluss an die PCR können die Reaktionsgefäße aus dem Thermocycler entnommen und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.2.3 Agarose-Gelelektrophorese zur Detektion der DNA

Mit der Gelelektrophorese werden die PCR-Produkte anhand ihrer Größe in einem Agarosegel, an dem ein elektrisches Feld angelegt ist, aufgetrennt. Aufgrund der negativgeladenen Phosphatgruppen wandern die PCR-Produkte in Richtung Pluspol. Da große PCR-Produkte langsamer wandern als kleinere, trennen sie sich somit der Größe nach auf. Durch Zugabe von MIDORI Green, einer Substanz, die mit der DNA interkaliert, kann dann unter UV-Licht die DNA detektiert werden. Um die Größe der PCR-Produkte abschätzen zu können, wird zusätzlich noch ein Größenstandard benötigt, der ebenfalls im Gel aufgetrennt wird.

Reagenzien

Agarosegel 2%

Substanz	Menge	[c]
Agarose	2 g	2%
1× TAE-Puffer	100 ml	

In der Mikrowelle erhitzen

Gelladepuffer 3×

Substanz	Volumen	[c]
Gelladepuffer 6×	750 µl	3×
H ₂ O (PCR-grade)	750µl	

TAE-Puffer 50× pH 8,0

Substanz	Menge	[c]
Tris	242 g	2 M
Essigsäure ($c \geq 99,8\%$)	57,1 ml	5,7%
EDTA 0,5M pH 8,0	100 ml	50 mM
ddH ₂ O	ad 1000 ml	

Lösung mit Essigsäure auf pH 8,0 einstellen

TAE-Puffer 1×: 1:50 verdünnen

Durchführung

Der Ansatz für das Agarosegel wird in einem Erlenmeyerkolben eingewogen und in der Mikrowelle so lange erhitzt, bis die Agarose gelöst ist und unter leichtem Schwenken auf etwa 60°C abgekühlt. Nun werden 5 µl MIDORI Green zu der gelösten Agarose gegeben und der gesamte Ansatz nochmals gut durchmischt. Die flüssige Agarose wird in einen Gelschlitten gegossen und polymerisiert dort aus.

Zu den PCR-Proben und den Kontrollen (s. 4.2.2) werden 5 µl des 3× Gelladepuffers hinzugefügt. Von den Proben und Kontrollen werden jeweils 14 µl in eine Geltasche pipettiert, sowie 14 µl des Größenstandards. Für 35 min wird nun eine Spannung von 150 V angelegt, so dass die Auftrennung der Proben erfolgen kann. Nach Abschluss der Elektrophorese wird das Gel im UV-Transluminator unter UV-Licht ausgewertet.

4.3 Organentnahme

Um die Auswirkungen der *Irag1*-Defizienz auf die Organe untersuchen zu können, werden, soweit nicht anders angegeben, 15 Wochen alte IRAG1-WT und -KO Mäuse untersucht. Zum Zeitpunkt der Organentnahme ist der Genotyp der jeweiligen Maus nicht bekannt.

Reagenzien*PBS 10× pH 7,4*

Substanz	Menge	[c]
KCl	2,0 g	26,83 mM
KH ₂ PO ₄	2,0 g	14,70 mM
NaCl	80,0 g	1,37 M
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	14,34 g	80,58 mM
ddH ₂ O	ad 1000 ml	
Lösung auf pH 7,4 einstellen		

PBS 1×: 1:10 verdünnen

PFA-Lösung 3% pH 7,4

Substanz	Menge	[c]
EGTA	0,38 g	1 mM
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	3,42 g	15mM
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,41 g	2 mM
NaCl	5,37 g	90 mM
Saccharose	34,2 g	100 mM
ddH ₂ O	ad 1000 ml	
PFA	30 g	3%
Lösung auf pH 7,4 einstellen		

Durchführung

Von jeder Maus wird das Körpergewicht bestimmt und diese anschließend mittels Inhalation von Kohlenstoffdioxid getötet. Sobald der Tod eingetreten ist, erfolgt die Blutabnahme durch Punktion des retrobulbären Plexus (s. 4.7.1).

Im Anschluss an die Blutabnahme wird die Maus fixiert und mittels eines Hautschnittes Thorax und Abdomen eröffnet, um Milz, Leber, Duodenum, Magen und Colon entnehmen zu können. Die Organe werden mit einem Skalpell in drei gleich große Stücke geteilt. Organe des Gastrointestinaltraktes werden außerdem in 1× PBS gewaschen und gespült. Anschließend werden die Gewebe entsprechend der weiteren Versuchsplanung gelagert. Für Bestimmungen auf RNA-Ebene werden die Organe in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, das 500 µl *RNAlater*TM enthält, für 24 h bei 4°C und dann bis zur weiteren Verwendung (s. 4.4) bei -80°C gelagert. Zur Bestimmung der Proteinexpression vorgesehene Organstücke werden in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C aufbewahrt (s. 4.5). Die für die histologischen Untersuchungen genutzten Gewebestücke von Milz und Duodenum werden in ein mit 1000 µl 3% PFA-Lösung gefülltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, für 24 h bei 4°C im Kühlschrank inkubiert und dann bis zur weiteren Nutzung (s. 4.8) in einem mit 10 ml 70% MeOH gefüllten 15 ml konischen Zentrifugenröhrchen bei 4°C gelagert.

Um das Verhältnis aus Milzgewicht zu Körpergewicht der jeweiligen Mäuse zu bestimmen, werden die einzelnen Milzstücke gewogen und anschließend das Gesamtgewicht der Milz berechnet.

4.4 RNA-Analytik

Mit Hilfe der quantitativen Echtzeit PCR oder auch als quantitative real time Polymerasekettenreaktion (*quantitative real time polymerase chain reaction*) (qRT-PCR) bezeichnet, kann die Menge an exprimierter Boten-Ribonukleinsäure (*messenger ribonucleic acid*, mRNA) eines bestimmten Gens analysiert werden. Dazu muss die mRNA aus Zellen oder Gewebe isoliert werden, um im Anschluss mit einer reversen Transkriptase in die komplementäre DNA (*complementary DNA*, cDNA) umgeschrieben zu werden. Auf die Synthese der cDNA folgt dann die PCR, bei der ein bestimmter cDNA-Abschnitt vervielfältigt und quantifiziert wird.

Mit dieser Methode sind Gewebeproben von Colon, Milz und Magen (s. 4.3) auf die mRNA-Expression verschiedener Gene hin untersucht worden. Die Durchführung der gesamten RNA-Analytik erfolgt gemäß dem internen Protokoll der Arbeitsgruppe (Schramm et al. 2019).

4.4.1 Isolierung von RNA

Die Isolation der RNA erfolgt mit Hilfe der Guanidiumthiocyanat-Phenol-Chloroform Extraktion (Chomczynski and Sacchi 1987; Chomczynski and Sacchi 2006).

Für die Isolation wird PeqGOLD TriFast™ verwendet, das Guanidiumthiocyanat und Phenol gebrauchsfertig enthält. Die Funktion des Guanidiumthiocyanats besteht darin die Zellen zu lysieren und RNAsen zu inaktivieren, während das enthaltene Phenol die RNA löst. Chloroform wird verwendet, um das Zellysate in seine Phasen zu trennen. Die gelöste RNA befindet sich dann in der wässrigen Phase, während sich in der organischen Phase die gelösten Proteine befinden.

Reagenzien

DEPC-H₂O

Substanz	Volumen
DEPC	1 ml
ddH ₂ O	1000 ml

nach 24 h autoklavieren

Durchführung

Das bisher bei -80°C gelagerte Gewebestück (s. 4.3) wird aus dem *RNAlater*TM entnommen und in ein 4,5 ml PPN-Röhrchen überführt und 1000 μl PeqGOLD TriFastTM hinzugefügt. Unter Zuhilfenahme des Ultra-Turrax[®] wird das Gewebestück homogenisiert und für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 200 μl Chloroform wird das Homogenat für mindestens 15 s kräftig geschüttelt, für weitere drei Minuten inkubiert und für mindestens 30 min bei 4°C mit $4000 \times g$ zentrifugiert. Durch die Zentrifugation kommt es zur Phasentrennung, wobei sich die RNA in der oberen wässrigen Phase befindet. Die obere Phase wird abpipettiert, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 500 μl 100% Isopropanol gefällt. Der Ansatz wird für zehn Minuten bei 4°C inkubiert und für mindestens 15 min mit $18000 \times g$ bei 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird das RNA-Pellet gewaschen. Hierzu wird der Überstand verworfen und das RNA-Pellet durch Zugabe von 1 ml 70% EtOH resuspendiert und erneut für mindestens 15 min mit $18000 \times g$ bei 4°C zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wird das Pellet für etwa zehn Minuten an der Luft getrocknet und zum Abschluss durch Zugabe von etwa 500 μl DEPC-H₂O gelöst. Im Anschluss wird die Konzentration der isolierten RNA bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260\text{nm}$ bestimmt. Die isolierte RNA wird dann bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

4.4.2 Synthese der cDNA

Um mittels qRT-PCR die mRNA des zu untersuchenden Gens zu amplifizieren und quantifizieren, muss die isolierte RNA (s. 4.4.1) zuerst in cDNA umgeschrieben werden. Für diesen Schritt nutzt man die reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR). Mit Hilfe einer reverse Transkriptase (RT) wird dabei aus dem RNA-Strang die entsprechende cDNA synthetisiert. Bei der reversen Transkriptase handelt es sich dabei um eine RNA-abhängige DNA-Polymerase.

Reagenzien

<i>DEPC-H₂O</i>		<i>Mastermix</i>	
Substanz	Volumen	Substanz	Volumen
DEPC	1 ml	dNTP 2,5 mM	4,0 µl
ddH ₂ O	1000 ml	M-MLV RT 5× buffer	4,0 µl
nach 24 h autoklavieren		DEPC-H ₂ O	2,5 µl
		RNAasin®	0,5 µl
		M-MLV RT	1,0 µl

Durchführung

In einem 0,2 ml Reaktionsgefäß werden 2 µg RNA mit DEPC-H₂O auf ein Gesamtvolumen von 9 µl verdünnt, anschließend werden 1 µl der oligo dT-Primer ($c = 0,5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) hinzugefügt. Der Ansatz wird für fünf Minuten bei 65°C im Thermocycler inkubiert, damit sich die Primer an den RNA-Strang anlagern können. Nach dem Anlagern der Primer wird das Reaktionsgefäß auf Eis gestellt und 12 µl des Mastermixes dem Ansatz hinzugegeben. Das Reaktionsgefäß wird kurz gemischt und zentrifugiert, bevor es in den Thermocycler für die Synthese der cDNA gestellt wird. Die Dauer der Synthese beträgt eine Stunde bei einer Temperatur von 37°C und wird durch ein zweiminütiges Erhitzen auf 95°C beendet. Im Anschluss kann die synthetisierte cDNA bei -20°C bis zur weiteren Nutzung gelagert werden.

4.4.3 Quantitative Real-Time-PCR

Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) ist eine Weiterentwicklung der PCR, bei der es zusätzlich möglich ist, dass die Menge der amplifizierten DNA in jedem Zyklus bestimmt werden kann. Hierzu wird der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green verwendet, der mit der doppelsträngigen DNA interkaliert. Durch die Bindung an die DNA wird die Intensität des Fluoreszenzsignals des gebundenen SYBR Greens um den Faktor 1000 gesteigert, im Vergleich zu dem ungebunden vorliegenden SYBR Green (Jiang et al. 2014). Nach jedem Zyklus nimmt der Gehalt des PCR-Produkts exponentiell zu, weshalb während jedem Zyklus eine Messung des Fluoreszenzsignals erfolgt. Es kann aber nicht angenommen werden, dass die eingesetzte Menge an RNA zu der synthetisierten Menge an cDNA proportional ist. Aus diesem Grund

wird auch die mRNA-Expression eines Referenzgens („Housekeeper“) bestimmt, auf welches im Rahmen der Auswertung normiert wird.

Reagenzien

Primer Mix

Substanz	Volumen	[c]
Forward-Primer 100 μ M	15 μ l	5 μ M
Reverse-Primer 100 μ M	15 μ l	5 μ M
H ₂ O (PCR-grade)	270 μ l	

SYBR Green I Mastermix 1 \times

Substanz	Volumen	[c]
SYBR Green I Mastermix	10 μ l	1 \times
Primer Mix	2 μ l	
H ₂ O (PCR-grade)	6 μ l	

Durchführung

Der Reaktionsansatz wird in einer 96-Loch Mikrotiterplatte vorbereitet. Es werden 18 μ l des 1 \times SYBR Green I Mastermix in eine Vertiefung der Lochplatte pipettiert und 2 μ l cDNA hinzugefügt. Für die Standardverdünnungen (unverdünnt, 1:10, 1:100, 1:1000) wird analog vorgefahren. Hier werden aber statt 2 μ l der cDNA 2 μ l der jeweiligen Standardverdünnung in die Vertiefung pipettiert. Diese werden für jedes zu amplifizierende Gen von einer bekannten Probe angefertigt. Die Negativkontrolle enthält statt cDNA 2 μ l H₂O (PCR-grade), um zu überprüfen, ob die Reagenzien verunreinigt sind.

Die PCR wird anschließend mit dem Roche Lightcycler[®] 480 System (Lehrstuhl Prof. Dr. A. Kurtz, Institut für Physiologie) nach dem folgenden Programm durchgeführt:

	Temperatur [°C]	Zeit	Wiederholung
1.	95	10 min	
2.	95	15 s	45 \times
3.	58	15 s	
4.	75	20 s	

Als Housekeeper ist für sämtliche Analysen das Gen *Gapdh* verwendet worden, welches für die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) codiert.

Berechnung

Die Auswertung erfolgt über die absolute Konzentration der mRNA einer jeden Probe (Schramm et al. 2019). Dazu wird aus den Ct-Werten der eingesetzten Standards eine Kalibriergerade für jedes amplifizierte Gen erstellt. Für jede Probe wird über die entsprechenden Ct-Werte die Konzentration der mRNA berechnet. Dies wird sowohl für die zu untersuchenden Gene als auch für den Housekeeper durchgeführt. Abschließend wird dann für jede Probe die mRNA-Konzentration des zu untersuchenden Gens durch die mRNA-Konzentration des Housekeepers dividiert.

4.5 Proteinbiochemische Methoden

4.5.1 Proteinisolation aus murinem Gewebe

Reagenzien

Benzamidin (100 mM)

Substanz	Menge	[c]
Benzamidin-HCl·2H ₂ O	15,7 mg	100 mM
ddH ₂ O (autoklaviert)	ad 1 ml	

PMSF (200 mM)

Substanz	Menge	[c]
PMSF	174,2 mg	200 mM
Isopropanol 100% p.a.	ad 5 ml	

Lubrolpuffer 2% pH 8,0 (Stammlösung)

Substanz	Menge	[c]
Lubrol	2,0 g	2%
NaCl	877 mg	150 mM
Tris	243 mg	20 mM
ddH ₂ O (autoklaviert)	ad 100 ml	
Lösung auf pH 8,0 einstellen, Lagerung bei 4°C		

Leupeptin (1 mg·ml⁻¹)

Substanz	Menge	[c]
Leupeptin·0,5H ₂ SO ₄	1 mg	1 mg·ml ⁻¹
ddH ₂ O (autoklaviert)	ad 1 ml	

PhosSTOP 20×

Substanz	Menge	[c]
PhosSTOP™	1 Tablette	20×
ddH ₂ O (autoklaviert)	ad 500 µl	

Lubrolpuffer 2% (Proteinisolation)

Substanz	Menge	[c]
Benzamidin 100 mM	50 µl	1 mM
Leupeptin 1 mg·ml ⁻¹	2,5 µl	0,5 mg·ml ⁻¹
PhosSTOP 20×	250 µl	1×
PMSF 200 mM	7,5 µl	300 µM
Lubrolpuffer (Stammlsg.)	ad 5 ml	

Durchführung

Für die Isolation von Proteinen aus murinem Gewebe werden in das 2,0 ml Reaktionsgefäß, in welchem sich das Gewebestück befindet (s. 4.3), 350 µl 2% Lubrolpuffer pH 8,0 (Proteinisolation) hinzugefügt. Das Gewebe wird im Reaktionsgefäß mit dem Ultra-Turrax® auf Eis homogenisiert. Durch langsames Steigern der Drehzahl wird verhindert, dass sich das Gewebe im Zahnkranz verfängt und so nicht vollständig homogenisiert wird. Anschließend wird das Reaktionsgefäß für 15 min mit $18000 \times g$ bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Das Proteinlysate für die Verdünnungen zur Bestimmung der Proteinkonzentration (s. 4.5.2) wird vor dessen Aliquotierung entnommen.

4.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry

Die Proteinbestimmung wird nach der von Lowry et al. (1951) entwickelten Methode in einer leicht modifizierten Form durchgeführt (Peterson 1977, 1979). Es handelt sich dabei um eine sehr sensitive Messmethode, so dass auch geringe Proteinkonzentrationen bestimmt werden können. Die Gesamtreaktion beruht dabei auf zwei Reaktionsschritten. Bei dem ersten Reaktionsschritt kommt es zur Bildung eines blau-violetten Komplexes zwischen den Peptidbindungen des Proteins und den Cu^{2+} -Ionen der alkalischen Lösung. Dies entspricht dem Prinzip der Biuretreaktion. Im zweiten Schritt werden die Cu^{2+} -Ionen zu Cu^{1+} -Ionen reduziert. Die Cu^{1+} -Ionen reduzieren dann das Folin-Ciocalteu-Reagenz – dabei handelt es sich um Molybdän(VI)- und Wolfram(VI)-Heteropolysäuren – zu Molybdänblau, mit der Folge, dass sich eine intensive Blaufärbung ausbildet. Zur Quantifizierung der Proteinmenge kann dann die Blaufärbung unter anderem bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595\text{nm}$ photometrisch vermessen werden. Mit Hilfe einer – aus verschiedenen konzentrierten BSA-Standards hergestellten Kalibriergerade – kann dann die Proteinkonzentration der jeweiligen Probe bestimmt werden.

Die Durchführung erfolgte analog zu den Herstellerangaben des DC™ Protein Assay Kits I.

Reagenzien

Probe (1:16)

Substanz	Volumen	[c]
Proteinlysate	5 µl	1:16
ddH ₂ O	ad 80 µl	

Probe (1:32)

Substanz	Volumen	[c]
Proteinlysate	5 µl	1:32
ddH ₂ O	ad 160 µl	

Reagenz A'

Substanz	Volumen
Reagenz A	1 ml
Reagenz S	20 μ l

Durchföhrung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Gewebehomogenate (s. 4.5.1) erfolgt mit Hilfe einer Standardgeraden aus Rinderserumalbumin (BSA). Die verschiedenen BSA-Standards ($125 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $750 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) und die Verdünnungen der Proteinlysate werden entsprechend den Pipettierschemata hergestellt. In ein 1,5 ml Reaktionsgefäß werden 10 μ l der jeweiligen Probenverdünnungen oder der BSA-Standards vorgelegt. Ein weiteres 1,5 ml Reaktionsgefäß wird mit 10 μ l ddH₂O befüllt und dient bei der späteren Vermessung als Nullabgleich („Blank“). Von dem Reagenz A' werden 50 μ l in jedes der 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert und diese gut gemischt. Abschließend werden 400 μ l Reagenz B zu den Proben und den BSA-Standards hinzugefügt und diese nochmals gut durchmischt. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur werden die BSA-Standards in aufsteigender Konzentration und die Proben bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595\text{nm}$ photometrisch vermessen.

Berechnung

Aus den gemessenen Extinktionen der BSA-Standards wird in Abhängigkeit zu deren Konzentrationen eine Kalibriergerade erstellt. Über diese Kalibriergerade kann dann anhand der gemessenen Extinktion einer Probe deren Proteinkonzentration berechnet werden. Da die Konzentrationsbestimmung einer jeden Probe mit zwei verschiedenen Verdünnungen durchgeführt wird, werden abschließend die beiden berechneten Konzentrationen gemittelt.

4.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit der von Laemmli (1970) entwickelten SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine anhand ihrer Größe in einem elektrischen Feld aufgetrennt und charakterisiert werden. Zur Auftrennung der Proteine werden Polyacrylamidgele verwendet, wobei zwei Gele hergestellt werden. Ein Trenngel, dessen Funktion in der Auftrennung der Proteine liegt und ein über dem Trenngel befindliches Sammelgel. Die Funktion des Sammelgels liegt in der Aufkonzentrierung der Probe. Hergestellt werden die Gele durch Polymerisation von

Acrylamid und Bisacrylamid unter der Zugabe des Radikalstarters Ammoniumperoxodisulfat (APS). Zusätzlich enthalten die Gele SDS, welches die Aufgabe hat die Ladung der Proteine zu maskieren und so dafür sorgt, dass die Proteine negativ geladen sind. Im Trenngel ist zusätzlich noch Trichlorethanol enthalten. Bestrahlt man das Gel am Ende der Elektrophorese mit UV-Licht, so werden die Indolreste der in den Proteinen enthaltenen Aminosäure Tryptophan durch den enthaltenen Trichlorethanol halogeniert. Dies ermöglicht für die spätere Quantifizierung, dass das zu untersuchende Protein auf die Gesamtmenge an aufgetragenem Protein einer Probe normiert werden kann. So muss kein Housekeeper-Protein verwendet werden, was eventuellen Schwankungen unterliegen könnte (Ladner et al. 2004; Ladner et al. 2014). Vor der Elektrophorese werden die Proben (s. 4.5.1) mit 6× Laemmli und Lysepuffer so eingestellt, dass der Proteingehalt $50 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ beträgt und der 6× Laemmli nur noch einfach konzentriert vorliegt. Der Laemmli-Puffer enthält Dithiothreitol (DTT), das zur Denaturierung der Proteine dient, indem es die Disulfidbrücken der Proteine spaltet. Das im Laemmli-Puffer enthaltene Bromphenolblau dient bei der Elektrophorese zur Visualisierung der Lauffront. Für die Untersuchung von Proteinen mit einer kleinen Molekülmasse werden statt SDS-Gele Tricin-SDS-Gele verwendet.

Reagenzien

30% AA + 0,2% BisAA (m/V) (SDS-Gel)

Substanz	Menge	[c]
AA 40%	75 ml	30%
BisAA	0,2 g	0,2%
ddH ₂ O	ad 100 ml	

24,25% AA + 0,75% BisAA (m/V) (Tricin-Gel)

Substanz	Menge	[c]
AA 40%	60,06 ml	24,25%
BisAA	0,75 g	0,75%
ddH ₂ O	ad 100 ml	

Tris-Puffer (0,6 M) pH 6,8 (SDS-Sammelgel)

Substanz	Menge	[c]
Tris	60 g	0,6 M
SDS 10%	40 ml	0,4%
ddH ₂ O	ad 1000 ml	

Lösung auf pH 6,8 einstellen

Tris-Puffer (1,8 M) pH 8,8 (SDS-Trenngel)

Substanz	Menge	[c]
Tris	182 g	1,8 M
SDS 10%	40 ml	0,4%
ddH ₂ O	ad 1000 ml	

Lösung auf pH 8,8 einstellen

4 Methoden

Gel-Puffer pH 8,45 (Tricin-Gel)

Substanz	Menge	[c]
Tris	181,7 g	3 M
SDS 10%	15 ml	0,3%
ddH ₂ O	ad 500 ml	

Lösung auf pH 8,45 einstellen

Running Buffer 10× pH 8,3 (SDS-Gel)

Substanz	Menge	[c]
Tris	30,0 g	0,25 M
Glycin	144,0 g	1,92 M
SDS	10,0 g	1%
ddH ₂ O	ad 1000 ml	

Lösung auf pH 8,3 einstellen

Running Buffer 1×: 1:10 verdünnen

Running Buffer 10× pH 8,25 (Kathode) (Tricin-Gel)

Substanz	Menge	[c]
Tris	121,0 g	1 M
Tricin	179 g	1 M
SDS	10,0 g	1%
ddH ₂ O	ad 1000 ml	

Lösung auf pH 8,25 einstellen

Running Buffer 1× (Kathode):
1:10 verdünnen

Laemmli-Puffer 6×

Substanz	Menge
4×Tris-SDS-Puffer pH6,8	7,0 ml
Glycerin	3,6 ml
SDS	1,0 g
DTT	0,93 g
Bromphenolblau	1,2 mg
ddH ₂ O	ad 10 ml

Running Buffer 10× pH 8,9 (Anode) (Tricin-Gel)

Substanz	Menge	[c]
Tris	242,0 g	2 M
ddH ₂ O	ad 1000 ml	

Lösung auf pH 8,9 einstellen

Running Buffer 1× (Anode): 1:10 verdünnen

Sammelgel 5% (SDS-Gel)

Substanz	Volumen
ddH ₂ O	3,6 ml
Tris-Puffer (Sammelgel)	500 µl
30% AA + 0,2% BisAA	830 µl
SDS 10%	50 µl
TEMED	10 µl
APS 10%	50 µl

Trenngel 11,5% (SDS-Gel)

Substanz	Volumen
ddH ₂ O	6,5 ml
Tris-Puffer (Trenngel)	3,6 ml
Trichlorethanol	255 µl
30% AA + 0,2% BisAA	6,5 ml
SDS 10%	167 µl
TEMED	20 µl
APS 10%	200 µl

Spacergel (Tricin-Gel)

Substanz	Volumen
ddH ₂ O	1,3 ml
Gel-Puffer (Tricin-Gel)	1,6 ml
Trichlorethanol	74 µl
24,25%AA + 0,75%BisAA	2 ml
TEMED	6 µl
APS 10%	20 µl

Sammelgel (Tricin-Gel)

Substanz	Volumen
ddH ₂ O	3,7 ml
Gel-Puffer (Tricin-Gel)	1,55 ml
24,25%AA + 0,75%BisAA	1 ml
TEMED	12 µl
APS 10%	60 µl

Trenngel (Tricin-Gel)

Substanz	Volumen
Tris-Puffer (Trenngel)	5 ml
Glycerin	2 ml
Trichlorethanol	257 µl
24,25%AA + 0,75%BisAA	10 ml
TEMED	14 µl
APS 10%	90 µl

Durchführung

Herstellung der Gele

Zur Vorbereitung für das Gießen der Gele wird zuerst die Gießvorrichtung zusammengesetzt. Hierfür werden zwei Glasplatten in eine Kassette eingespannt, so dass zwischen den beiden Glasplatten ein Spalt bleibt und der Boden der Gießvorrichtung wird mit kleinen Gummimatten ausgelegt. Für die Herstellung der SDS-Gele wird die Mischung für das Trenngel entsprechend der Rezeptur vorbereitet und zügig in den Spalt zwischen den Glasplatten gegossen. Damit das Gel eine glatte Oberfläche besitzt, wird es mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Gels wird der Isopropanol entfernt, die Grenzfläche kurz getrocknet und dann das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. In das noch flüssige Sammelgel wird ein Kamm eingesetzt. Durch diesen Kamm entstehen die Taschen, in die dann die Proben eingefüllt werden.

Die Herstellung der SDS-Tricin-Gele verläuft analog. Es wird ebenfalls zuerst das Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Die Höhe des Trenngels sollte dabei etwa zwei Drittel der Höhe der Glasplatten entsprechen. Nach der Polymerisation und dem Entfernen des Isopropanols, wird dann das Spacergel gegossen. Die Höhe des Spacergels beträgt dabei etwa zwei Zentimeter. Auch dieses Gel wird mit Isopropanol überschichtet. Abschließend wird das Sammelgel gegossen.

Vorbereitung der Proben

Die Proben werden mit 6× Laemmli und Lysepuffer auf einen Proteingehalt von $50 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ eingestellt und gut gemischt. Anschließend werden diese für zehn Minuten bei 95°C denaturiert.

Gelelektrophorese

Die gegossenen Gele werden in die Elektrode eingespannt und der Bereich zwischen den Gelen mit 1× Running Buffer komplett aufgefüllt, nachdem die Kämmen vorsichtig entfernt worden sind. Anschließend werden die Gele beladen und die Elektrode in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Elektrophoresekammer wird ebenfalls mit 1× Running Buffer komplett befüllt und mit einem Deckel verschlossen, über den eine Verbindung zu einer Spannungsquelle besteht. Über die gesamte Dauer der Elektrophorese wird eine Spannung von 120 V angelegt. Der Verlauf und die Dauer der Elektrophorese ist abhängig von den zu untersuchenden Proteinen. Er kann an den farbigen Fragmenten des mit aufgetragenen Proteinstandards abgelesen werden. Für die Tricin-SDS-Gele wird prinzipiell analog verfahren. Der Bereich, der sich zwischen den beiden Gelen befindet, wird mit 1× Kathodenpuffer aufgefüllt und die Elektrophoresekammer mit 1× Anodenpuffer. Bei der Elektrophorese wird anfänglich eine Spannung von 30 V angelegt, die nach 30 min auf 150 V erhöht wird.

Nach Abschluss der Elektrophorese werden die Gele aktiviert, indem sie im ChemiDoc™ MP Imaging System kurz mit UV-Licht bestrahlt werden. Dabei werden die Indolreste der Aminosäure Tryptophan halogeniert.

4.5.4 Western Blot

Mit Hilfe des Western Blots können die in einem Gel aufgetrennten Proteinbanden auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen werden, um diese anschließend mittels Antikörper zu identifizieren. Beim Semi-Dry Blot wird das Gel zwischen zwei Elektroden

positioniert und ein Strom angelegt. Durch den Strom werden die Proteine aus dem Gel horizontal auf die PVDF-Membran übertragen und auf dieser immobilisiert (Kyhse-Andersen 1984). Das Proteinmuster, welches durch die Gelelektrophorese entstanden ist, bleibt dabei erhalten. Nach Abschluss des Transfers wird die Membran mittels Milchpulver-Lösung (5% Milchpulver-1× TBST) blockiert, um bei der anschließenden Immundetektion unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern.

Reagenzien

Anodenpuffer-1 pH 10,4

Substanz	Menge	[c]
Tris	36,3 g	0,3 M
MeOH 100%	200 ml	20%
ddH ₂ O	ad 1000 ml	
Lösung auf pH 10,4 einstellen		

Anodenpuffer-2 pH 10,4

Substanz	Menge	[c]
Tris	3,6 g	3,0 mM
MeOH 100%	200 ml	20%
ddH ₂ O	ad 1000 ml	
Lösung auf pH 10,4 einstellen		

Antikörper (AK)-Verdünnungslösung

Substanz	Menge	[c]
BSA	3,0 g	3%
NaN ₃ 10%	500 µl	0,05%
TBST 1×	ad 100 ml	

Kathodenpuffer pH 7,6

Substanz	Menge	[c]
Tris	3,0 g	25 mM
6-Aminocapronsäure	5,8 g	44,21 mM
MeOH 100%	200 ml	20%
ddH ₂ O	ad 1000 ml	
Lösung auf pH 7,6 einstellen		

Milchpulver 1%-1× TBST

Substanz	Menge	[c]
Milchpulver	5,0 g	1%
TBST 1×	ad 500 ml	

Primärantikörper-Lösung

Substanz	Volumen
Primärantikörper	x µl
AK-Verdünnungslösung	ad 5ml

Milchpulver 5%-1× TBST

Substanz	Menge	[c]
Milchpulver	12,5 g	5%
TBST 1×	ad 250 ml	

4 Methoden

Ponceau-Lösung 0,2% (m/V)

Substanz	Menge	[c]
Ponceau S	1,0 g	0,2%
Trichloresigsäure	10 g	2%
ddH ₂ O	ad 500 ml	

Stripping-Lösung

Substanz	Volumen
NaOH 1 M	20 ml
DTT 100 mM	64,82 µl
SDS 10%	64,82 µl
ddH ₂ O	ad 200 ml

TBST 1×

Substanz	Volumen	[c]
TBS 10×	100 ml	1×
Tween [®] 20	1 ml	0,1%
ddH ₂ O	ad 1000 ml	

Sekundärantikörper-Lösung

Substanz	Volumen
Sekundärantikörper	x µl
Milchpulver 1%-TBST1×	ad 50 ml

TBS 10× pH 7,6

Substanz	Menge	[c]
Tris	24,23 g	200 mM
NaCl	80 g	1,37 M
ddH ₂ O	ad 1000 ml	

Lösung auf pH 7,6 einstellen

Durchführung

Im ersten Schritt werden die benötigten Filterpapiere eingeweicht und die PVDF-Membran aktiviert. Dafür wird die PVDF-Membran für höchstens 20 s in 100% MeOH und anschließend für maximal 2 min in demineralisiertes Wasser getaucht. Bis zur weiteren Verwendung wird die PVDF-Membran in Anodenpuffer-2 gelegt. Die Anodenplatte wird leicht mit Anodenpuffer-1 angefeuchtet und es wird eine Lage aus drei Filterpapieren, die zuvor in Anodenpuffer-1 eingelegt worden sind, auf die Anodenplatte gelegt. Es folgt dann eine Lage aus zwei Filterpapieren, die in Anodenpuffer-2 eingelegt waren. Auf den Stapel mit den Filterpapieren wird nun die befeuchtete PVDF-Membran gelegt. Das Gel wird anschließend vorsichtig auf der PVDF-Membran positioniert und mit einer Lage aus fünf Filterpapieren bedeckt. Diese Filterpapiere sind zuvor in Kathodenpuffer eingelegt gewesen. Zum Abschluss wird die mit Kathodenpuffer befeuchtete Kathodenplatte auf das Filterpapier gelegt. Die beiden Elektroden werden mit der

Stromquelle verbunden und der Strom fließt für eine Stunde. Da der Blot gleichzeitig mit mehreren Gelen durchgeführt werden kann, gilt für die Gesamtstromstärke:

$$I_{ges} = 60mA \cdot n$$

Dabei ist I_{ges} die Gesamtstromstärke in [mA] und n die Anzahl der Gele, mit denen der Blot gleichzeitig durchgeführt wird.

Nach dem Transfer wird die PVDF-Membran aus der Apparatur genommen und mit Hilfe des ChemiDoc™ MP Imaging System eine Aufnahme des Totalproteins, also aller transferierten Proteine, aufgenommen. Es folgt eine kurze Färbung der PVDF-Membran in der Ponceau-Lösung. Diese reversible Färbung dient dazu, dass die Membran optimal zugeschnitten werden kann, damit sich alle zu detektierenden Proteine auf den einzelnen Membranstücken befinden. Um unspezifische Bindungsstellen auf der PVDF-Membran zu blockieren, wird diese für zwei Stunden in 5% Milchpulver-1× TBST auf dem Schüttler inkubiert und anschließend dreimal fünf Minuten in 1× TBST gewaschen. Die Membranstücke werden dann in der entsprechenden Primärantikörper-Lösung auf einem Rollenmischer über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am folgenden Tag werden die Membranstücke für dreimal fünf Minuten in 1% Milchpulver-1× TBST gewaschen. Es folgt dann eine zweistündige Inkubation in der entsprechenden Sekundärantikörper-Lösung unter kontinuierlichem Schütteln bei Raumtemperatur. Im Anschluss an die Inkubation werden die Membranstücke dreimal je fünf Minuten in 1× TBST gewaschen, um den überschüssigen Sekundärantikörper zu entfernen.

Die Detektion erfolgt mittels Chemolumineszenz. Hierzu ist an das F_c-Fragment des Sekundärantikörpers das Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt. Die HRP dient dabei als Katalysator indem sie Luminol in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid oxidiert. Die dabei entstehende Chemolumineszenz kann detektiert werden. Dazu wird das Membranstück mit einem Präzisionswischtuch leicht getrocknet und auf eine Kopierfolie gelegt. Anschließend wird es mit dem Clarity™ Western ECL Substrat benetzt, mit einer weiteren Folie bedeckt und für zwei Minuten im Dunkeln inkubiert. Die Detektion der Proteine erfolgt dann mit dem ChemiDoc™ MP Imaging System und der Software Image Lab™ 6.1.

Strippen

Um weitere auf einem Membranstück befindliche Proteine detektieren zu können, wird dieses zweimal für fünf Minuten mit 1× TBST gewaschen. Anschließend erfolgt eine Inkubation für 20 min in der Stripping-Lösung unter andauerndem Schütteln. Dabei werden die an die Proteine gebundenen Primär- und Sekundärantikörper abgelöst. Der Vorgang ist mit einem erneuten zweimaligen Waschen mit 1× TBST für je fünf Minuten beendet. Es erfolgt dann wieder eine

zweistündige Inkubation in 5% Milchpulver-1× TBST. Alle folgenden Schritte sind ab diesem Punkt analog zu den bisher beschriebenen.

4.6 Haemocult®-Test

Der Nachweis von okkultem Blut im Stuhl erfolgt mittels des Haemocult®-Tests der Firma Beckman Coulter, Inc. und basiert auf dem Guajak-Test nach Greeger (Greeger 1967).

Es handelt sich dabei um eine biochemische Reaktion zum makroskopischen Nachweis von okkultem Blut im Stuhl. Das Testprinzip beruht darauf, dass eine kleine Stuhlprobe auf ein Filterpapier gestrichen wird, das mit Guajak-Harz imprägniert ist und anschließend – nach mindestens 48-stündiger Trocknung bei Raumtemperatur – mit Wasserstoffperoxid-Lösung betropft wird. Ist die Probe positiv auf okkultes Blut, so kommt es zu einer Blaufärbung des Filterpapiers aufgrund der Pseudoperoxidasewirkung des Häm-Rests im Hämoglobin. Dabei oxidiert das Wasserstoffperoxid – katalysiert durch das als Pseudoperoxidase fungierende Hämoglobin – die im Guajakharz enthaltene phenolische α -Guajakonsäure zu Guajakblau, einem hochkonjugierten Chinon (s. Abbildung 4.1) (Kratochvil et al. 1971).

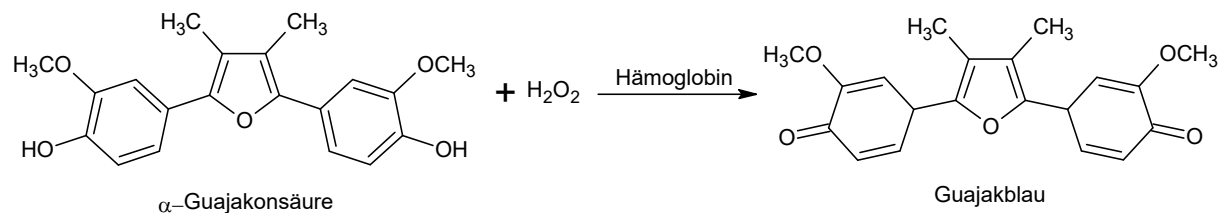


Abbildung 4.1: Reaktionsgleichung zur Bildung von Guajakblau.

Die α -Guajakonsäure reagiert mit dem Hämoglobin durch Zugabe von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) zu Guajakblau, welches dann durch eine blaue Verfärbung des Filterpapiers zu erkennen ist.

Die Sensitivität des Tests wird durch eine Hämorrhoidalblutung nicht beeinflusst oder verfälscht, da das Hämoglobin in unverletzten Erythrozyten der beschriebenen Reaktion nicht zur Verfügung steht. Der Test gilt laut Hersteller als positiv auf okkultes Blut, sobald eines der beiden Testfelder eines Testbriefs eine Blaufärbung zeigt. Die Herstellerangaben zur Auswertung beziehen sich auf humane Proben, da ein Nachweis von okkultem Blut den Ausschluss eines möglichen Kolonkarzinoms zur Folge hat. Dieses Auswertungsprinzip findet auch in der vorliegenden Arbeit Anwendung.

Der Haemocult®-Test wird – mit kleineren Modifikationen bedingt durch die Mäuse – analog zur Gebrauchsanweisung des Herstellers durchgeführt. Die Modifikationen orientieren sich dabei an Angermeier et al. (2016).

Durchführung

Für die Sammlung der Kotprobe wird die Maus aus ihrem Käfig genommen und über eine geöffnete Petrischale gehalten, um so den Kot aufzufangen, der während diesem Vorgang ausgeschieden wird. Die Sammlung des Kotes erfolgt so lange, bis eine entsprechende Menge gesammelt worden ist, die für beide Felder des Testbriefs ausreicht. Der Kot wird anschließend mit dem beiliegenden Spatel auf eines der beiden Felder des Testbriefs überführt und dort ausgestrichen. Dieser Vorgang wird dann für das zweite Feld des Tests wiederholt und dabei der zweite beiliegende Spatel verwendet. An den zwei darauffolgenden Tagen wird die Probenentnahme nochmals wiederholt.

Um den Haemocult[®]-Tests auswerten zu können, muss der Testbrief mindestens 48 Stunden getrocknet haben. Hierzu wird das Fenster geöffnet, welches sich auf der Rückseite eines jeden Testbriefs befindet. Auf jedes der sechs Testfelder wird dann ein Tropfen der Entwicklerlösung gegeben. Dieser Vorgang wird anschließend nochmals wiederholt. Die Testfelder werden anschließend für etwa 60 Sekunden beobachtet, ob sich die typische blaue Farbe entwickelt. Entwickelt sich in einem der Testfelder eine blaue Färbung, so gilt diese Probe als positiv. Der Haemocult[®]-Test einer Maus wird als positiv gewertet, sobald mindestens eine Probe positiv ist.

4.7 Hämatologische und klinisch chemische Methoden

4.7.1 Blutabnahme

Die Blutabnahme erfolgt unmittelbar nach Eintritt des Todes durch Inhalation von Kohlenstoffdioxid (s. 4.3). Dazu wird mit einer heparinisierten Hämatokritkapillare am Auge der retrobulbäre Plexus verletzt und diese Kapillare mit Blut befüllt. Die Kapillare wird im Anschluss mit Hilfe eines Kitts verschlossen, damit sie für die Bestimmung des Hämatokritwertes verwendet werden kann (s. 4.7.2). Für die Bestimmung der Konzentration von Eisen (s. 4.7.9), Vitamin B12 sowie Folat (s. 4.7.10) wird das Blut in zwei heparinisierten Microvetten[®] aufgenommen. Um die Bestimmung der Hämoglobinkonzentration (s. 4.7.3) und der Anzahl von Erythrozyten (s. 4.7.4), Retikulozyten (s. 4.7.6) sowie Leukozyten (s. 4.7.8) durchführen zu können, wird Blut mit Hilfe von Hämatokritkapillaren in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gesammelt.

Die mit dem abgenommenen Blut gefüllten Microvetten[®] werden gemäß den Angaben des Herstellers für acht Minuten mit $2000 \times g$ bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Plasma wird dann in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

4.7.2 Bestimmung des Hämatokritwertes

Der Hämatokritwert beschreibt den Volumenanteil der Erythrozyten am Vollblut und wird üblicherweise in Prozent angegeben. Veränderungen des Hämatokritwertes liefern im Rahmen der Diagnostik bereits erste Hinweise auf die mögliche Erkrankung. Ein erhöhter Hämatokritwert kann beispielsweise eine Folge einer Lungenerkrankung oder Dehydratation sein, aber auch die Folge eines langen Aufenthalts in großer Höhe. Ist der Hämatokritwert dagegen erniedrigt, so kann dies unter anderem ein Hinweis auf eine Störung in der Erythropoese oder auf eine chronische Niereninsuffizienz sein.

Die Durchführung der Bestimmung des Hämatokritwertes erfolgt in Anlehnung an Rick (1990).

Durchführung

Die mit Blut vom retrobulbären Plexus (s. 4.7.1) gefüllte Kapillare wird an einer der beiden Öffnungen mit Hilfe eines Spezialkitts verschlossen. Im Anschluss wird die Kapillare in eine Zentrifuge gelegt, die einen speziellen Rotor enthält, der für Kapillaren geeignet ist und für acht Minuten mit $13520 \times g$ zentrifugiert.

Das Ablesen des Hämatokritwertes erfolgt mit Hilfe einer Hämatokritschablone. Hierzu wird die Kapillare auf die Schablone gelegt und zwar in der Form, dass die Grenzfläche zwischen Kitt und Blutsäule auf der 0%-Linie liegt. Die Kapillare wird anschließend solange auf der 0%-Linie verschoben, bis der obere Rand der Plasmasäule auf der 100%-Linie liegt. An der Stelle, an der sich der obere Rand der Erythrozytensäule – Grenzfläche zwischen den Erythrozyten und der Schicht aus Leukozyten und Thrombozyten („Buffy Coat“) – befindet, wird der Hämatokritwert der Blutprobe abgelesen.

4.7.3 Bestimmung der Konzentration von Hämoglobin

Als Standardmethode zur Bestimmung der Konzentration des Hämoglobins im Vollblut wird heute die photometrische Bestimmung von Cyanmethämoglobin verwendet. Hierbei wird das Fe^{2+} -Ion des Hämoglobins durch Kaliumhexacyanoferrat(III) ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) zu Fe^{3+} oxidiert, so dass Methämoglobin entsteht. Das Methämoglobin wird dann durch Kaliumcyanid in das sehr stabile Cyanmethämoglobin umgewandelt. Cyanmethämoglobin kann dann bei einer Wellenlänge von $\lambda = 546\text{nm}$ photometrisch vermessen werden (Rick 1990).

Reagenzien

Transformationslösung

Substanz	Menge	[c]
KCN	0,050 g	0,005%
K ₃ [Fe(CN) ₆]	0,200 g	0,02%
KH ₂ PO ₄	0,140 g	0,014%
ddH ₂ O	ad 1000 ml	

Durchführung

Eine Hämoglobinkapillare wird mit dem abgenommenen Blut (s. 4.7.1) bis zur schwarzen Markierung befüllt, was einem Volumen von 20 µl Blut entspricht. Das Blut wird dann in ein PPN-Röhrchen überführt, das mit 5 ml der Transformationslösung befüllt ist. Durch mehrmaliges Spülen der Kapillare mit Transformationslösung wird das gesamte Blut vollständig in die Transformationslösung überführt. Im Anschluss wird das PPN-Röhrchen kräftig und gut geschüttelt und der Ansatz für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Lösung photometrisch, unter Zuhilfenahme einer Küvette, bei einer Wellenlänge von $\lambda = 546\text{nm}$ gegen die Transformationslösung vermessen.

Die Konzentration des Hämoglobins (Hb) berechnet sich wie folgt:

$$c(\text{Hb})[\text{g} \cdot \text{dl}^{-1}] = E_{546\text{nm}} \cdot 36,8$$

$c(\text{Hb})$ beschreibt dabei die berechnete Konzentration des Hämoglobins, $E_{546\text{nm}}$ die gemessene Extinktion bei einer Wellenlänge von $\lambda = 546\text{nm}$ und der Faktor 36,8 stellt einen Korrekturfaktor dar. Mit dem Korrekturfaktor wird die Schichtdicke der Küvette und der Extinktionskoeffizient berücksichtigt.

4.7.4 Bestimmung der Anzahl der Erythrozyten

Durchführung

Mit dem vom retrobulbären Plexus abgenommenen Blut (s. 4.7.1), wird eine Erythrozytenpipette bis zur Markierung „0,5“ befüllt und anschließend bis zur Markierung „101“ mit 0,9% NaCl aufgefüllt. Die Pipette wird dann auf einem Schüttler für Blutmischpipetten bis zur weiteren Verwendung geschüttelt.

Die Zählung der Erythrozyten erfolgt mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Hierzu wird diese mit der Erythrozytensuspension vorsichtig befüllt und anschließend einige Minuten

stehengelassen, damit die Erythrozyten sich absetzen können. So soll verhindert werden, dass es durch umherschwimmende Erythrozyten zu Fehlern bei der Auszählung kommt. Unter dem Mikroskop (Objektiv 40×) werden dann fünf Mittelquadrate – bestehend aus je 16 Kleinstquadraten – ausgezählt. Zur Berechnung der Gesamtzahl der Erythrozyten der jeweiligen Probe wird folgende Formel verwendet:

$$N(\text{Erythrozyten})_{ges}[10^6 \cdot \mu\text{l}^{-1}] = \frac{(\sum_{i=1}^5 N(\text{Erythrozyten})_i) \cdot 10000}{1000000}$$

$N(\text{Erythrozyten})_{ges}$ beschreibt dabei die Gesamtzahl der Erythrozyten der untersuchten Probe, während $N(\text{Erythrozyten})_i$ die Anzahl der Erythrozyten in einem Mittelquadrat angibt. Der Faktor 10000 beinhaltet das Volumen der Neubauer-Zählkammer und den Verdünnungsfaktor der Erythrozytensuspension in der Erythrozytenpipette. Die Division durch den Faktor 1000000 dient zur übersichtlicheren Darstellung der Gesamtzahl der Erythrozyten in der Probe.

4.7.5 Berechnung von MCH und MCV

Anhand des Hämatokritwertes, der Konzentration des Hämoglobins und der Anzahl der Erythrozyten lassen sich zwei weitere wichtige diagnostische Parameter berechnen, die so genannten Erythrozytenindices. Mit diesen Werten ist eine Abschätzung möglich, ob beispielsweise ein Eisenmangel oder ein Mangel an Vitamin B12 vorliegen könnte (Dormann 2008).

Die Berechnung der Erythrozytenindices erfolgte wie von Rick (1990) beschrieben.

Berechnung MCH

Das mittlere korpuskuläre Hämoglobin (MCH) gibt die durchschnittliche Konzentration an Hämoglobin in einem Erythrozyten an. Für die Berechnung wird die bestimmte Konzentration des Hämoglobins (Hb) und die ermittelte Gesamtzahl der Erythrozyten der Blutprobe verwendet. Mit Hilfe der folgenden Formel erhält man dann den Wert für das MCH:

$$MCH[pg] = \frac{Hb[g \cdot dl^{-1}] \cdot 10}{N(\text{Erythrozyten})_{ges}[10^6 \cdot \mu\text{l}^{-1}]}$$

Berechnung MCV

Das mittlere korpuskuläre Volumen (MCV) ermöglicht eine Aussage über das durchschnittliche Volumen eines Erythrozyten. Aus dem Hämatokritwert (HK) und der Gesamtzahl der Erythrozyten der jeweiligen Probe kann dann das MCV über die folgende Formel berechnet werden:

$$MCV[fl] = \frac{HK[\%] \cdot 10}{N(Erythrozyten)_{ges} [10^6 \cdot \mu l^{-1}]}$$

4.7.6 Bestimmung der Retikulozyten

Mit Hilfe der Brillantkresylblau-Lösung lässt sich in den Retikulozyten ein teilweise mit Granula besetztes Netzwerk – das auch als *Substantia reticulo-granulo-filamentosa* bezeichnet wird – darstellen. Bei der *Substantia reticulo-granulo-filamentosa* handelt es sich um Reste des rauen endoplasmatischen Retikulums (rER), der RNA und Ribosomen.

Die Bestimmung der Retikulozyten erfolgte – bis auf kleinere Modifikationen – analog zu der Beschreibung in Rick (1990).

Durchführung

Von dem in 4.7.1 abgenommenen Blut werden 100 μ l mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß überführt, in dem 100 μ l Brillantkresylblau-Lösung vorgelegt worden sind. Die Suspension wird vorsichtig mit einer Pipette gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wird die Suspension nochmals vorsichtig gemischt, um sicherzustellen, dass die enthaltenen Zellen gleichmäßig verteilt sind. Anschließend werden etwa 10 μ l der Suspension auf einen Objektträger pipettiert und mit Hilfe eines weiteren Objektträgers ein Blutausschlag angefertigt. Der so entstandene Ausschlag wird anschließend an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet.

Für die Bestimmung der Anzahl der Retikulozyten werden unter dem Mikroskop Axio Observer.Z1 (Objektiv 40 \times) Aufnahmen der Ausschläge angefertigt und dann mit der Software Axio-Vision ausgewertet. Hierfür werden alle Erythrozyten auf einer Aufnahme gezählt und im Anschluss alle Retikulozyten, die sich auf dieser Aufnahme befinden. Dieser Vorgang wird für jeden Ausschlag so lange wiederholt, bis insgesamt 1000 Erythrozyten ausgezählt sind. Als Ergebnis erhält man die relative Anzahl der Retikulozyten, die in „%“ angegeben wird.

Um Fehler und Ausreißer bei der Auszählung zu vermeiden, werden pro Maus drei Ausstriche angefertigt und ausgezählt. Aus diesen drei Zählungen wird dann der Mittelwert gebildet, der dann in die statistische Beurteilung einfließt.

4.7.7 Berechnung des Retikulozytenproduktionsindex

Eine weitere Größe zur Beurteilung einer Anämie ist der Retikulozytenproduktionsindex (RPI). Der RPI dient zur Korrektur der relativen Retikulozytenzahl, indem das Ausmaß der Anämie – das in Form des Hämatokritwertes berücksichtigt wird –, der ideale Hämatokritwert und die Verweildauer der Retikulozyten im Blut mitberücksichtigt werden. Es wird dabei angenommen, dass Retikulozyten, bei einem idealen Hämatokritwert von 45%, eine Reifungszeit von 3,5 Tagen im Knochenmark und im peripheren Blut eine Reifungszeit von einem Tag aufweisen. Liegt nun eine Anämie vor, so wird angenommen, dass mit der Abnahme des Hämatokritwertes die Reifungsdauer der Retikulozyten im Knochenmark abnimmt, dagegen aber die Reifungszeit im peripheren Blut zunimmt. In Folge kommt es zu einer vermehrten Ausschwemmung der Retikulozyten aus dem Knochenmark. Dieser Zusammenhang kann in grober Näherung als linear angesehen werden (Nebe et al. 2010). Somit lässt sich der RPI wie folgt berechnen:

$$RPI = \frac{\text{Retikulozyten [\%]} \cdot HK}{\text{Retikulozytenverweildauer im Blut [Tage]} \cdot 0,45}$$

Für die Berechnung muss die gemessene Anzahl der Retikulozyten (s. 4.7.6) entsprechend der Formel umgerechnet werden. Die Verweildauer der Retikulozyten im Blut kann über den linearen Zusammenhang mit Hilfe des gemessenen Hämatokritwertes (HK) hergeleitet werden. Der HK wird bei der Berechnung des RPIs nicht in Prozent, sondern als Anteil von Hundertstel angegeben.

4.7.8 Bestimmung der Anzahl der Leukozyten

Für die Zählung der Leukozyten wird abgenommenes Blut mit Türks Lösung versetzt. Es handelt sich dabei um eine stark hypotone Lösung, so dass die Erythrozyten platzen. Das in der Lösung enthaltene Gentianaviolett färbt die Zellkerne an, wodurch die Leukozyten als violett gefärbte Zellen unter dem Mikroskop zu erkennen sind.

Die Durchführung der Bestimmung der Leukozyten erfolgt bis auf kleine Modifikationen analog zu Rick (1990).

Durchführung

Die Leukozytenpipette wird mit dem abgenommenen Blut bis zur Markierung „1“ befüllt und mit Türks Lösung bis zur Markierung „11“ ergänzt. Die Pipette wird nun an beiden Enden mit den Fingern verschlossen und zwei Minuten kräftig geschüttelt, um so die Erythrozyten in der stark hypotonen Lösung zu zerstören. Bis zur weiteren Verwendung wird die Pipette auf einem Schüttler für Blutmischpipetten geschüttelt.

Um die Anzahl der Leukozyten zu bestimmen, wird eine Neubauer-Zählkammer mit der Suspension befüllt. Anschließend wird unter dem Mikroskop (Objektiv 10×) die Anzahl der Leukozyten in jedem der vier Eckquadrate bestimmt. Die Gesamtzahl der Leukozyten in der Blutprobe berechnet sich wie folgt:

$$N(\text{Leukozyten})_{ges} [\mu\text{l}^{-1}] = 25 \cdot \sum_{i=1}^4 N(\text{Leukozyten})_i$$

$N(\text{Leukozyten})_{ges}$ beschreibt die Gesamtzahl der Leukozyten der Blutprobe, $N(\text{Leukozyten})_i$ die Anzahl der Leukozyten in einem der Eckquadrate und der Faktor 25 beinhaltet das Volumen der Neubauer-Zählkammer und den Verdünnungsfaktor der Leukozyten in der Leukozytenpipette.

4.7.9 Bestimmung der Eisenkonzentration im Plasma

Das Prinzip des Tests beruht darauf, dass die in den Reagenzien enthaltene Ascorbinsäure Fe^{3+} -Ionen zu Fe^{2+} -Ionen reduziert. Das Fe^{2+} -Ion bildet dann mit dem zugefügten Chromogen einen blauen Komplex, dessen Intensität photometrisch bestimmt werden kann.

Die Bestimmung der Eisenkonzentration im Plasma erfolgt mit Hilfe des QuantiChrom™ Iron Assay Kits nach Angaben des Herstellers.

Reagenzien

Arbeitsreagenz

Substanz	Volumenanteil
Reagenz A (Puffer)	20
Reagenz B (Ascorbinsäure)	1
Reagenz C (Chromogen)	1

Muss frisch hergestellt werden

Durchführung

Die mit dem abgenommenen Blut gefüllten Microvetten[®] werden für acht Minuten mit $2000 \times g$ bei Raumtemperatur zentrifugiert, gemäß den Angaben des Herstellers (s. 4.7.1). Das Plasma wird anschließend in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Während das Plasma auf Eis langsam auftaut, werden die Eisen-Standardverdünnungen ($1000 \mu\text{g}\cdot\text{dl}^{-1}$, $800 \mu\text{g}\cdot\text{dl}^{-1}$, $600 \mu\text{g}\cdot\text{dl}^{-1}$, $400 \mu\text{g}\cdot\text{dl}^{-1}$, $300 \mu\text{g}\cdot\text{dl}^{-1}$, $200 \mu\text{g}\cdot\text{dl}^{-1}$, $100 \mu\text{g}\cdot\text{dl}^{-1}$, $0 \mu\text{g}\cdot\text{dl}^{-1}$) aus der Stammlösung ($c = 10 \text{ mg}\cdot\text{dl}^{-1}$) mit ddH_2O hergestellt und das Arbeitsreagenz vorbereitet.

In die Vertiefungen einer 96-Loch Mikrotiterplatte werden je $50 \mu\text{l}$ der Standards und der Probe pipettiert. Zusätzlich werden von jeder Probe nochmals $50 \mu\text{l}$ in separate Vertiefungen pipettiert, damit für jede Probe ein Nullwert bestimmt werden kann. In jede der Vertiefungen, die Standard oder Probe enthalten, werden nun $200 \mu\text{l}$ des Arbeitsreagenz hinzugefügt. Die Vertiefungen mit den Proben für den Nullabgleich werden mit $200 \mu\text{l}$ Reagenz A befüllt. Der gesamte Ansatz wird gut gemischt und für 40 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wird die 96-Loch Mikrotiterplatte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 590\text{nm}$ im Mikrotiterplatten-Photometer Tecan Sunrise Remote[™] vermessen.

Berechnung

Für die Auswertung wird mit Hilfe der gemessenen Extinktionen und den bekannten Konzentrationen der Standardverdünnungen eine Kalibriergerade erstellt. Nach Abzug des Nullwertes von den Proben kann über deren Extinktion mit Hilfe der Kalibriergeraden die Eisenkonzentration berechnet werden.

4.7.10 Bestimmung von Vitamin B12 und Folat mittels ELISA

Die Bestimmung der Konzentration von Vitamin B12 und Folat im Plasma erfolgt mittels eines ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Es handelt sich hierbei um ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren und ist eine Weiterentwicklung des Radioimmunoassays (Engvall and Perlmann 1971; van Weemen and Schuurs 1971). Dabei wird ein Primärantikörper gegen ein Antigen auf einer stationären Phase fixiert. Nach der Bindung des Antigens an den Primärantikörper wird ein weiterer Antikörper hinzugefügt. Dieser Antikörper bindet ebenfalls an das Antigen, ist aber über sein F_c-Fragment mit einem Enzymsystem gekoppelt. Das Enzymsystem setzt nach Zugabe eines Substrates dieses um, so dass sich eine Färbung entwickelt. Durch Zugabe einer Säure wird die farbbgebende Enzymreaktion gestoppt und die Intensität der Färbung photometrisch bestimmt.

Die Durchführung der beiden Assays erfolgt analog zu den Angaben des jeweiligen Herstellers.

Durchführung

Da beide Assays von der Durchführung her identisch sind, wird die Durchführung nur einmal beschrieben.

Die Mikrotiterstreifen werden eingangs gewaschen, indem sie mit 350 µl Waschpuffer befüllt und für zwei Minuten inkubiert werden. Es werden dann 50 µl der Standards und der Probenverdünnung in je eine Vertiefung pipettiert. Die Standards werden aus der Stammlösung entsprechend den Vorgaben mit Probenverdünnungs-Puffer verdünnt, wie auch die Vorverdünnungen der Proben (s. 4.7.1) mit Probenverdünnungs-Puffer hergestellt werden. Für den Nullabgleich werden 50 µl des Probenverdünnungs-Puffers verwendet. Im Anschluss werden in jede Vertiefung 50 µl der Biotin-Antikörper-Arbeitslösung pipettiert. Der ganze Ansatz wird mit Folie abgeklebt und bei 37°C für 45 min inkubiert. Nach der Inkubation erfolgt ein dreimaliges Waschen mit Waschpuffer für je eine Minute. Anschließend werden 100 µl des HRP-Streptavidin Konjugats hinzugefügt und der gesamte Ansatz erneut mit Folie abgeklebt und bei 37°C für 30 min inkubiert. Die Mikrotiterstreifen werden nun fünfmal je zwei Minuten mit Waschpuffer gewaschen. Zum Abschluss werden 90 µl TMB-Substrat hinzugefügt, gefolgt von einer 10-20-minütigen Inkubation bei 37°C im Dunkeln. In dieser Zeit entwickelt sich eine Blaufärbung, anhand deren Intensität auch abgelesen werden kann, ob die Farbreaktion bereits ausreichend lange stattgefunden hat. Die Reaktion wird durch Zugabe von 50 µl Stopp-Lösung beendet, dabei erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Mit Hilfe des Mikrotiterplatten-Photometers Tecan Sunrise RemoteTM werden die Mikrotiterstreifen photometrisch vermessen.

Berechnung

Anhand der Konzentrationen der Standards und deren Extinktionen wird eine Kalibrierkurve erstellt. Mit Hilfe der Kalibrierkurve kann dann über die Extinktionen der jeweiligen Probe deren Konzentration berechnet werden.

4.8 Histologie

4.8.1 Herstellung histologischer Präparate

Durchführung

Die Durchführung der Herstellung der histologischen Präparate erfolgt in Anlehnung an Schinner et al. (2013).

Einbetten des Gewebes

Das Gewebestück, das nach der Fixierung in PFA bis zur weiteren Verwendung in 70% MeOH bei 4°C gelagert worden ist (s. 4.3), wird in eine Einbettkassette überführt. In einer in der Konzentration aufsteigenden Methanolreihe (70% MeOH, 75% MeOH, 80% MeOH, 85% MeOH, 90% MeOH und 95% MeOH) wird dem Gewebe nun Wasser entzogen. Hierzu erfolgt eine Inkubation für je 30 min bei Raumtemperatur und unter stetigem Schütteln in den verschiedenen Methanol-Lösungen. Im Anschluss wird das Gewebe, ebenfalls bei Raumtemperatur und unter Schütteln, zweimal für je 30 min in 100% MeOH inkubiert, gefolgt von einer ebenfalls zweimaligen 30-minütigen Inkubation in 100% Isopropanol. Damit die Entwässerung des Gewebes möglichst vollständig abläuft, wird das Gewebe abschließend für 30 min in 100% Isopropanol bei 60°C inkubiert. Mit diesem Schritt ist die Entwässerung des Gewebes abgeschlossen.

Es folgt nun der Abschnitt, in dem das Gewebe von Paraffin durchsetzt wird. Hierzu wird das Gewebe bei 60°C für 30 min in einer Mischung aus gleichen Teilen 100% Isopropanol und flüssigem Paraffin inkubiert. Anschließend erfolgt über Nacht eine Inkubation in reinem flüssigem Paraffin. Am darauffolgenden Tag wird das flüssige Paraffin gewechselt und das Gewebe wird nochmals für 24 Stunden bei 60°C in flüssigem Paraffin belassen, so dass das Gewebe komplett von Paraffin durchsetzt ist.

Nach der erneuten Inkubation in flüssigem Paraffin erfolgt die Einbettung des Gewebes. Hierzu werden spezielle Schälchen auf einer Heizplatte erwärmt und die vorhandene Vertiefung mit flüssigem Paraffin ausgegossen und ein Einbettring auf dem Schälchen positioniert. Die

Funktion des Einbettringes besteht darin, die Form des Paraffinblocks zu bilden. Das Gewebe wird nun aus der Einbettkassette entnommen und entsprechend der gewünschten Ausrichtung in dem Schälchen positioniert. Der Einbettring wird anschließend vorsichtig mit flüssigem Paraffin ausgegossen, so dass das Gewebe komplett von Paraffin umgeben ist. Nachdem das Paraffin erstarrt ist, wird der Block mit dem Gewebe für eine Stunde auf Eis gelagert und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

Anfertigung histologischer Schnitte

Vor dem Anfertigen der Gewebeschnitte wird der Paraffinblock für mindestens eine Stunde bei -20°C gekühlt, damit das Paraffin entsprechend hart ist. Der so gekühlte Block wird in das Rotationsmikrotom eingespannt, mit welchem 4 µm dicke Schnitte von dem jeweiligen Gewebe angefertigt werden. Anschließend überführt man den Gewebeschnitt vorsichtig vom Rotationsmikrotom in ein auf 37°C vorgeheiztes Wasserbad, damit sich der Schnitt im Wasserbad komplett entfalten kann. Nach der Entfaltung des Schnitts zieht man diesen möglichst faltenfrei auf einen Polylysin-beschichteten Objektträger auf. Zum Abschluss werden die so hergestellten Gewebeschnitte über Nacht bei 37°C im Brutschrank getrocknet.

4.8.2 Eisenfärbung der Milz

Die Eisenfärbung basiert auf der Berlinerblau-Reaktion und dient zum Nachweis von Fe³⁺-Ionen. Eisen wird durch die Salzsäure ionisiert und bildet mit Kaliumhexacyanoferrat(II) (K₄[Fe(CN)₆]) einen blauen Komplex (K[Fe³⁺Fe²⁺(CN)₆] oder Fe³⁺[Fe³⁺Fe²⁺(CN)₆]₃).

Da Makrophagen in der Milz gealterte oder beschädigte Erythrozyten phagozytieren und dann das Eisen aus dem Hämoglobin speichern, ist so eine Darstellung des Eisengehalts der Erythrozyten in der Milz möglich (Lüllmann-Rauch 2015; Welsch et al. 2018).

Reagenzien

Kaliumhexacyanoferrat 5%

Substanz	Menge	[c]
K ₄ [Fe(CN) ₆]	5,0 g	5%
HCl 3,7%	ad 100 ml	

Lösung muss frisch hergestellt werden

Kaliumhexacyanoferrat 10%

Substanz	Menge	[c]
K ₄ [Fe(CN) ₆]	10,0 g	10%
ddH ₂ O	ad 100 ml	

Lösung muss frisch hergestellt werden

Safranin O 0,6%

Substanz	Menge	[c]
Safranin O	0,6 g	0,6%
EtOH 66%	ad 100 ml	

Durchführung

Rehydrierung

Bevor die eigentliche Färbung durchgeführt wird, muss der Gewebeschnitt entparaffiniert und rehydriert werden. Hierzu erfolgt zuerst eine zweimalige Inkubation in Xylol für zehn Minuten, gefolgt von einer dreimaligen fünfminütigen Inkubation in 100% Isopropanol. Die Entparaffinierung ist nach einer Inkubation in 100% MeOH für fünf Minuten, die zweimal durchgeführt wird, und einem zweiminütigen Waschschrift in ddH₂O abgeschlossen.

Färbung

Für die Färbung wird der Objektträger mit den Gewebeschnitten für fünf Minuten in 10% Kaliumhexacyanoferrat-Lösung inkubiert und anschließend 30 min in 5% Kaliumhexacyanoferrat-Lösung. Nach der Inkubation in den Kaliumhexacyanoferrat-Lösungen wird der Objektträger dreimal für zwei Minuten in ddH₂O gewaschen. Die Gegenfärbung der Gewebeschnitte erfolgt für 15 s mit 0,6% Safranin O, gefolgt von zwei zweiminütigen Waschschriften in ddH₂O. Zur Differenzierung der Farbe wird der Objektträger für zwei Minuten in 80% EtOH gestellt. Abschließend werden die Gewebeschnitte dehydriert, indem sie für drei Minuten in 100% EtOH und darauffolgend für fünf Minuten in Xylol inkubiert werden. Nach dem Verdampfen des Xylols wird der Schnitt mit DePeX eingebettet.

4.8.3 PAS-Färbung des Duodenums

Die PAS-Färbung – eigentlich korrekt als PAS-Reaktion (*periodic acid-Schiff reaction*) bezeichnet – ist eine Färbemethode zur Darstellung von Polysacchariden, Glykoproteinen und -lipiden sowie von Muzinen. Allgemein gilt, dass alle Makromoleküle, in denen zahlreiche Kohlenhydratreste mit benachbarten 1,2-Glykolgruppen vorliegen, eine positive PAS-Reaktion zeigen. Das Reaktionsprinzip beruht darauf, dass die Perjodsäure die OH-Gruppen zu Aldehydgruppen oxidiert. In einem zweiten Schritt reagieren dann die Aldehydgruppen mit dem Schiff-Reagenz (fuchsinschweflige Säure) und bilden einen purpurroten bis violetten Farbstoff. Der in

der Färbung verwendete basische Farbstoff Hämalaun dient zur Gegenfärbung der Zellkerne (Lüllmann-Rauch 2015; Welsch et al. 2018).

Durchführung

In einem ersten Schritt werden die Gewebeschnitte, wie in 4.8.2 beschrieben, entparaffiniert und rehydriert. Im Anschluss an das Rehydrieren werden die Schnitte für zehn Minuten in 1% Perjodsäure inkubiert, gefolgt von drei Waschritten für je drei Minuten mit Leitungswasser und einer anschließenden zweimaligen Spülung für je zwei Minuten in ddH₂O. Die Gewebeschnitte werden nun für zehn Minuten mit Schiffs Reagenz gefärbt. Die überschüssige Farbe wird für zweimal je zweieinhalb Minuten mit warmem Leitungswasser (38°C-39°C) unter ständigem Schütteln ausgewaschen. Anschließend werden die Schnitte mit Hämalaunlösung nach Mayer für drei Minuten gegengefärbt, nachdem sie zuvor kurz in ddH₂O gespült worden sind. Nach der Gegenfärbung werden die Objektträger für dreimal fünf Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Zum Abschluss der Färbung werden mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe – 95% Isopropanol für zwei Minuten, zweimal je zwei Minuten 100% Isopropanol – sowie zweimal je zwei Minuten Xylol die Gewebeschnitte dehydriert. Nach dem Verdampfen des Xylols werden die Schnitte mit DePeX eingebettet.

4.9 Statistische Auswertung

Alle Ergebnisse sind mit dem Mittelwert und dem mittleren Standardfehler (SEM) dargestellt. Für die Berechnung, ob ein statistisch signifikanter Unterschied vorliegt, ist ein zweiseitiger ungepaarter Students t-Test durchgeführt worden. Die signifikanten Unterschiede werden wie folgt dargestellt – (*) ($p < 0,05$), (**) ($p < 0,01$) und (***) ($p < 0,001$).

Sämtliche Berechnungen sind mit Microsoft Excel oder GraphPad Prism 5.0 durchgeführt worden.

5 Ergebnisse

5.1 Zucht *Irag1*-defizienter Mäuse

5.1.1 Überlebensrate der Würfe der IRAG1-KO Mauslinie

Für die Bestimmung der Überlebensrate der Mäuse eines Wurfes, ist die Anzahl der neugeborenen Mäuse und die Anzahl der abgesetzten Mäuse aller Zuchtkäfige (heterozygote Verpaarung) im Jahr 2019 untersucht worden.

In diesem Zeitraum ist der Aufzuchtverlust von 178 geborenen Mäusen bestimmt worden. Zum Zeitpunkt des Absatzes – etwa drei bis vier Wochen nach der Geburt – waren noch 169 Mäuse am Leben. Dies entspricht einem Anteil von 94,9%. Neun Mäuse sind während der Aufzucht im Zuchtkäfig verstorben, was einem Anteil von 5,1% entspricht. Zu beachten ist dabei, dass die Genotypen der verstorbenen Mäuse nicht bekannt sind. Da es sich bei den Zuchten um heterozygote Verpaarungen handelt, ist davon auszugehen, dass alle möglichen Genotypen – *Irag1*^{+/+}, *Irag1*^{+/-}, *Irag1*^{-/-} – unter den verstorbenen Jungtieren vorhanden waren.

5.1.2 Verteilung der Geschlechter in der IRAG1-KO Mauslinie

Im Rahmen Auswertung der Zuchtdaten ist auch untersucht worden, ob sich die Zucht *Irag1*-defizienter Mäuse auf die Verteilung der Geschlechter auswirkt.

Die Auswertung hat dabei ergeben, dass 164 männliche Jungtiere und 161 weibliche Jungtiere abgesetzt worden sind. Das entspricht für die männlichen Jungtiere einem Anteil von 50,46% und für die weiblichen Jungtiere einem Anteil von 49,54%.

Es ist also kein Unterschied in der Geschlechtsverteilung bei der Zucht *Irag1*-defizienter Mäuse feststellbar, womit davon auszugehen ist, dass sich die *Irag1*-Deletion nicht negativ auf die Verteilung der Geschlechter auswirkt.

5.1.3 Verteilung der Genotypen in der IRAG1-KO Mauslinie

Um herauszufinden, inwieweit eine *Irag1*-Defizienz einen negativen Einfluss auf die embryonale Entwicklung und somit auch auf die Verteilung der Genotypen der abgesetzten Jungtiere hat, ist zusätzlich zu der Verteilung der Geschlechter (s. 5.1.2) auch die Verteilung Genotypen der abgesetzten Jungtiere bestimmt worden.

Je 81 *Iragl*^{+/+}- und *Iragl*^{-/-}-Mäuse sowie 163 *Iragl*^{+/-}-Mäuse sind dabei abgesetzt worden. Dies entspricht einem Anteil von je 24,92% der *Iragl*^{+/+}- und *Iragl*^{-/-}-Mäuse und einem Anteil von 50,16% der *Iragl*^{+/-}-Mäuse.

Die *Iragl*-Defizienz hat somit keinen Einfluss auf die Verteilung der Genotypen bei den abgesetzten Jungtieren.

5.1.4 Vergleich des Überlebens von IRAG1-WT und IRAG1-KO Mäusen

Ein wichtiger Faktor für die Beurteilung oder Bewertung der Defizienz eines Proteins ist das Überleben der Mäuse, die diese Defizienz aufweisen. Um dies für IRAG1 zu bestimmen, ist das Überleben von männlichen und weiblichen *Iragl*^{-/-}-Mäusen (IRAG1-KO) mit Wildtypmäusen (Genotyp: *Iragl*^{+/+}; IRAG1-WT) verglichen worden. Die Auswertung ergab dabei keinen signifikanten Unterschied im Überleben von IRAG1-KO Mäusen im Vergleich mit WT-Mäusen (s. Abbildung 5.1).

Überlebenszeitanalyse von IRAG1-KO im Vergleich zu -WT

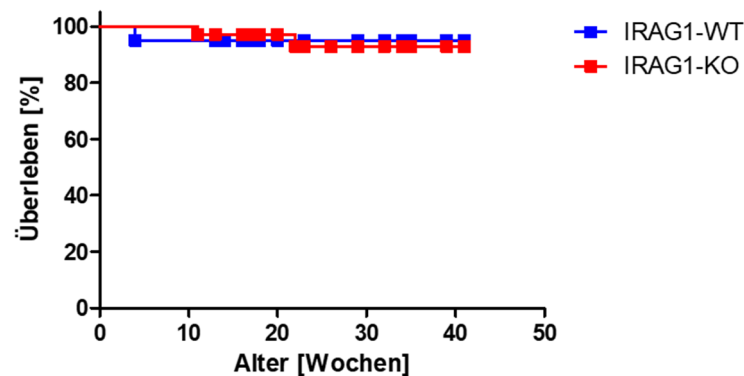


Abbildung 5.1: Kaplan-Meier-Kurve von IRAG1-WT und IRAG1-KO Mäusen.

IRAG1-KO Mäuse ($n = 35$) weisen keine erhöhte Mortalität im Vergleich zu IRAG1-WT Mäusen ($n = 20$) auf.

Die *Iragl*-Defizienz wirkt sich somit nicht negativ auf die Lebenserwartung der Mäuse im Vergleich zu WT-Mäusen aus.

5.2 Nachweis von okkultem Blut bei *Irag1*-defizienten Mäusen

Aus bereits publizierten Daten und internen Vorversuchen ist bekannt, dass sich die *Irag1*-Defizienz ab einem Alter von etwa zwölf Wochen durch pathophysiologische Veränderungen bemerkbar macht (Geiselhöringer et al. 2004b; Desch et al. 2010). Untersuchungen zur Proteinexpression von PKGI β und IRAG1 in verschiedenen Geweben haben ergeben, dass beide Proteine ein ähnliches Expressionsmuster zeigen (Geiselhöringer et al. 2004a). Auch weisen die *Irag1* ^{Δ 12/ Δ 12}-Mäuse und die globalen *Irag1*^{-/-}-Mäuse ähnliche pathologische Phänotypen auf wie *Prkg1*-defiziente Mäuse (Pfeifer et al. 1998; Geiselhöringer et al. 2004b; Desch et al. 2010). Deshalb ist vermutet worden, dass *Irag1*-defiziente Tiere ebenfalls gastrointestinale Blutungen aufweisen könnten, wie sie bereits von Singh et al. (2012) und Angermeier et al. (2016) bei *Prkg1*-defizienten Mäusen beschrieben worden sind.

5.2.1 Nachweis von okkultem Blut bei 14 Wochen alten Mäusen

Wie bereits in 5.2 erwähnt, macht sich die *Irag1*-Defizienz ab einem Alter von zwölf Wochen pathophysiologisch bemerkbar. Um sicherzustellen, dass der pathologische Phänotyp auch wirklich ausgebildet ist, sind für den Haemocult[®]-Test 14 Wochen alte männliche und weibliche IRAG1-WT und IRAG1-KO Mäuse untersucht worden.

Bei männlichen IRAG1-KO Mäusen ist das Ergebnis des Haemocult[®]-Tests in 31% (5 von 16 Mäusen) der untersuchten Mäuse positiv gewesen, während bei den WT-Wurfgeschwistern 8% der Mäuse (2 von 24 Mäusen) positiv getestet worden sind. Weibliche Mäuse haben dagegen ein anderes Resultat gezeigt. Keine der IRAG1-WT Mäuse hatte ein positives Testresultat, während 81% der weiblichen IRAG1-KO Mäuse (13 von 16 Mäusen) ein positives Testergebnis aufgewiesen haben. Die gemeinsame Auswertung beider Geschlechter – Daten der männlichen und weiblichen Mäuse – hat dabei ein ähnliches Ergebnis gezeigt, wie bei den weiblichen Mäusen. Bei 56% (18 von 32 Mäusen) der IRAG1-KO Mäuse ist das Testergebnis positiv gewesen, im Vergleich zu 5% (2 von 40 Mäusen) bei den WT-Wurfgeschwistern (s. Abbildung 5.2).

Durch die *Irag1*-Defizienz kommt es somit zu gastrointestinalen Blutungen, die bei weiblichen Mäusen allerdings häufiger auftreten als bei gleichaltrigen männlichen Mäusen.

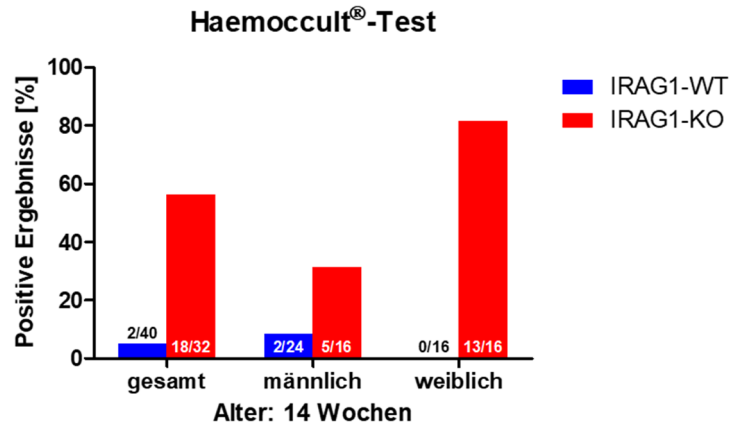


Abbildung 5.2: Haemocult®-Test von 14 Wochen alten Mäusen.

Der Nachweis von okkultem Blut ist bei *Irag1*-defizienten Mäusen positiv, allerdings mit einem geschlechtsabhängigen Unterschied. Bei weiblichen IRAG1-KO Mäusen ist häufiger okkultes Blut nachgewiesen worden als bei männlichen IRAG1-KO Mäusen. Die Zahlen geben die Anzahl der Mäuse mit einem positiven Testergebnis an in Bezug auf die Gesamtzahl der Mäuse des jeweiligen Genotyps.

5.2.2 Nachweis von okkultem Blut bei sechs Wochen alten Mäusen

14 Wochen alte IRAG1-KO Mäuse weisen gastrointestinale Blutungen auf (s. 5.2.1). Deshalb ist zusätzlich noch untersucht worden, ob bereits bei sechs Wochen alten Mäusen gastrointestinale Blutungen auftreten. Der Grund hierfür liegt in der Tatsache, dass *Prkg1*-defiziente Mäuse bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt eine Anämie entwickeln (Föller et al. 2008).

Weder bei männlichen noch bei weiblichen IRAG1-KO Mäusen sowie bei den IRAG1-WT Mäusen, konnte in einem Alter von sechs Wochen okkultes Blut nachgewiesen werden (s. Abbildung 5.3). Die *Irag1*-Defizienz verursacht somit bei jungen Mäusen noch keine gastrointestinalen Blutungen.

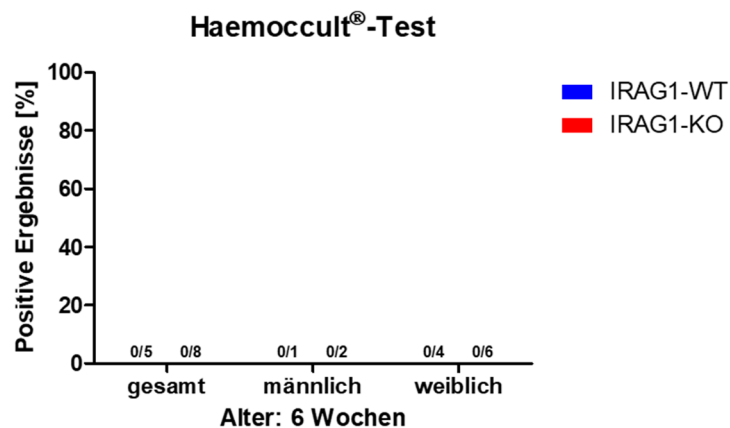


Abbildung 5.3: Haemocult®-Test von sechs Wochen alten Mäusen.

Der Nachweis von okkultem Blut ist sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen *Irag1*-defizienten Mäusen wie auch bei den WT-Wurfgeschwistern negativ. Die Zahlen geben die Anzahl der Mäuse mit einem positiven Testergebnis an in Bezug auf die Gesamtzahl der Mäuse des jeweiligen Genotyps.

5.3 Bestimmung des Gewichtes von Milz und Körper von *Irag1*-defizienten Mäusen

Prkg1-defiziente Mäuse entwickeln mit zunehmenden Alter eine Splenomegalie (Föller et al. 2008; Angermeier et al. 2016). Durch Voruntersuchungen an globalen IRAG1-KO Mäusen und *Irag1*^{Δ12/12}-Mäusen haben sich Hinweise ergeben, dass auch diese Tiere eine Splenomegalie entwickeln können (Geiselhöringer et al. 2004b; Desch et al. 2010). Aus diesem Grund sind IRAG1-KO Mäuse systematisch untersucht worden, um herauszufinden, ob es durch die *Irag1*-Defizienz zur Entwicklung einer Splenomegalie kommt.

5.3.1 Milz- und Körpergewicht von 15 Wochen alten Mäusen

Für die Bestimmung des Milz- und des Körpergewichtes sind dieselben Mäuse verwendet worden, mit denen bereits der Haemocult[®]-Test durchgeführt worden ist (s. 5.2.1). Da die Bestimmung der Gewichte in der Woche nach dem Haemocult[®]-Test erfolgt ist, liegt das Alter der Mäuse nun bei 15 Wochen.

Das Milzgewicht von weiblichen IRAG1-KO Mäusen ist im Vergleich zu deren WT-Wurfgeschwistern deutlich signifikant erhöht (IRAG1-WT: 0,0678 g ± 0,0035 g; IRAG1-KO: 0,1399 g ± 0,0140 g) (s. Abbildung 5.4A). Ein ähnliches Ergebnis ist auch bei der gemeinsamen Auswertung („gesamt“) beider Geschlechter zu finden. IRAG1-KO Mäuse haben ein signifikant höheres Milzgewicht als IRAG1-WT Mäuse (IRAG1-WT: 0,0634 g ± 0,0034 g; IRAG1-KO: 0,1051 g ± 0,0106 g). Bei männlichen IRAG1-KO Mäusen ist das Milzgewicht hingegen nur minimal erhöht gewesen im Vergleich zu den entsprechenden WT-Mäusen (IRAG1-WT: 0,0605 g ± 0,0050 g; IRAG1-KO: 0,0702 ± 0,0103 g). Dieser Unterschied ist allerdings statistisch nicht signifikant.

Die Analyse des Körpergewichtes hat zwischen den beiden Genotypen weder bei den männlichen Mäusen (IRAG1-WT: 24,04 g ± 0,57 g; IRAG1-KO: 24,91 g ± 0,55 g) noch bei den weiblichen Mäusen (IRAG1-WT: 21,77 g ± 0,51 g; IRAG1-KO: 22,49 g ± 0,58 g) und auch in der Gesamtauswertung (IRAG1-WT: 23,13 g ± 0,43 g; IRAG1-KO: 23,70 g ± 0,45 g) keinen signifikanten Unterschied ergeben (s. Abbildung 5.4B).

Das berechnete Verhältnis aus Milzgewicht zu Körpergewicht (Ratio) zeigt, wie bereits beim Milzgewicht, dass weibliche IRAG1-KO Mäuse eine signifikant höhere Ratio aufweisen im Vergleich zu den WT-Wurfgeschwistern (IRAG1-WT: 0,0031 ± 0,0002; IRAG1-KO: 0,0062 ± 0,0007) (s. Abbildung 5.4C). In der Gesamtauswertung ist dies ebenfalls beobachtet

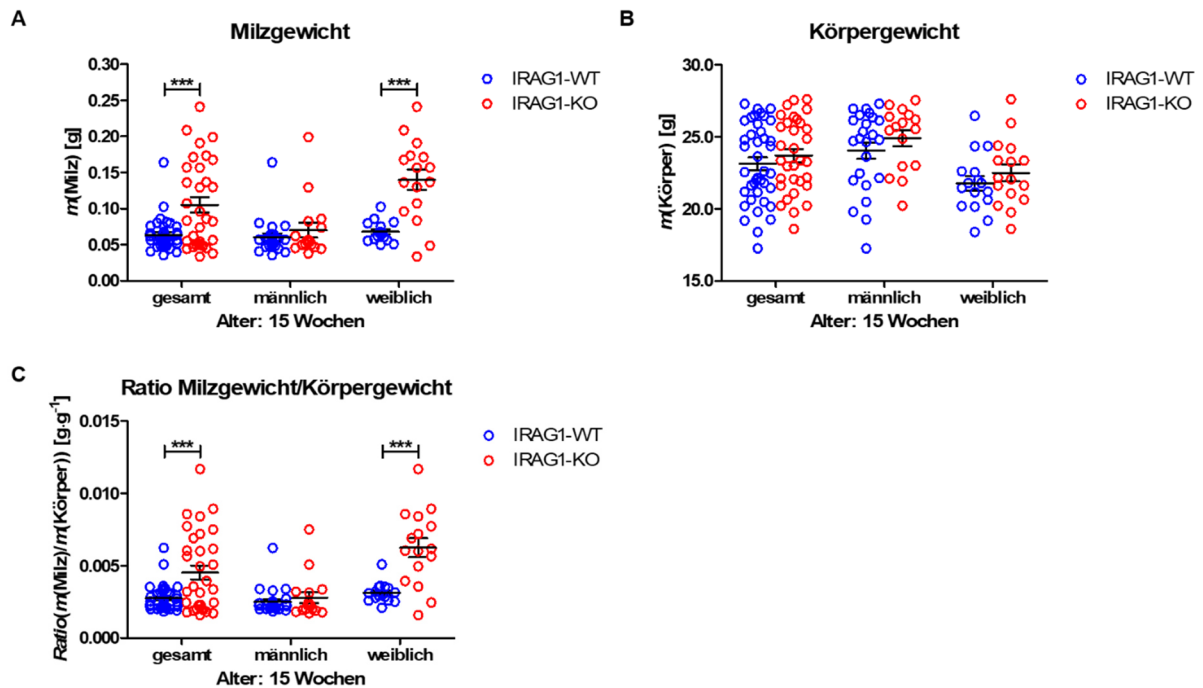


Abbildung 5.4: Milzgewicht, Körpergewicht und Ratio von 15 Wochen alten Mäusen.

A: Das Milzgewicht von weiblichen IRAG1-KO Mäusen ($n = 16$) ist im Vergleich mit den WT-Wurfgeschwistern ($n = 16$) signifikant erhöht, wie auch in der Gesamtauswertung (IRAG1-WT: $n = 40$; IRAG1-KO: $n = 32$). Männliche IRAG1-KO Mäuse ($n = 16$) weisen hingegen kein erhöhtes Milzgewicht auf im Vergleich zu IRAG1-WT Mäusen ($n = 24$). **B:** Das Körpergewicht unterscheidet sich nicht zwischen IRAG1-WT (gesamt: $n = 40$; männlich: $n = 24$; weiblich: $n = 16$) und IRAG1-KO Mäusen (gesamt: $n = 32$; männlich: $n = 16$; weiblich: $n = 16$). **C:** Die Ratio aus Milzgewicht zu Körpergewicht ist bei weiblichen sowie in der Gesamtauswertung bei IRAG1-KO Mäusen (gesamt: $n = 32$; weiblich: $n = 16$) gegenüber IRAG1-WT Mäusen (gesamt: $n = 40$; weiblich: $n = 16$) signifikant erhöht. Männliche IRAG1-WT ($n = 24$) und -KO Mäuse ($n = 16$) zeigen diesbezüglich keine Unterschiede. Die Datenpunkte symbolisieren den individuellen Wert der jeweiligen Maus und der Mittelwert \pm SEM ist mittels der Balken dargestellt. Signifikante Unterschiede sind durch (***) ($p < 0,001$) verdeutlicht.

worden (IRAG1-WT: $0,0028 \pm 0,0001$; IRAG1-KO: $0,0045 \pm 0,0005$). Die Ratio von männlichen IRAG1-KO Mäusen hat sich dagegen nicht signifikant von der Ratio der entsprechenden IRAG1-WT Mäuse unterschieden (IRAG1-WT: $0,0025 \pm 0,0002$; IRAG1-KO: $0,0028 \pm 0,0004$).

Die globale *Irag1*-Defizienz führt somit zu einer Splenomegalie, die sich interessanterweise hauptsächlich bei weiblichen Mäusen zeigt, während männliche Mäuse offenbar durch das Fehlen von IRAG1 diesen Phänotyp nicht entwickeln.

5.3.2 Milz- und Körpergewicht von sieben Wochen alten Mäusen

Die globale *Irag1*-Defizienz führt bei 15 Wochen alten weiblichen Mäusen zu einer Splenomegalie (s. 5.3.1). In Folge dieses Ergebnisses ist die Frage aufgekommen, ob auch jüngere *Irag1*-defiziente Mäuse bereits eine Splenomegalie entwickelt haben. Von PKGI-Rescue Mäusen ist nämlich bekannt, dass diese bereits ab einem Alter von sechs Wochen eine vergrößerte Milz aufweisen (Föller et al. 2008). Um diese Fragestellung zu beantworten, sind sieben Wochen

alte IRAG1-WT und IRAG1-KO Mäuse untersucht worden. Bei diesen Mäusen ist bereits im Alter von sechs Wochen die Untersuchung auf okkultes Blut erfolgt (s. 5.2.2).

Die Analyse des Milzgewichtes hat ergeben, dass zwischen den beiden Genotypen IRAG1-WT und IRAG1-KO sowohl bei männlichen (IRAG1-WT: $0,0565 \text{ g} \pm 0,00414 \text{ g}$; IRAG1-KO: $0,0527 \text{ g} \pm 0,0089 \text{ g}$) als auch bei weiblichen Mäusen (IRAG1-WT: $0,0484 \text{ g} \pm 0,0018 \text{ g}$; IRAG1-KO: $0,0555 \text{ g} \pm 0,0062 \text{ g}$) und in der Gesamtauswertung beider Geschlechter (IRAG1-WT: $0,0511 \text{ g} \pm 0,0021 \text{ g}$; IRAG1-KO: $0,0544 \text{ g} \pm 0,0049 \text{ g}$) kein Unterschied zu finden war (s. Abbildung 5.5A).

Auch die Körpergewichte haben sich zwischen IRAG1-KO Mäusen (gesamt: $19,44 \text{ g} \pm 0,84 \text{ g}$; männlich: $21,56 \text{ g} \pm 1,39 \text{ g}$; weiblich: $18,02 \text{ g} \pm 0,57 \text{ g}$) und deren WT-Wurfgeschwister (gesamt: $20,37 \text{ g} \pm 0,80 \text{ g}$; männlich: $23,36 \text{ g} \pm 0,31 \text{ g}$; weiblich: $18,88 \text{ g} \pm 0,44 \text{ g}$) nicht unterschieden (s. Abbildung 5.5B).

Das Verhältnis (Ratio) aus Milzgewicht zu Körpergewicht ist, unabhängig des jeweiligen Geschlechts, ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich zwischen IRAG1-WT (gesamt: $0,0025 \pm 0,0001$; männlich: $0,0024 \pm 0,0002$; weiblich: $0,0026 \pm 0,0001$) und IRAG1-KO Mäusen (gesamt: $0,0028 \pm 0,0002$; männlich: $0,0024 \pm 0,0003$; weiblich: $0,0031 \pm 0,0003$) gewesen (s. Abbildung 5.5C). Eine leichte Tendenz zu einer vergrößerten Milz kann bei

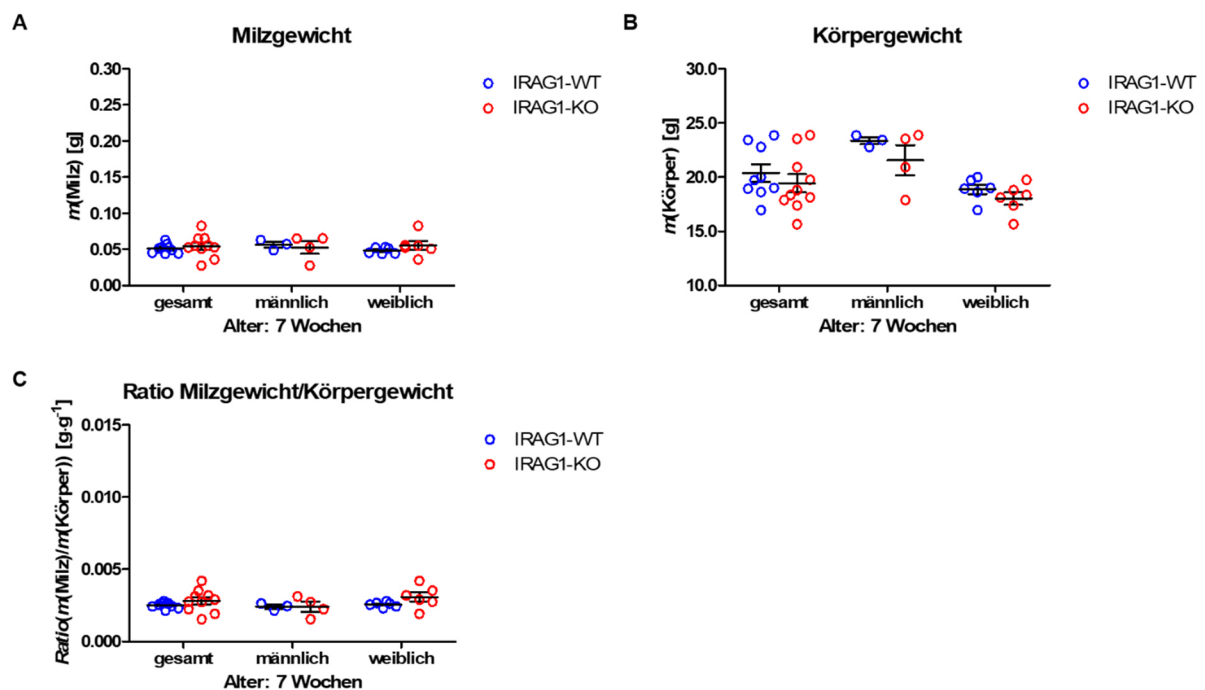


Abbildung 5.5: Milzgewicht, Körpergewicht und Ratio von sieben Wochen alten Mäusen.

A: Das Milzgewicht von IRAG1-WT Mäusen (gesamt: $n = 9$; männlich: $n = 3$; weiblich: $n = 6$) unterscheidet sich nicht im Vergleich zum Milzgewicht von IRAG1-KO Mäusen (gesamt: $n = 10$; männlich: $n = 4$; weiblich: $n = 6$). **B:** Es liegen keine signifikanten Unterschiede zwischen IRAG1-WT (gesamt: $n = 9$; männlich: $n = 3$; weiblich: $n = 6$) und IRAG1-KO Mäusen (gesamt: $n = 10$; männlich: $n = 4$; weiblich: $n = 6$) in Bezug auf das Körpergewicht vor. **C:** Die Ratio aus Milz- zu Körpergewicht ist im Vergleich zwischen IRAG1-WT (gesamt: $n = 9$; männlich: $n = 3$; weiblich: $n = 6$) und IRAG1-KO Mäusen (gesamt: $n = 10$; männlich: $n = 4$; weiblich: $n = 6$) nicht unterschiedlich. Die Datenpunkte symbolisieren den individuellen Wert der jeweiligen Maus und der Mittelwert \pm SEM ist mittels der Balken dargestellt.

weiblichen IRAG1-KO Mäusen und in der Gesamtauswertung der IRAG1-KO Mäuse vermutet werden, was sich durch die leicht größere Ratio gegenüber den Wildtypen zeigt.

Die globale *Irag1*-Defizienz führt bei sieben Wochen alten Mäusen, im Gegensatz zu 15 Wochen alten Mäusen (s. 5.3.1), nicht zu einer Vergrößerung der Milz.

5.4 Hämatologische Untersuchung von globalen *Irag1*-defizienten Mäusen

Als Folge der gastrointestinalen Blutungen (s. 5.2.1) und der Splenomegalie (s. 5.3.1) bei globalen IRAG1-KO Mäusen, sind in diesem Abschnitt die wichtigsten hämatologischen Parameter untersucht worden. Das Ziel war dabei herauszufinden, ob die gastrointestinalen Blutungen und die Splenomegalie – ähnlich wie bei globalen *Prkg1*-defizienten Mäusen (Föller et al. 2008; Angermeier et al. 2016) – zu einer Anämie führen.

5.4.1 Hämatologische Parameter von 15 Wochen alten Mäusen

Um zu verhindern, dass es zu einer Verzerrung bei der Beurteilung der Ergebnisse kommt, sind die hämatologischen Parameter an den Mäusen bestimmt worden, bei denen bereits der Hemocult[®]-Test (s. 5.2.1) durchgeführt und die Milzen (s. 5.3.1) charakterisiert worden sind.

Die Analyse des Hämatokritwertes hat ergeben, dass es bei weiblichen IRAG1-KO Mäusen zu einer signifikanten Abnahme kommt im Vergleich zu den WT-Wurfgeschwistern (IRAG1-WT: $50,3\% \pm 1,5\%$; IRAG1-KO: $43,3\% \pm 2,2\%$) (s. Abbildung 5.6A). Dieses ist auch bei der Gesamtauswertung beider Geschlechter zu beobachten gewesen (IRAG1-WT: $49,9\% \pm 0,9\%$; IRAG1-KO: $45,1\% \pm 1,4\%$). Männliche IRAG1-KO Mäuse zeigen im Vergleich mit IRAG1-WT Mäusen zwar auch eine leichte Abnahme des Hämatokritwertes (IRAG1-WT: $49,5\% \pm 1,0\%$; IRAG1-KO: $46,9\% \pm 1,7\%$), diese ist aber nicht signifikant.

Bei der Bestimmung der Erythrozytenzahl ist ein ähnliches Ergebnis zu beobachten gewesen (s. Abbildung 5.6B). Die Anzahl der Erythrozyten ist bei weiblichen *Irag1*-defizienten Mäusen, wie schon beim Hämatokritwert, deutlich reduziert gewesen gegenüber den IRAG1-WT Mäusen (IRAG1-WT: $8,92 \cdot 10^6 \mu\text{l}^{-1} \pm 0,38 \cdot 10^6 \mu\text{l}^{-1}$; IRAG1-KO: $5,90 \cdot 10^6 \mu\text{l}^{-1} \pm 0,43 \cdot 10^6 \mu\text{l}^{-1}$). Männliche IRAG1-WT und IRAG1-KO Mäuse haben sich dagegen nur minimal und nicht signifikant in der Zahl der Erythrozyten unterschieden (IRAG1-WT: $9,60 \cdot 10^6 \mu\text{l}^{-1} \pm 0,46 \cdot 10^6 \mu\text{l}^{-1}$; IRAG1-KO: $8,58 \cdot 10^6 \mu\text{l}^{-1} \pm 0,47 \cdot 10^6 \mu\text{l}^{-1}$). Die geschlechtsunabhängige Auswertung hat ein vergleichbares Ergebnis, wie bei den weiblichen *Irag1*-defizienten Mäusen, bezüglich der

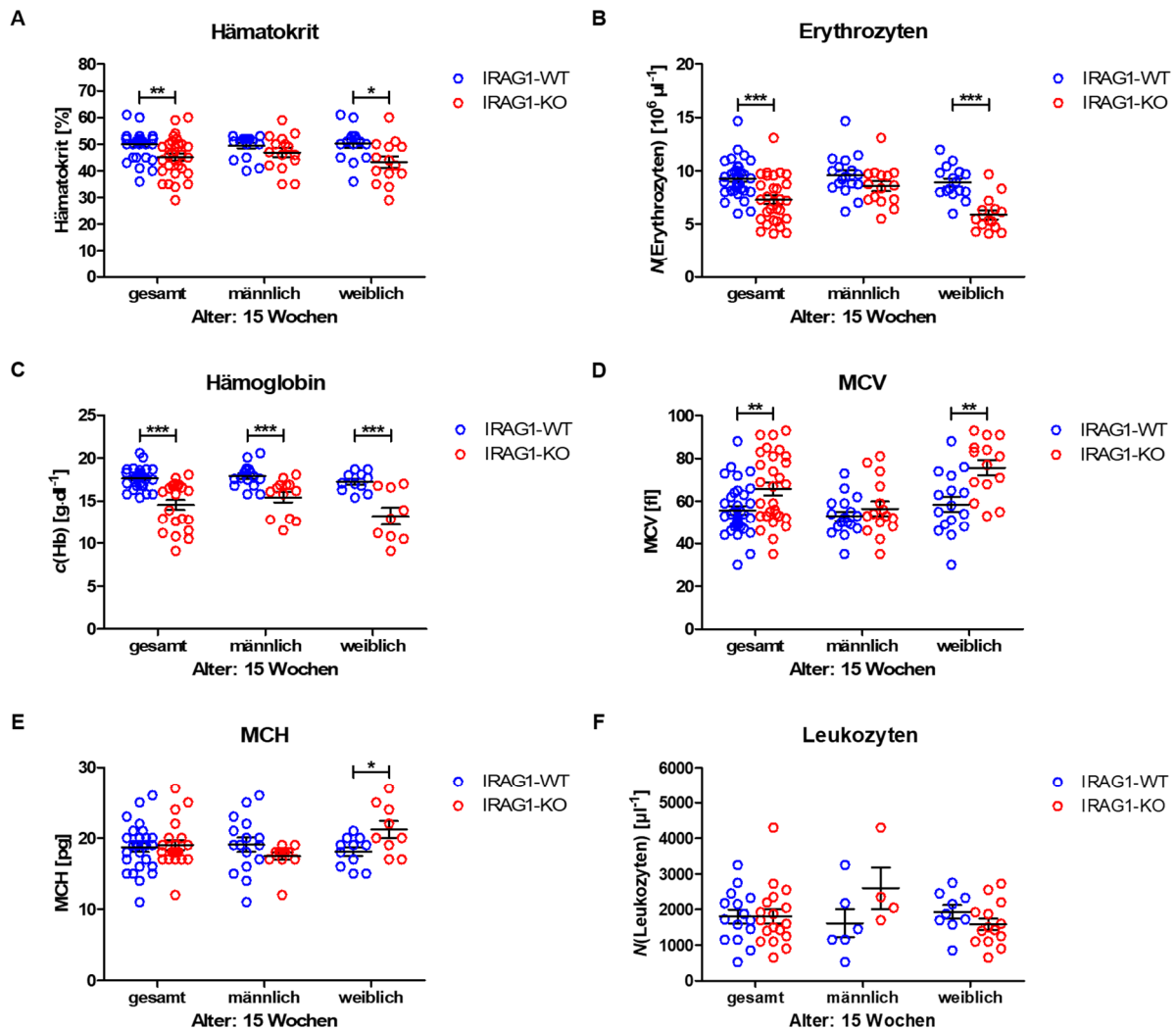


Abbildung 5.6: Hämatologische Parameter von 15 Wochen alten Mäusen.

A: Der Hämatokritwert ist bei weiblichen IRAG1-KO Mäusen und in der Gesamtauswertung (gesamt: $n = 29$; weiblich: $n = 14$) signifikant erniedrigt gegenüber den entsprechenden IRAG1-WT Mäusen (gesamt: $n = 33$; weiblich: $n = 16$). Bei männlichen Mäusen unterscheidet sich der Hämatokrit zwischen den beiden Genotypen nicht (IRAG1-WT: $n = 17$; IRAG1-KO: $n = 15$). **B:** Die Zahl der Erythrozyten ist bei weiblichen IRAG1-KO Mäusen und in der Gesamtauswertung (gesamt: $n = 29$; weiblich: $n = 14$) verglichen mit den Wildtypen (gesamt: $n = 33$; weiblich: $n = 16$) signifikant erniedrigt, wohingegen bei männlichen Mäusen kein Unterschied feststellbar war (IRAG1-WT: $n = 17$; IRAG1-KO: $n = 15$). **C:** Durch die *Irag1*-Defizienz kommt es bei den IRAG1-KO Mäusen (gesamt: $n = 22$; männlich: $n = 13$; weiblich: $n = 9$) im Vergleich zu den IRAG1-WT Mäusen (gesamt: $n = 27$; männlich: $n = 16$; weiblich: $n = 11$) zu einer signifikanten Reduktion der Hämoglobinkonzentration (Hb). **D:** Das MCV ist durch die *Irag1*-Deletion, verglichen mit den entsprechenden IRAG1-WT Mäusen (gesamt: $n = 33$; weiblich: $n = 16$), bei weiblichen IRAG1-KO Mäusen und in der Gesamtanalyse (gesamt: $n = 29$; weiblich: $n = 14$) signifikant erhöht, während bei männlichen Mäusen kein Unterschied festzustellen ist (IRAG1-WT: $n = 17$; IRAG1-KO: $n = 15$). **E:** Weibliche IRAG1-KO Mäuse ($n = 9$) haben ein signifikant höheres MCH gegenüber IRAG1-WT Mäusen ($n = 11$). In der Gesamtauswertung (IRAG1-WT: $n = 27$; IRAG1-KO: $n = 22$) und bei männlichen Mäusen (IRAG1-WT: $n = 27$; IRAG1-KO: $n = 22$) unterscheidet sich das MCH nicht zwischen den beiden Genotypen. **F:** Die Leukozytenzahl unterscheidet sich zwischen IRAG1-WT (gesamt: $n = 15$; männlich: $n = 6$; weiblich: $n = 9$) und IRAG1-KO Mäusen (gesamt: $n = 18$; männlich: $n = 4$; weiblich: $n = 14$) nicht. Die Datenpunkte symbolisieren den individuellen Wert der jeweiligen Maus und der Mittelwert \pm SEM ist mittels der Balken dargestellt. Signifikante Unterschiede sind durch (*) ($p < 0,05$), (**) ($p < 0,01$) und (***) ($p < 0,001$) verdeutlicht.

Abnahme der Erythrozyten in IRAG1-KO Mäusen im Vergleich mit den Wildtypen ergeben (IRAG1-WT: $9,27 \cdot 10^6 \mu\text{l}^{-1} \pm 0,30 \cdot 10^6 \mu\text{l}^{-1}$; IRAG1-KO: $7,28 \cdot 10^6 \mu\text{l}^{-1} \pm 0,41 \cdot 10^6 \mu\text{l}^{-1}$).

Im Rahmen der hämatologischen Charakterisierung von globalen *Irag1*^{-/-}-Mäusen ist auch die Konzentration des Hämoglobins (Hb) bestimmt worden. Es ist eine signifikante Reduktion der Hämoglobinkonzentration bei IRAG1-KO Mäusen gegenüber den IRAG1-WT Mäusen zu

beobachtet gewesen, sowohl in der geschlechtsunabhängigen Auswertung (IRAG1-WT: $17,6 \text{ g}\cdot\text{dl}^{-1} \pm 0,2 \text{ g}\cdot\text{dl}^{-1}$; IRAG1-KO: $14,5 \text{ g}\cdot\text{dl}^{-1} \pm 0,6 \text{ g}\cdot\text{dl}^{-1}$) als auch bei männlichen (IRAG1-WT: $17,9 \text{ g}\cdot\text{dl}^{-1} \pm 0,3 \text{ g}\cdot\text{dl}^{-1}$; IRAG1-KO: $15,5 \text{ g}\cdot\text{dl}^{-1} \pm 0,6 \text{ g}\cdot\text{dl}^{-1}$) und weiblichen Mäusen (IRAG1-WT: $17,2 \text{ g}\cdot\text{dl}^{-1} \pm 0,3 \text{ g}\cdot\text{dl}^{-1}$; IRAG1-KO: $13,2 \text{ g}\cdot\text{dl}^{-1} \pm 1,0 \text{ g}\cdot\text{dl}^{-1}$) (s. Abbildung 5.6C). Die Berechnung des mittleren Erythrozytenvolumens (MCV), aus den zuvor bestimmten Hämatokritwerten und der Anzahl der Erythrozyten, hat ergeben, dass es bei weiblichen IRAG1-KO Mäusen im Vergleich zu IRAG1-WT Mäusen zu einer signifikanten MCV-Erhöhung gekommen ist (IRAG1-WT: $58,6 \text{ fl} \pm 3,7 \text{ fl}$; IRAG1-KO: $75,7 \text{ fl} \pm 3,6 \text{ fl}$) (s. Abbildung 5.6D). Diese signifikante Zunahme des MCVs hat sich auch bei der geschlechtsunabhängigen Auswertung bei IRAG1-KO Mäusen gezeigt (IRAG1-WT: $55,7 \text{ fl} \pm 2,1 \text{ fl}$; IRAG1-KO: $65,8 \text{ fl} \pm 3,0 \text{ fl}$). Männliche globale *Irag1*^{-/-}-Mäuse haben dagegen kein erhöhtes MCV im Vergleich zu ihren WT-Wurfgeschwistern (IRAG1-WT: $53,0 \text{ fl} \pm 2,2 \text{ fl}$; IRAG1-KO: $56,6 \text{ fl} \pm 3,4 \text{ fl}$).

Das mittlere korpuskuläre Hämoglobin (MCH) – berechnet aus dem Quotienten aus Hämoglobin und der Anzahl der Erythrozyten – ist nur bei weiblichen IRAG1-KO Mäusen signifikant erhöht gewesen (IRAG1-WT: $18,2 \text{ pg} \pm 0,6 \text{ pg}$; IRAG1-KO: $21,3 \text{ pg} \pm 1,1 \text{ pg}$) (s. Abbildung 5.6E). Bei männlichen Mäusen (IRAG1-WT: $19,2 \text{ pg} \pm 1,0 \text{ pg}$; IRAG1-KO: $17,5 \text{ pg} \pm 0,5 \text{ pg}$) und in der Gesamtauswertung (IRAG1-WT: $18,8 \text{ pg} \pm 0,6 \text{ pg}$; IRAG1-KO: $19,1 \text{ pg} \pm 0,8 \text{ pg}$) ist es zu keiner Veränderung der MCH-Werte zwischen IRAG1-WT und -KO Mäusen gekommen.

Um den Überblick über den hämatologischen Status der globalen *Irag1*-defizienten Mäuse zu komplettieren, ist abschließend noch die Anzahl der Leukozyten bestimmt worden (s. Abbildung 5.6F). Hierbei sind keine signifikanten Unterschiede in der Leukozytenzahl zwischen den beiden Genotypen bei männlichen (IRAG1-WT: $1617 \mu\text{l}^{-1} \pm 393 \mu\text{l}^{-1}$; IRAG1-KO: $2600 \mu\text{l}^{-1} \pm 582 \mu\text{l}^{-1}$) und weiblichen Mäusen (IRAG1-WT: $1933 \mu\text{l}^{-1} \pm 188 \mu\text{l}^{-1}$; IRAG1-KO: $1586 \mu\text{l}^{-1} \pm 162 \mu\text{l}^{-1}$) zu beobachten gewesen. Auch in der Gesamtauswertung sind keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen festgestellt worden (IRAG1-WT: $1807 \mu\text{l}^{-1} \pm 189 \mu\text{l}^{-1}$; IRAG1-KO: $1811 \mu\text{l}^{-1} \pm 189 \mu\text{l}^{-1}$).

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass die globale *Irag1*-Defizienz zu einer makrozytären Anämie führt, die aber hauptsächlich bei weiblichen *Irag1*^{-/-}-Mäusen auftritt. Die Anzahl der Leukozyten ist dagegen nicht von der fehlenden Expression von IRAG1 betroffen.

5.4.2 Hämatologische Parameter von sieben Wochen alten Mäusen

Um die Frage zu beantworten, ob auch junge globale *Irag1*^{-/-}-Mäuse – ähnlich zu den PKGI-Rescue Mäusen (Föller et al. 2008) – bereits eine Anämie entwickelt haben, sind in einem nächsten Schritt bei sieben Wochen alten IRAG1-KO Mäusen ebenfalls die wichtigsten hämatologischen Parameter bestimmt worden. Wie bereits in 5.4.1 dargelegt, sind auch bei dieser Versuchsreihe die hämatologischen Parameter der sieben Wochen alten Mäuse an den Mäusen bestimmt worden, bei welchen bereits der Haemocult[®]-Test (s. 5.2.2) und die Milzen (s. 5.3.2) charakterisiert worden sind.

Die Hämatokritwerte sind bei IRAG1-KO Mäusen im Vergleich zu den WT-Wurfgeschwistern bei männlichen (IRAG1-WT: 49,3% ± 1,8%; IRAG1-KO: 48,8% ± 0,9%) und weiblichen (IRAG1-WT: 51,5% ± 0,7%; IRAG1-KO: 48,3% ± 1,0%) Mäusen sowie auch in der geschlechtsunabhängigen Auswertung (IRAG1-WT: 50,8% ± 0,8%; IRAG1-KO: 48,5% ± 0,7%) nicht verändert gewesen (s. Abbildung 5.7A).

Bei der Anzahl der Erythrozyten hat sich gezeigt, dass eine leichte Erniedrigung der Erythrozytenzahl bei IRAG1-KO Tieren im Vergleich zu den WT-Tieren zu beobachten gewesen ist. Diese Erniedrigung ist aber bei männlichen (IRAG1-WT: $7,57 \cdot 10^6 \mu\text{l}^{-1} \pm 0,49 \cdot 10^6 \mu\text{l}^{-1}$; IRAG1-KO: $6,98 \cdot 10^6 \mu\text{l}^{-1} \pm 0,45 \cdot 10^6 \mu\text{l}^{-1}$) sowie bei weiblichen Mäusen (IRAG1-WT: $7,96 \cdot 10^6 \mu\text{l}^{-1} \pm 0,21 \cdot 10^6 \mu\text{l}^{-1}$; IRAG1-KO: $7,54 \cdot 10^6 \mu\text{l}^{-1} \pm 0,28 \cdot 10^6 \mu\text{l}^{-1}$) und in der Gesamtauswertung (IRAG1-WT: $7,83 \cdot 10^6 \mu\text{l}^{-1} \pm 0,21 \cdot 10^6 \mu\text{l}^{-1}$; IRAG1-KO: $7,32 \cdot 10^6 \mu\text{l}^{-1} \pm 0,28 \cdot 10^6 \mu\text{l}^{-1}$) nicht signifikant unterschiedlich gewesen (s. Abbildung 5.7B).

Die Messungen der Hämoglobinkonzentration haben ein ähnliches Ergebnis wie bei den Erythrozyten ergeben (s. Abbildung 5.7C). Das Hämoglobin ist in IRAG1-KO Mäusen ebenfalls erniedrigt im Vergleich zu den Wildtypen. Der Unterschied ist bei männlichen (IRAG1-WT: $15,8 \text{ g} \cdot \text{dl}^{-1} \pm 0,8 \text{ g} \cdot \text{dl}^{-1}$; IRAG1-KO: $15,0 \text{ g} \cdot \text{dl}^{-1} \pm 0,6 \text{ g} \cdot \text{dl}^{-1}$) und weiblichen Mäusen (IRAG1-WT: $15,6 \text{ g} \cdot \text{dl}^{-1} \pm 0,5 \text{ g} \cdot \text{dl}^{-1}$; IRAG1-KO: $14,4 \text{ g} \cdot \text{dl}^{-1} \pm 0,4 \text{ g} \cdot \text{dl}^{-1}$) sowie in der Gesamtauswertung (IRAG1-WT: $15,7 \text{ g} \cdot \text{dl}^{-1} \pm 0,4 \text{ g} \cdot \text{dl}^{-1}$; IRAG1-KO: $14,6 \text{ g} \cdot \text{dl}^{-1} \pm 0,3 \text{ g} \cdot \text{dl}^{-1}$) aber nicht signifikant.

Das MCV ist bei beiden Geschlechtern und in der Gesamtauswertung zwischen IRAG1-WT (gesamt: $65,1 \text{ fl} \pm 1,2 \text{ fl}$; männlich: $65,5 \text{ fl} \pm 2,9 \text{ fl}$; weiblich: $64,9 \text{ fl} \pm 1,3 \text{ fl}$) und den IRAG1-KO Mäusen (gesamt: $67,0 \text{ fl} \pm 2,4 \text{ fl}$; männlich: $71,1 \text{ fl} \pm 5,3 \text{ fl}$; weiblich: $64,3 \text{ fl} \pm 1,5 \text{ fl}$) nicht verändert gewesen (s. Abbildung 5.7D). Für das MCH hat sich zwischen IRAG1-WT Mäusen (gesamt: $20,1 \text{ pg} \pm 0,8 \text{ pg}$; männlich: $21,2 \text{ pg} \pm 2,5 \text{ pg}$; weiblich: $19,6 \text{ pg} \pm 0,5 \text{ pg}$) und

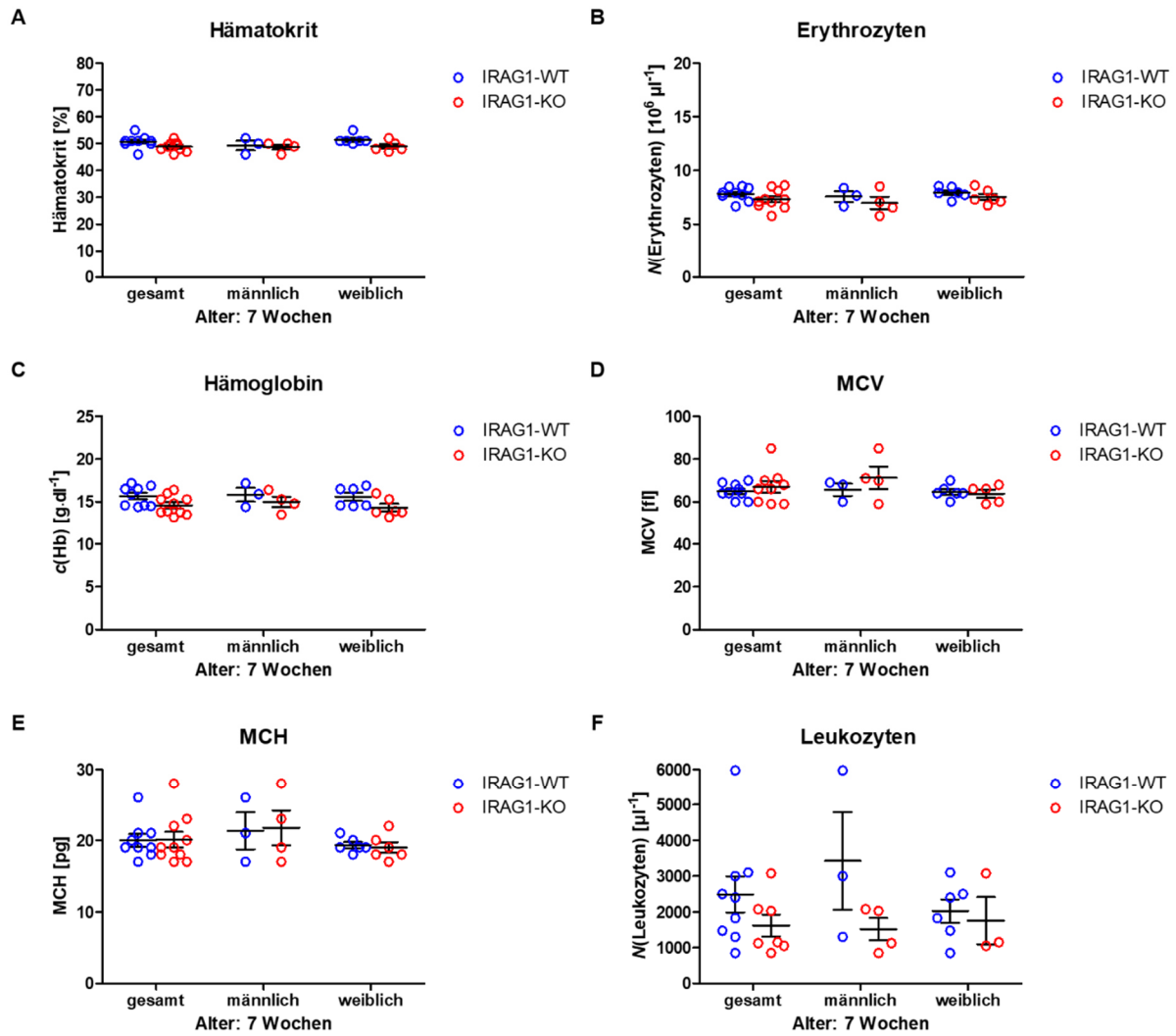


Abbildung 5.7: Hämatologische Parameter von sieben Wochen alten Mäusen.

A: Die Hämatokritwerte unterscheiden sich nicht zwischen IRAG1-WT (gesamt: $n = 9$; männlich: $n = 3$; weiblich: $n = 6$) und IRAG1-KO Mäusen (gesamt: $n = 9$; männlich: $n = 4$; weiblich: $n = 5$). **B:** Bei der Bestimmung der Erythrozytenzahl haben sich keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen IRAG1-WT (gesamt: $n = 9$; männlich: $n = 3$; weiblich: $n = 6$) und IRAG1-KO (gesamt: $n = 10$; männlich: $n = 4$; weiblich: $n = 6$) gezeigt. **C:** Zwischen IRAG1-KO (gesamt: $n = 10$; männlich: $n = 4$; weiblich: $n = 6$) und IRAG1-WT Mäusen (gesamt: $n = 9$; männlich: $n = 3$; weiblich: $n = 6$) kommt es unabhängig des Geschlechts nur zu einer minimalen und nicht signifikanten Erniedrigung der Hämoglobinkonzentration (Hb). **D:** Der Vergleich von IRAG1-WT Mäusen (gesamt: $n = 9$; männlich: $n = 3$; weiblich: $n = 6$) mit IRAG1-KO Mäusen (gesamt: $n = 9$; männlich: $n = 4$; weiblich: $n = 5$) hat keine Unterschiede bezüglich MCV ergeben. **E:** Wie schon beim MCV liegen auch beim MCH keine Unterschiede zwischen IRAG1-KO (gesamt: $n = 10$; männlich: $n = 4$; weiblich: $n = 6$) und IRAG1-WT Mäusen (gesamt: $n = 9$; männlich: $n = 3$; weiblich: $n = 6$) vor. **F:** Die Anzahl der Leukozyten unterscheidet sich nicht zwischen IRAG1-KO Mäusen (gesamt: $n = 7$; männlich: $n = 4$; weiblich: $n = 3$) und den entsprechenden Wildtypen (gesamt: $n = 9$; männlich: $n = 3$; weiblich: $n = 6$). Die Datenpunkte symbolisieren den individuellen Wert der jeweiligen Maus und der Mittelwert \pm SEM ist mittels der Balken dargestellt.

IRAG1-KO Mäusen (gesamt: $20,3 \text{ pg} \pm 1,1 \text{ pg}$; männlich: $22,1 \text{ pg} \pm 2,4 \text{ pg}$; weiblich: $19,1 \text{ pg} \pm 0,7 \text{ pg}$) ebenfalls kein signifikanter Unterschied gezeigt (s. Abbildung 5.7E).

Auch die Anzahl der Leukozyten ist durch die *Irag1*-Defizienz nicht beeinflusst. Es sind weder bei männlichen (IRAG1-WT: $3425 \mu\text{l}^{-1} \pm 1336 \mu\text{l}^{-1}$; IRAG1-KO: $1519 \mu\text{l}^{-1} \pm 312 \mu\text{l}^{-1}$) und weiblichen Mäusen (IRAG1-WT: $2025 \mu\text{l}^{-1} \pm 329 \mu\text{l}^{-1}$; IRAG1-KO: $1758 \mu\text{l}^{-1} \pm 659 \mu\text{l}^{-1}$) noch in der Gesamtauswertung (IRAG1-WT: $2492 \mu\text{l}^{-1} \pm 505 \mu\text{l}^{-1}$; IRAG1-KO: $1621 \mu\text{l}^{-1} \pm 304 \mu\text{l}^{-1}$)

von IRAG1-KO Mäusen signifikante Unterschiede gegenüber IRAG1-WT Mäusen festzustellen gewesen (s. Abbildung 5.7F).

Globale *Irag1*-defiziente Mäuse leiden in einem Alter von sieben Wochen somit noch nicht an einer Anämie. Es ist allerdings eine leichte Tendenz zur Abnahme der Anzahl der Erythrozyten und des Hämoglobins zu beobachten.

5.4.3 Hämatologische Parameter von über 54 Wochen alten Mäusen

Als Konsequenz aus den bisherigen Ergebnissen der Blutwerte von *Irag1*^{-/-}-Mäusen ist die Frage aufgekommen, ob die Blutbildung durch die *Irag1*-Defizienz beeinflusst sein könnte. Dies wäre eine weitere Ursache für die Anämie neben den beschriebenen gastrointestinalen Blutungen (s. 5.2.1). Um die Funktionalität der Blutbildung beurteilen zu können, eignen sich die Retikulozyten – die direkten Vorläuferzellen der Erythrozyten – besonders gut als Marker. Von den Retikulozyten ist bekannt, dass sie in globalen *Prkg1*^{-/-}-Mäusen erhöht sind (Föller et al. 2008; Angermeier et al. 2016). Für diese Untersuchungen sind sehr alte Mäuse (Alter: > 54 Wochen) verwendet worden, da so sichergestellt ist, dass mit der ermittelten Retikulozytenzahl eine sichere Aussage über die Blutbildung bei *Irag1*-defizienten Tieren getroffen werden kann. Allerdings ist bei der Beurteilung der Ergebnisse zu beachten, dass aufgrund des hohen Alters der Tiere nur eine sehr geringe Gesamtzahl an Tieren und besonders an *Irag1*^{-/-}-Mäusen zur Verfügung gestanden hat. Deshalb konnte nur bei der geschlechtsunabhängigen Auswertung („gesamt“) eine statistische Analyse erfolgen.

Die Bestimmung der Hämatokritwerte hat gezeigt, dass es in der Gesamtauswertung bei IRAG1-KO Mäusen zu einer signifikanten Abnahme gegenüber den IRAG1-WT Mäusen gekommen ist (IRAG1-WT: 46,6% ± 1,3%; IRAG1-KO: 39,8% ± 0,6%) (s. Abbildung 5.8A). Männliche und weibliche IRAG1-KO Mäuse haben ebenfalls niedrigere Hämatokritwerte aufgewiesen im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypen (männlich: IRAG1-WT: 47,5% ± 1,2%; IRAG1-KO: 41,0%; weiblich: IRAG1-WT: 43,0%; IRAG1-KO: 39,3% ± 0,7%).

Wie auch bereits bei den 15 Wochen alten Mäusen zu beobachten gewesen ist (s. 5.4.1), ist die Zahl der Erythrozyten bei sehr alten IRAG1-KO Mäusen in der Gesamtauswertung (IRAG1-WT: $7,96 \cdot 10^6 \mu\text{l}^{-1} \pm 0,59 \cdot 10^6 \mu\text{l}^{-1}$; IRAG1-KO: $5,57 \cdot 10^6 \mu\text{l}^{-1} \pm 0,75 \cdot 10^6 \mu\text{l}^{-1}$) sowie bei männlichen (IRAG1-WT: $7,96 \cdot 10^6 \mu\text{l}^{-1} \pm 0,68 \cdot 10^6 \mu\text{l}^{-1}$; IRAG1-KO: $7,79 \cdot 10^6 \mu\text{l}^{-1}$) und weiblichen IRAG1-KO Mäusen (IRAG1-WT: $9,04 \cdot 10^6 \mu\text{l}^{-1}$; IRAG1-KO: $4,82 \cdot 10^6 \mu\text{l}^{-1} \pm 0,15 \cdot 10^6 \mu\text{l}^{-1}$) signifikant reduziert im Vergleich zu IRAG1-WT Mäusen (s. Abbildung 5.8B).

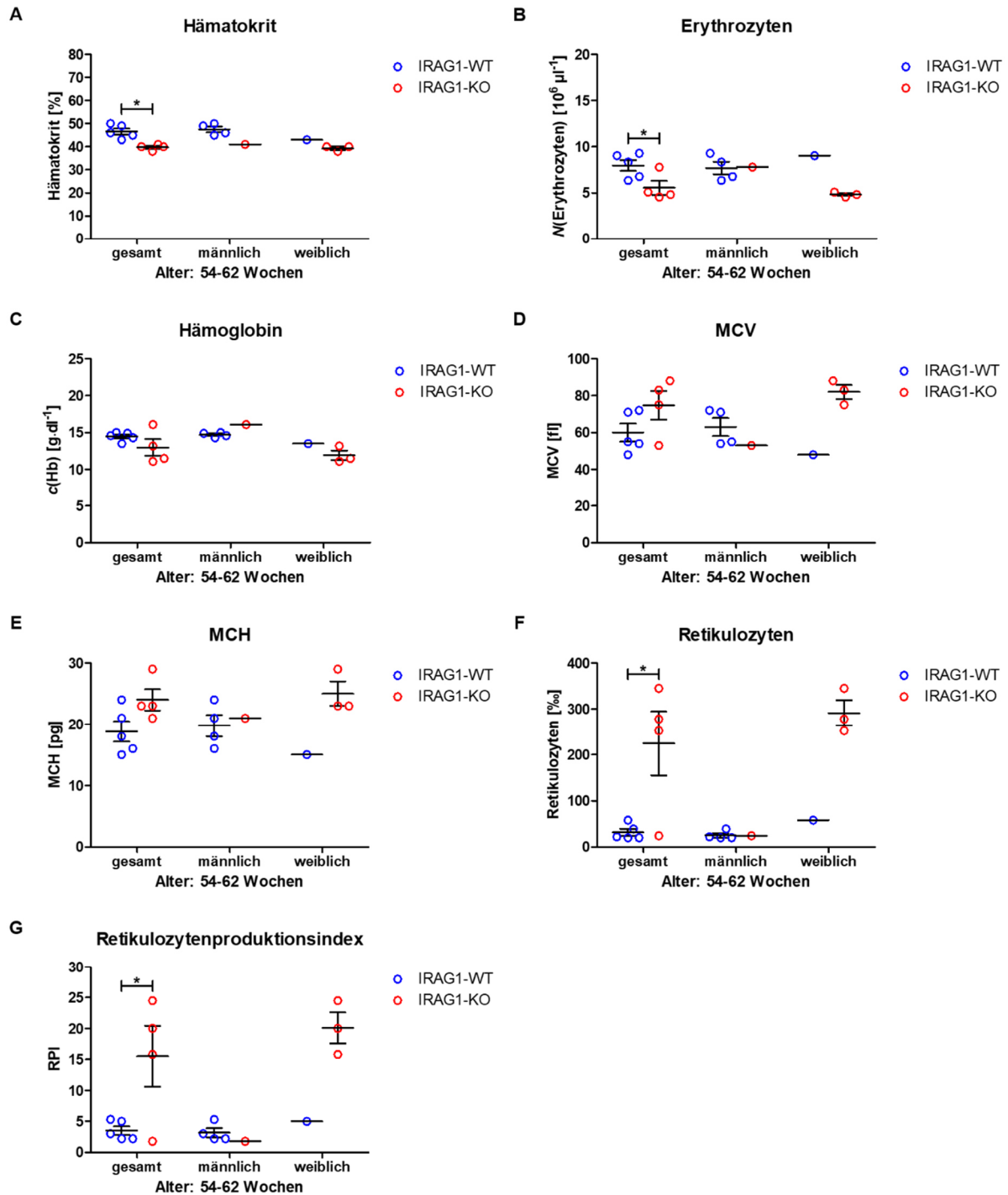


Abbildung 5.8: Hämatologische Parameter von über 54 Wochen alten Mäusen.

A: Reduktion des Hämatokritwertes in IRAG1-KO Mäusen im Vergleich zu IRAG1-WT Mäusen. **B:** Die Anzahl der Erythrozyten ist bei weiblichen IRAG1-KO Mäusen und in der Gesamtauswertung verglichen mit WT-Mäusen reduziert. Bei männlichen Mäusen liegt zwischen den beiden Genotypen kein Unterschied vor. **C:** Männliche IRAG1-KO Mäuse zeigen erhöhte Hämoglobinwerte gegenüber den WT-Kontrollen, während weibliche IRAG1-KO Mäuse und die Gesamtauswertung der IRAG1-KO Mäuse erniedrigte Hämoglobinkonzentrationen aufweisen. **D:** Durch die *Irag1*-Defizienz kommt es in der Gesamtauswertung und bei weiblichen Mäusen zu einer Erhöhung und bei männlichen Mäusen zu einer Erniedrigung des MCVs verglichen mit IRAG1-WT Mäusen. **E:** MCH-Werte von *Irag1*-defizienten Mäusen sind im Vergleich mit IRAG1-WT Mäusen erhöht. **F:** Durch die *Irag1*-Deletion kommt es in der Gesamtauswertung und bei weiblichen Mäusen zu erhöhten Retikulozytenzahlen. Männliche IRAG1-KO Mäusen haben im Vergleich mit IRAG1-WT Mäusen keine veränderte Anzahl an Retikulozyten. **G:** Der Retikulozytenproduktionsindex (RPI) ist bei weiblichen IRAG1-KO Mäusen und in der Gesamtauswertung im Vergleich mit IRAG1-WT Mäusen erhöht. Die Datenpunkte symbolisieren den individuellen Wert der jeweiligen Maus (IRAG1-WT: gesamt: $n = 5$; männlich: $n = 4$; weiblich: $n = 1$; IRAG1-KO: gesamt: $n = 4$; männlich: $n = 1$; weiblich: $n = 3$) und der Mittelwert \pm SEM ist mittels der Balken dargestellt. Signifikante Unterschiede sind durch (*) ($p < 0,05$) verdeutlicht.

Bei den Hämoglobinwerten sind deutlich erniedrigte Werte zwischen IRAG1-KO und IRAG1-WT Mäusen, bei weiblichen Mäusen (IRAG1-WT: $13,5 \text{ g}\cdot\text{dl}^{-1}$; IRAG1-KO: $11,9 \text{ g}\cdot\text{dl}^{-1} \pm 0,6 \text{ g}\cdot\text{dl}^{-1}$) und in der Gesamtauswertung (IRAG1-WT: $14,5 \text{ g}\cdot\text{dl}^{-1} \pm 0,3 \text{ g}\cdot\text{dl}^{-1}$; IRAG1-KO: $13,0 \text{ g}\cdot\text{dl}^{-1} \pm 1,1 \text{ g}\cdot\text{dl}^{-1}$), nachgewiesen worden (s. Abbildung 5.8C). Diese haben sich aber nicht signifikant unterschieden. Bei männlichen IRAG1-KO Mäusen ist es im Vergleich mit Wildtypmäusen dagegen zu einer Erhöhung des Hämoglobinwertes gekommen (IRAG1-WT: $14,7 \text{ g}\cdot\text{dl}^{-1} \pm 0,2 \text{ g}\cdot\text{dl}^{-1}$; IRAG1-KO: $16,1 \text{ g}\cdot\text{dl}^{-1}$).

Die Werte für das MCV sind bei IRAG1-KO Mäusen gegenüber den IRAG1-WT Mäusen in der Gesamtauswertung (IRAG1-WT: $59,9 \text{ fl} \pm 4,9 \text{ fl}$; IRAG1-KO: $74,5 \text{ fl} \pm 7,8 \text{ fl}$) und bei den weiblichen Mäusen (IRAG1-WT: $47,6 \text{ fl}$; IRAG1-KO: $81,8 \text{ fl} \pm 3,8 \text{ fl}$) nicht signifikant erhöht gewesen (s. Abbildung 5.8D). Bei männlichen IRAG1-KO Mäusen sind erniedrigte MCV-Werte im Vergleich zu den WT-Mäusen festgestellt worden (IRAG1-WT: $63,0 \text{ fl} \pm 4,9 \text{ fl}$; IRAG1-KO: $52,6 \text{ fl}$). Dieses Resultat hat sich auch bei der Berechnung des MCHs ergeben (gesamt: IRAG1-WT: $18,7 \text{ pg} \pm 1,6 \text{ pg}$; IRAG1-KO: $23,8 \text{ pg} \pm 1,8 \text{ pg}$; männlich: IRAG1-WT: $19,6 \text{ pg} \pm 1,7 \text{ pg}$; IRAG1-KO: $20,7 \text{ pg}$; weiblich: IRAG1-WT: $14,9 \text{ pg}$; IRAG1-KO: $24,9 \text{ pg} \pm 2,1 \text{ pg}$) (s. Abbildung 5.8E).

In der Gesamtauswertung und bei weiblichen Mäusen ist eine erhöhte Anzahl der Retikulozyten in IRAG1-KO Mäusen im Vergleich zu IRAG1-WT Mäusen (gesamt: IRAG1-WT: $31,8\% \pm 7,4\%$; IRAG1-KO: $224,9\% \pm 69,8\%$; weiblich: IRAG1-WT: $58,0\%$; IRAG1-KO: $291,9\% \pm 27,8\%$) beobachtet worden (s. Abbildung 5.8F). Männliche IRAG1-KO Mäuse haben keine veränderte Retikulozytenzahl gegenüber den Wildtypen aufgewiesen (IRAG1-WT: $31,8\% \pm 4,5\%$; IRAG1-KO: $24,0\%$).

Um die vorliegende Anämie nun genauer zu charakterisieren, ist über die Anzahl der Retikulozyten der Retikulozytenproduktionsindex (RPI) berechnet worden. Der RPI ist – wie auch die Zahl der Retikulozyten – bei weiblichen Mäusen (IRAG1-WT: $5,00$; IRAG1-KO: $20,00 \pm 2,51$) und in der Gesamtauswertung (IRAG1-WT: $3,54 \pm 0,67$; IRAG1-KO: $15,48 \pm 4,89$) bei IRAG1-KO Tieren im Vergleich mit den Wildtypen erhöht (s. Abbildung 5.8G). Keine Unterschiede hat die Berechnung des RPIs zwischen männlichen IRAG1-KO und IRAG1-WT Mäusen (IRAG1-WT: $3,18 \pm 0,73$; IRAG1-KO: $1,80$) ergeben.

Irag1-defiziente Mäuse – die ein sehr hohes Alter aufweisen – leiden ebenfalls an einer Anämie, bei einer – durch den erhöhten RPI bedingt – adäquaten Regeneration des Blutes.

5.5 Charakterisierung der Anämie *Irag1*-defizienter Mäuse

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass die *Irag1*-Defizienz zu einer Anämie (s. 5.4.1, 5.4.3) – vermutlich bedingt durch die gastrointestinalen Blutungen (s. 5.2.1) – führt. Um nun zu klären, um was für eine Art von Anämie es sich handelt, sind weitere Untersuchungen durchgeführt worden. Von globalen *Prkg1*-defizienten Mäusen, deren Phänotypen eine gewisse Ähnlichkeit zu den Phänotypen globaler *Irag1*-defizienter Mäuse aufweisen, ist bekannt, dass diese unter anderem an einem Eisenmangel leiden (Angermeier et al. 2016). Deshalb ist bei der weiteren Charakterisierung der Anämie auch ein Schwerpunkt in Hinblick auf einen möglichen Eisenmangel gelegt worden.

5.5.1 Plasmaeisenkonzentration von IRAG1-WT und IRAG1-KO Mäusen

Irag1-defiziente Mäuse weisen erniedrigte Hämoglobinkonzentrationen auf (s. Abbildung 5.6C). Ein erniedrigter Hämoglobinwert ist ein möglicher Hinweis auf einen Eisenmangel (Clark 2008). Aus diesem Grund ist das Plasma von IRAG1-KO Mäusen untersucht worden.

Die Plasmaeisenkonzentration von weiblichen IRAG1-KO Mäusen ist im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypwurfgeschwistern signifikant erniedrigt gewesen (IRAG1-WT: $183,91 \mu\text{g}\cdot\text{dl}^{-1} \pm 20,08 \mu\text{g}\cdot\text{dl}^{-1}$; IRAG1-KO: $106,56 \mu\text{g}\cdot\text{dl}^{-1} \pm 19,96 \mu\text{g}\cdot\text{dl}^{-1}$) (s. Abbildung 5.9). Dieses Resultat hat sich auch in der Gesamtauswertung (IRAG1-WT: $177,75 \mu\text{g}\cdot\text{dl}^{-1} \pm 13,37 \mu\text{g}\cdot\text{dl}^{-1}$; IRAG1-KO: $122,07 \mu\text{g}\cdot\text{dl}^{-1} \pm 16,15 \mu\text{g}\cdot\text{dl}^{-1}$) gezeigt. Männliche IRAG1-KO

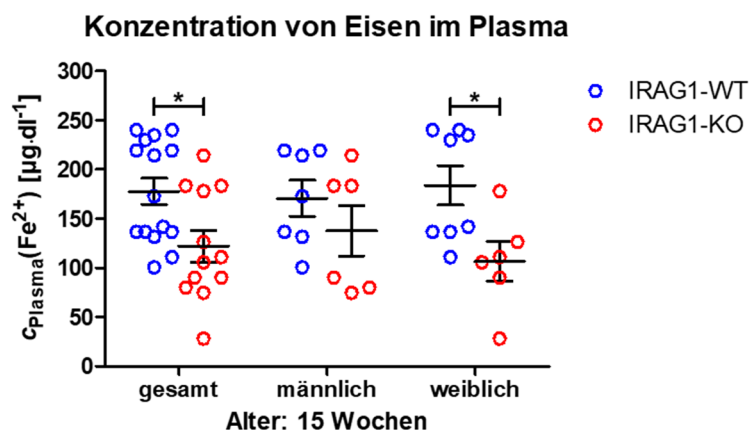


Abbildung 5.9: Konzentration von Eisen im Plasma von 15 Wochen alten Mäusen.

Die Konzentrationen des Eisens im Plasma von *Irag1*-defizienten Mäusen ist bei weiblichen Mäusen und in der Gesamtauswertung signifikant erniedrigt im Vergleich zu den entsprechenden IRAG1-WT Mäusen. Zwischen männlichen IRAG1-WT und IRAG1-KO Mäusen kommt es zu keiner signifikanten Veränderung der Konzentration von Eisen im Plasma. Die Datenpunkte symbolisieren den individuellen Wert der jeweiligen Maus (IRAG1-WT: gesamt: $n = 15$; männlich: $n = 7$; weiblich: $n = 8$; IRAG1-KO: gesamt: $n = 12$; männlich: $n = 6$; weiblich: $n = 6$) und der Mittelwert \pm SEM ist mittels der Balken dargestellt. Signifikante Unterschiede sind durch (*) ($p < 0,05$) verdeutlicht.

Mäuse haben zwar ebenfalls eine leicht erniedrigte Plasmaeisenkonzentration verglichen mit den Wildtypen (IRAG1-WT: $170,70 \mu\text{g}\cdot\text{dl}^{-1} \pm 18,43 \mu\text{g}\cdot\text{dl}^{-1}$; IRAG1-KO: $137,59 \mu\text{g}\cdot\text{dl}^{-1} \pm 25,56 \mu\text{g}\cdot\text{dl}^{-1}$), dieser Unterschied ist aber nicht signifikant.

5.5.2 Proteinexpression der Ferritin Light Chain in Milz und Leber

Zur weiteren Charakterisierung der Anämie ist zusätzlich die Proteinexpression der *Ferritin Light Chain* (FLC) mittels Western Blot in Milzen und Lebern untersucht worden. Mit Hilfe der FLC – einem Bestandteil des Proteins Ferritin – kann eine Aussage über die Eisenspeicher getroffen werden und so ist eine bessere Charakterisierung der Anämie möglich (Silva and Faustino 2015).

Die Proteinexpression der FLC in Milzen von männlichen und weiblichen IRAG1-KO Mäusen ist im Vergleich zu den IRAG1-WT Mäusen signifikant reduziert gewesen, ebenso wie bei der geschlechtsunabhängigen Analyse (s. Abbildung 5.10A, B).

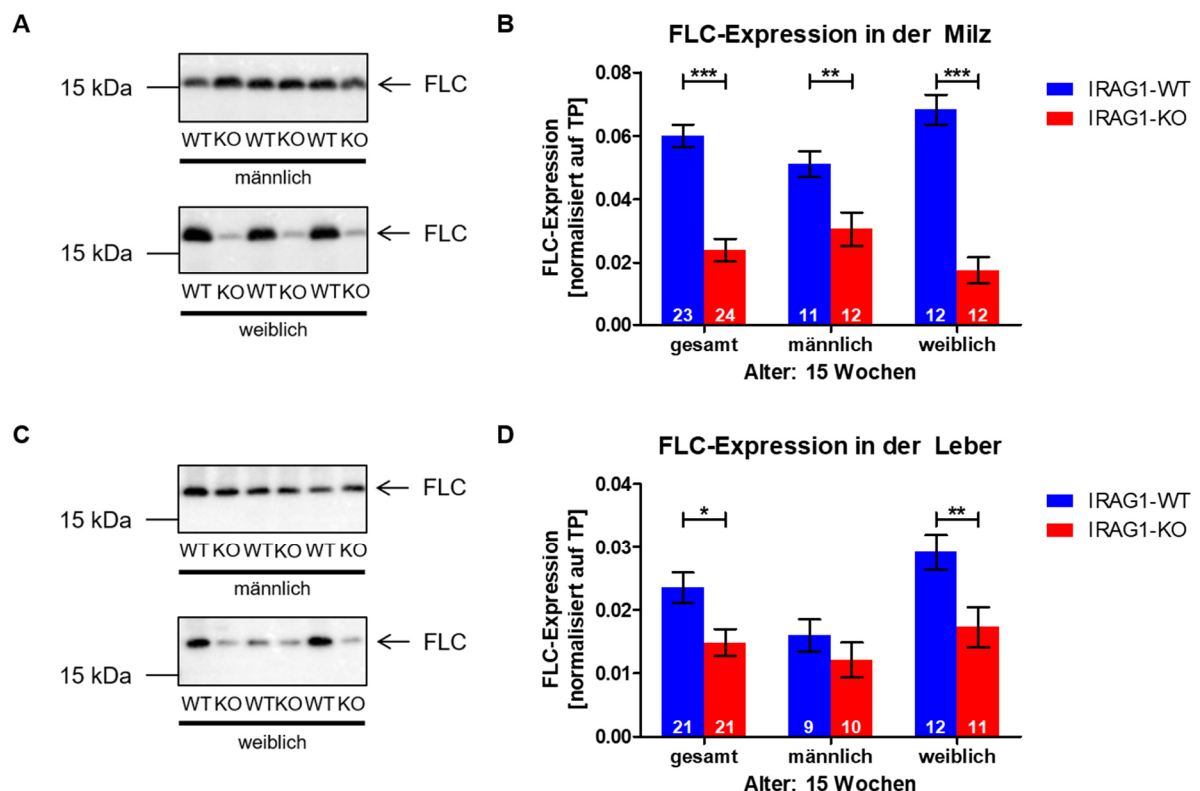


Abbildung 5.10: Proteinexpression der Ferritin Light Chain in Milz und Leber.

A, B: Repräsentative Proteinexpression der *Ferritin Light Chain* (FLC) in Milzen (**A**) und Quantifizierung der FLC-Expression (**B**) von IRAG1-WT (WT) und IRAG1-KO (KO) Mäusen. **C, D:** Repräsentative Proteinexpression der FLC in der Leber (**C**) und Quantifizierung der FLC-Expression (**D**) von IRAG1-WT und IRAG1-KO Mäusen. In den Grafiken **B** und **D** ist der Mittelwert \pm SEM dargestellt und die Zahlen in den Balken geben die Anzahl der jeweils untersuchten Mäuse wieder. Signifikante Unterschiede sind durch (*) ($p < 0,05$), (**) ($p < 0,01$) und (***) ($p < 0,001$) verdeutlicht. Aufnahmen des Totalproteins (TP) sind in Kapitel 8.1 (s. Abbildung 8.1) zu finden.

Bei der Analyse der Lebern hat sich ein ähnliches Bild ergeben. Die FLC-Expression ist ebenfalls in den IRAG1-KO Mäusen gegenüber den Wildtypmäusen erniedrigt gewesen. Allerdings ist der beobachtete Unterschied nur bei den weiblichen Mäusen und in der geschlechtsunabhängigen Auswertung signifikant (s. Abbildung 5.10C, D).

In Verbindung mit der erniedrigten Plasmaeisenkonzentration (s. 5.5.1) und der reduzierten Proteinexpression der FLC führt die *Irag1*-Deletion zu einem Eisenmangel, der – wie auch schon andere Daten dieser Arbeit gezeigt haben – hauptsächlich bei weiblichen *Irag1*^{-/-}-Mäusen vorzufinden ist.

5.5.3 Expression der mRNA von *Hamp* und *Tfr1* in der Leber

Globale *Irag1*-defiziente Mäuse leiden an einem Eisenmangel. Daraus hat sich die Frage ergeben, ob die Abwesenheit von IRAG1 eventuell die Aufnahme von Eisen beeinflussen könnte. Gute Marker zur Beurteilung der Eisenaufnahme sind Heparin (*Hamp*) und der Transferrin-Rezeptor 1 (*Tfr1*) (Hentze et al. 2010). Aus diesem Grund sind deren mRNA-Expressionen in der Leber untersucht worden.

Die mRNA-Spiegel von *Hamp* sind bei IRAG1-KO Mäusen im Vergleich zu den IRAG1-WT Mäusen bei beiden Geschlechtern und in der gemeinsamen Auswertung signifikant reduziert (s. Abbildung 5.11A). Ein Unterschied in der Expression von *Tfr1* ist dagegen zwischen den beiden Genotypen nicht gefunden worden (s. Abbildung 5.11B).

Irag1-defiziente Mäuse haben somit – bedingt durch die reduzierte mRNA von *Hamp* – keine Hemmung der Eisenaufnahme oder Eisenfreisetzung im Körper.

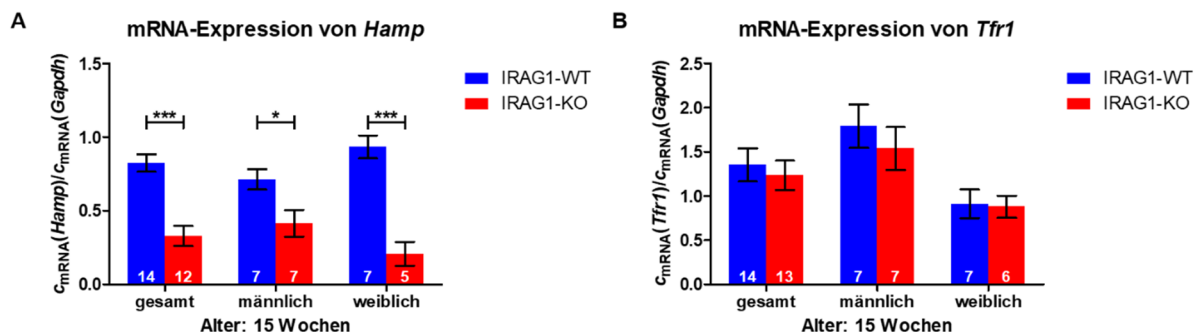


Abbildung 5.11: mRNA-Expression von Heparin und des Transferrin-Rezeptors 1.

In der Leber von 15 Wochen alten IRAG1-WT und IRAG1-KO Mäusen ist die mRNA-Expression von Heparin (*Hamp*) und des Transferrin-Rezeptors 1 (*Tfr1*) untersucht worden. **A:** Die mRNA-Expression von *Hamp* ist in IRAG1-KO Mäusen signifikant niedriger im Vergleich zu IRAG1-WT Mäusen. **B:** Die Expression der mRNA von *Tfr1* wird durch die *Irag1*-Defizienz nicht beeinflusst. In den Grafiken ist der Mittelwert \pm SEM dargestellt und die Zahlen in den Balken geben die Anzahl der jeweils untersuchten Mäuse wieder. Signifikante Unterschiede sind durch (*) ($p < 0,05$) und (***) ($p < 0,001$) verdeutlicht.

5.5.4 Eisenfärbung der Milz

In einem abschließenden Schritt sind histologische Schnitte der Milzen von IRAG1-WT und IRAG1-KO Mäusen mittels Berliner-Blau-Reaktion gefärbt worden. Durch die Färbung wird das in Makrophagen gespeicherte Eisen dargestellt, das diese durch Phagozytose der Erythrozyten aufnehmen (Lüllmann-Rauch 2015).

Die Auswertung der Schnitte zeigt dabei, dass sich das Eisen (blaue Färbung) sowohl in männlichen als auch in weiblichen Milzen von IRAG1-WT Mäusen gut in den Makrophagen darstellen lässt (s. Abbildung 5.12). Dabei sind die Makrophagen in der roten Pulpa der Milz lokalisiert. In der weißen Pulpa ist keine Blaufärbung zu erkennen.

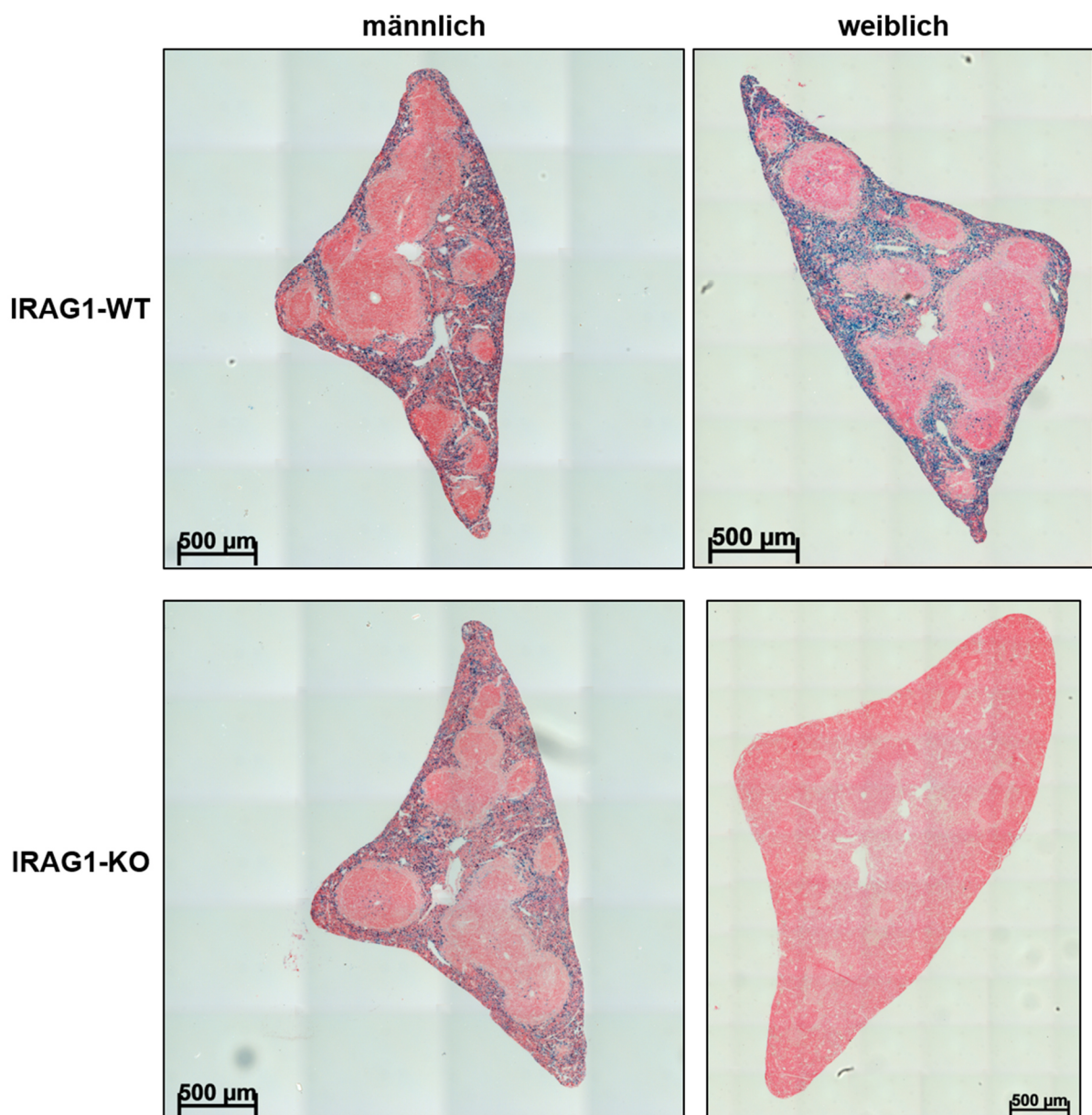


Abbildung 5.12: Eisenfärbung der Milz von IRAG1-WT und IRAG1-KO Mäusen.

Repräsentative Paraffinschnitte der Milzen von IRAG1-WT und IRAG1-KO Mäusen, bei denen mittels Berliner-Blau-Reaktion das in den Makrophagen gespeicherte Eisen (blau) dargestellt wird. In Milzen von IRAG1-WT Mäusen ist eine ausgeprägte Blaufärbung in der roten Pulpa zu erkennen. In männlichen IRAG1-KO Mäusen ist die Eisenfärbung etwas schwächer ausgeprägt, während in den Milzen weiblicher IRAG1-KO Mäuse keine Färbung zu erkennen ist.

Betrachtet man die Milzen der *Iragl*-defizienten Mäuse, so ist die Blaufärbung bei den männlichen Mäusen, verglichen mit den entsprechenden Wildtypen, deutlich reduziert. Bei den weiblichen Mäusen ist kaum bis gar keine Eisenfärbung mehr nachzuweisen (s. Abbildung 5.12).

Der Eisenmangel der *Iragl*-defizienten Mäuse lässt sich somit auch in der Milz mittels histologischer Techniken darstellen und bestätigen.

5.5.5 Konzentration von Vitamin B12 und Folat im Plasma

Eine makrozytäre Anämie – wie sie bei den *Iragl*-defizienten Mäusen (s. Abbildung 5.6D) vorliegt – kann eine mögliche Folge eines Mangels an Vitamin B12 und/oder Folat sein. Aus diesem Grund sind die Konzentrationen von Vitamin B12 und Folat in Plasmaproben von IRAG1-WT und IRAG1-KO Mäusen (Alter: 13-14 Wochen) mittels ELISA bestimmt worden. Die Vitamin B12 Spiegel der weiblichen IRAG1-KO Mäuse sind signifikant erniedrigt im Vergleich zu den WT-Mäusen (IRAG1-WT: $51,44 \text{ ng}\cdot\text{dl}^{-1} \pm 3,26 \text{ ng}\cdot\text{dl}^{-1}$; IRAG1-KO: $41,23 \text{ ng}\cdot\text{dl}^{-1} \pm 2,37 \text{ ng}\cdot\text{dl}^{-1}$) (s. Abbildung 5.13A). Die Werte für das Vitamin B12 sind in der Gesamtauswertung ebenfalls erniedrigt gewesen im Vergleich mit den Wildtypen, allerdings ist der Unterschied nicht signifikant (IRAG1-WT: $55,83 \text{ ng}\cdot\text{dl}^{-1} \pm 2,68 \text{ ng}\cdot\text{dl}^{-1}$; IRAG1-KO: $49,64 \text{ ng}\cdot\text{dl}^{-1} \pm 3,42 \text{ ng}\cdot\text{dl}^{-1}$). Bei männlichen Mäusen ist kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen nachzuweisen gewesen (IRAG1-WT: $59,73 \text{ ng}\cdot\text{dl}^{-1} \pm 3,86 \text{ ng}\cdot\text{dl}^{-1}$; IRAG1-KO: $59,26 \text{ ng}\cdot\text{dl}^{-1} \pm 4,71 \text{ ng}\cdot\text{dl}^{-1}$).

Bei den Werten für das Folat ist kein Unterschied bei den männlichen Mäusen feststellbar (IRAG1-WT: $2160,14 \text{ ng}\cdot\text{dl}^{-1} \pm 252,39 \text{ ng}\cdot\text{dl}^{-1}$; IRAG1-KO: $2167,70 \text{ ng}\cdot\text{dl}^{-1} \pm 191,09 \text{ ng}\cdot\text{dl}^{-1}$)

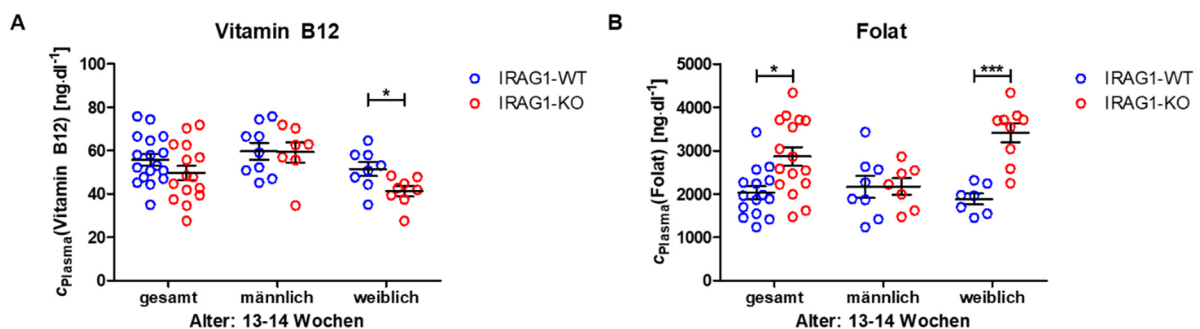


Abbildung 5.13: Plasmakonzentration von Vitamin B12 und Folat.

A: Die Konzentration von Vitamin B12 ist in weiblichen IRAG1-KO Mäusen ($n = 8$) signifikant niedriger als bei IRAG1-WT Mäusen ($n = 8$). Zwischen männlichen IRAG1-WT Mäusen ($n = 9$) und IRAG1-KO Mäusen ($n = 7$) sowie in der Gesamtauswertung (IRAG1-WT: $n = 17$; IRAG1-KO: $n = 15$) unterscheiden sich die Konzentrationen von Vitamin B12 nicht. **B:** In weiblichen IRAG1-KO Mäusen ($n = 9$) und in der Gesamtauswertung der IRAG1-KO Mäuse ($n = 16$) ist die Folatkonzentration signifikant höher im Vergleich zu den entsprechenden WT-Mäusen (gesamt: $n = 15$; weiblich: $n = 16$). Die Konzentration von Folat hat sich bei männlichen Mäusen zwischen den beiden Genotypen nicht unterschieden (IRAG1-WT: $n = 8$; IRAG1-KO: $n = 7$). Die Datenpunkte symbolisieren den individuellen Wert der jeweiligen Maus und der Mittelwert \pm SEM ist mittels der Balken dargestellt. Signifikante Unterschiede sind durch (*) ($p < 0,05$) und (***) ($p < 0,001$) verdeutlicht.

(s. Abbildung 5.13B). Weibliche IRAG1-KO Mäuse haben dagegen signifikant höhere Folatkonzentrationen im Vergleich zu den Wildtypmäusen (IRAG1-WT: $1882,09 \text{ ng}\cdot\text{dl}^{-1} \pm 125,81 \text{ ng}\cdot\text{dl}^{-1}$; IRAG1-KO: $3407,64 \text{ ng}\cdot\text{dl}^{-1} \pm 219,49 \text{ ng}\cdot\text{dl}^{-1}$). Dies ist auch bei der Gesamtanalyse zu beobachten gewesen (IRAG1-WT: $2030,39 \text{ ng}\cdot\text{dl}^{-1} \pm 146,72 \text{ ng}\cdot\text{dl}^{-1}$; IRAG1-KO: $2865,17 \text{ ng}\cdot\text{dl}^{-1} \pm 214,63 \text{ ng}\cdot\text{dl}^{-1}$).

Die globale *Iragl*-Defizienz führt somit zu einer Hypocobalaminämie, bei unveränderten Konzentrationen des Folats.

5.6 Histologische Untersuchung des Duodenums

Von globalen *Prkg1*-defizienten Mäusen ist bekannt, dass diese gastrointestinale Blutungen entwickeln und duodenale Ulcera als Ursache angenommen werden (Singh et al. 2012; Angermeier et al. 2016). *Iragl*-defiziente Mäuse weisen ebenfalls gastrointestinale Blutungen auf (s. 5.2.1) und haben generell einen sehr ähnlichen pathophysiologischen Phänotyp wie die globalen *Prkg1*-defizienten Mäuse. Aus diesem Grund sind Duodena von *Iragl*-defizienten Mäusen untersucht worden.

Die mikroskopische Betrachtung der Querschnitte der Duodena hat bei der Auswertung keine Unterschiede zwischen IRAG1-WT und IRAG1-KO Mäusen und zwischen den beiden Geschlechtern ergeben (s. Abbildung 5.14).

Der mikroskopische Aufbau ist in allen Organen regelgerecht und es haben sich auch keine Hinweise auf Ulcera oder sonstige Blutungsereignisse gezeigt.

Es kann somit angenommen werden, dass duodenale Ulcera nicht ursächlich für die gastrointestinalen Blutungen bei *Iragl*^{-/-}-Mäusen sind.

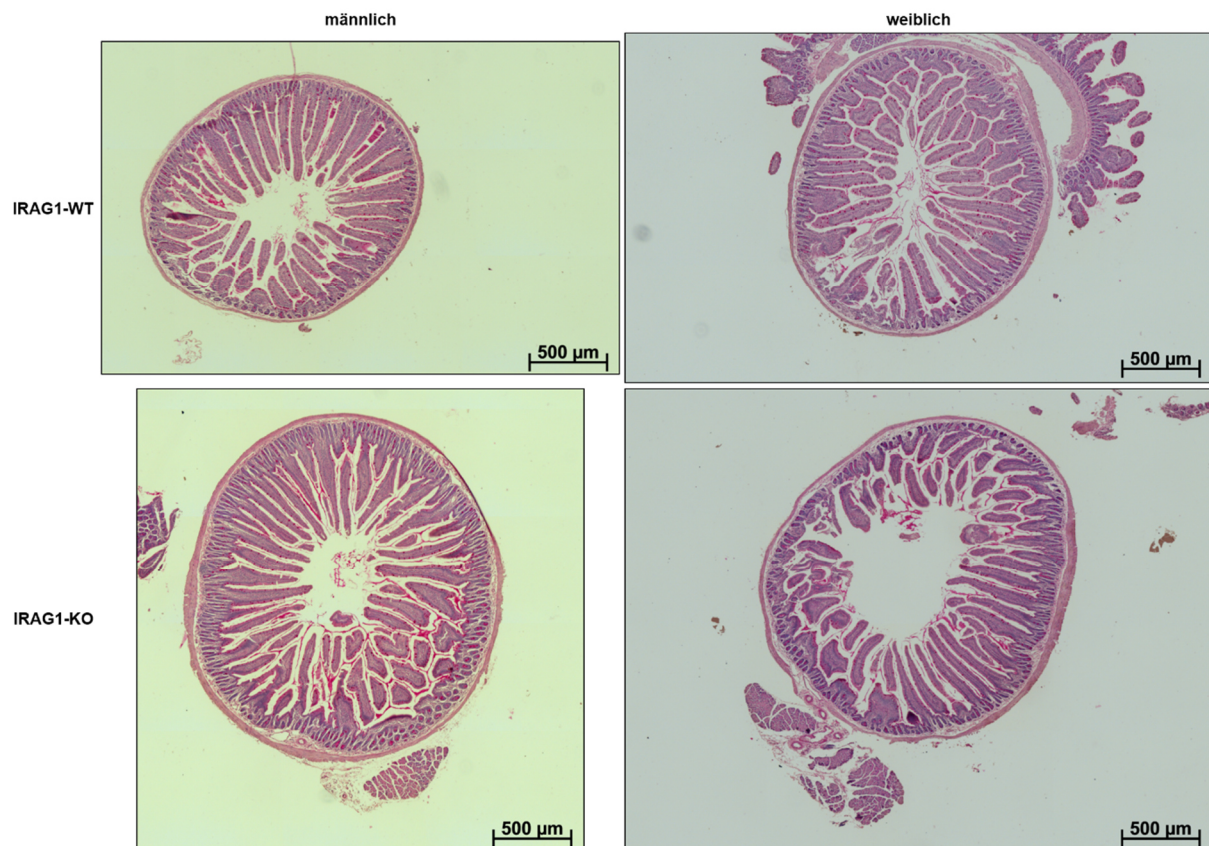


Abbildung 5.14: Histologische Untersuchung des Duodenums.

Repräsentative Paraffinschnitte von Duodena männlicher und weiblicher 15 Wochen alter IRAG1-WT und IRAG1-KO Mäuse, die mittels PAS-Färbung gefärbt wurden. Der Vergleich der Schnitte zwischen Wildtypen und *Irag1*-defizienten Mäusen hat keine auffallenden Veränderungen gezeigt, die auf einen Ulcus oder dessen Entstehung hindeuten würden.

5.7 Expression von Proteinen des cGMP/PKGI-Signalweges in verschiedenen Organen *Irag1*-defizienter Mäuse

Die Lokalisation und Expression von IRAG1 korreliert mit der der PGKI β in verschiedenen murinen Geweben (Geiselhöringer et al. 2004a). Globale *Prgkl*^{-/-}-Mäuse leiden unter anderem an einem pathologischen gastrointestinalen Phänotyp. Dieser Phänotyp ist in abgeschwächter Form auch bei globalen *Irag1*^{-/-}- und *Irag1* ^{Δ 12/ Δ 12}-Mäusen zu finden (Pfeifer et al. 1998; Geiselhöringer et al. 2004b; Desch et al. 2010). Um nun den Einfluss der *Irag1*-Deletion auf diesen Phänotyp zu untersuchen, ist die Expression wichtiger Proteine des cGMP/PKGI-Signalweges in Colon, Milz und Magen mittels Western Blot bei 15 Wochen alten Mäusen untersucht worden.

5.7.1 Expression von Proteinen des cGMP/PKGI-Signalweges im Colon

Die Proteinexpression von IRAG1 ist in den Cola von männlichen und weiblichen IRAG1-WT Mäusen nicht unterschiedlich gewesen (s. Abbildung 5.15A, G). Der IP₃R-I – ein Interaktionspartner von IRAG1 – ist durch die *Irag1*-Defizienz in männlichen und weiblichen Mäusen sowie in der Gesamtanalyse signifikant geringer exprimiert gegenüber den entsprechenden Wildtyp-Mäusen (s. Abbildung 5.15B, G). Der zweite Interaktionspartner von IRAG1 – die PKGIβ – ist ebenfalls in der Proteinexpression beeinflusst. Wie bereits der IP₃R-I ist auch die PKGIβ in den männlichen und weiblichen IRAG1-KO Mäusen und in der gemeinsamen Auswertung

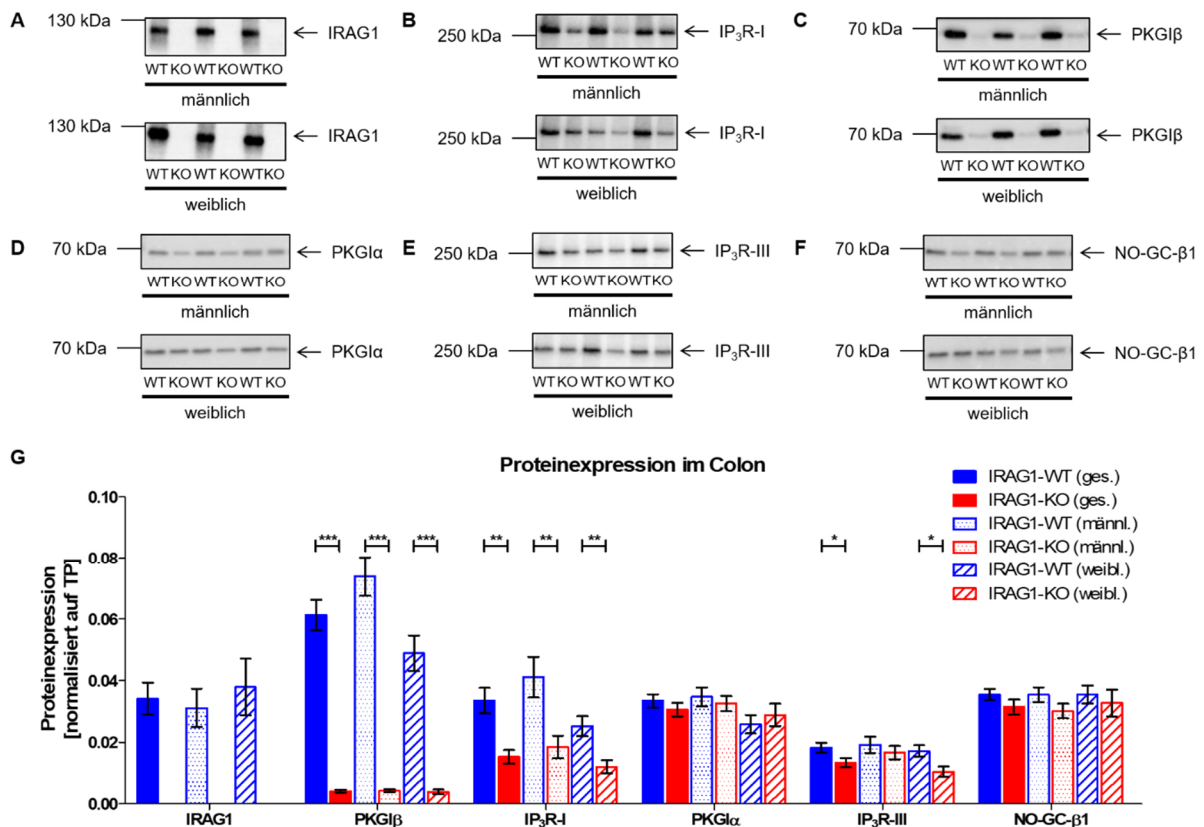


Abbildung 5.15: Expression von Proteinen des cGMP/PKGI-Signalweges im Colon.

Repräsentative Western Blots der untersuchten Proteine von 15 Wochen alten IRAG1-WT (WT) und IRAG1-KO (KO) Mäusen (A-F) sowie die statistische Auswertung (G) der quantifizierten Western Blots. **A:** Die Expression von IRAG1 unterscheidet sich nicht zwischen den Cola von männlichen und weiblichen IRAG1-WT Mäusen (gesamt: $n = 18$; männlich: $n = 10$; weiblich: $n = 8$). In Cola von IRAG1-KO Mäusen (gesamt: $n = 22$; männlich: $n = 11$; weiblich: $n = 11$) konnte IRAG1 nicht detektiert werden. **B:** Der repräsentative Western Blot des IP₃R-I zeigt, dass es durch die *Irag1*-Defizienz zu einer signifikanten Reduktion der Proteinmenge an IP₃R-I in IRAG1-KO Mäusen (gesamt: $n = 22$; männlich: $n = 11$; weiblich: $n = 11$) im Vergleich zu deren WT-Wurfgeschwistern kommt (gesamt: $n = 21$; männlich: $n = 11$; weiblich: $n = 10$). **C:** Im Vergleich zwischen IRAG1-WT (gesamt: $n = 24$; männlich: $n = 12$; weiblich: $n = 12$) und IRAG1-KO Mäusen (gesamt: $n = 22$; männlich: $n = 11$; weiblich: $n = 11$) kommt es durch das Fehlen von IRAG1 zu einer deutlichen geschlechtsunabhängigen Reduktion der PKGIβ-Expression in den IRAG1-KO Mäusen. **D:** Zwischen IRAG1-WT Mäusen (gesamt: $n = 22$; männlich: $n = 11$; weiblich: $n = 11$) und *Irag1*-defizienten Mäusen (gesamt: $n = 20$; männlich: $n = 10$; weiblich: $n = 10$) sind keine Unterschiede in der Expression der PKGIα erkennbar. **E:** In den Cola von IRAG1-KO Mäusen (gesamt: $n = 21$; männlich: $n = 10$; weiblich: $n = 11$) ist die Expression des IP₃R-III reduziert im Vergleich mit IRAG1-WT Mäusen (gesamt: $n = 17$; männlich: $n = 9$; weiblich: $n = 8$). **F:** Die Expression der NO-GC-β1 ist zwischen IRAG1-WT (gesamt: $n = 23$; männlich: $n = 12$; weiblich: $n = 11$) und IRAG1-KO Mäusen (gesamt: $n = 22$; männlich: $n = 11$; weiblich: $n = 11$) nicht verändert. **G:** Quantifizierung und statistische Auswertung der Proteinexpressionen (A-F) von IRAG1-WT und IRAG1-KO Mäusen – getrennt nach Geschlechtern (männlich (männl.); weiblich (weibl.)) und geschlechtsunabhängig (gesamt (ges.)). Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM und signifikante Unterschiede sind durch (*) ($p < 0,05$), (**) ($p < 0,01$) sowie (***) ($p < 0,001$) verdeutlicht. Aufnahmen des Totalproteins (TP) sind in Kapitel 8.1 (s. Abbildung 8.2) zu finden.

beider Geschlechter deutlich reduziert in der Proteinexpression gegenüber den IRAG1-WT Mäusen (s. Abbildung 5.15C, G). Die PKGI α ist dagegen durch die *Iragl*-Deletion nicht in ihrer Proteinexpression im Vergleich mit den Wildtypwurfgeschwistern beeinflusst worden (s. Abbildung 5.15D, G). Bei weiblichen IRAG1-KO Mäusen ist die Expression des Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptors III (IP₃R-III) leicht, aber signifikant verringert gewesen, wie auch in der Gesamtauswertung (s. Abbildung 5.15E, G). Männliche IRAG1-KO Mäuse haben dagegen keine veränderte Expression des IP₃R-III gezeigt. Die Expression der β_1 -Untereinheit der NO-GC (NO-GC- β_1) hat sich zwischen den Genotypen nicht unterschieden (s. Abbildung 5.15F, G).

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass es durch die *Iragl*-Deletion in den Cola zu einer deutlichen Abnahme der Proteinexpression der beiden Interaktionspartner von IRAG1 – PKGI β und IP₃R-I – kommt.

5.7.2 Expression von Proteinen des cGMP/PKGI-Signalweges in der Milz

In Milzen männlicher und weiblicher IRAG1-WT Mäuse ist die Expression von IRAG1 nicht unterschiedlich, während in den Milzen von *Iragl*-defizienten Mäusen erwartungsgemäß kein IRAG1 nachgewiesen worden ist (s. Abbildung 5.16A, G). Die Expression des IP₃R-I ist bei *Iragl*-defizienten Mäusen hochreguliert gewesen im Vergleich mit den IRAG1-WT Mäusen (s. Abbildung 5.16B, G). Diese Hochregulation ist allerdings nur in der Gesamtauswertung und bei männlichen Mäusen signifikant gewesen. Bei der Proteinexpression der PKGI β kommt es durch das Fehlen von IRAG1 in der Milz zu einer deutlichen Veränderung (s. Abbildung 5.16C, G). Die *Iragl*-defizienten Mäuse haben – unabhängig des Geschlechts – eine deutliche und signifikant reduzierte Expression der PKGI β gegenüber den IRAG1-WT Mäusen. Dieses Phänomen konnte dabei auch in der Gesamtanalyse beobachtet werden. Obwohl die PKGI α kein Interaktionspartner von IRAG1 ist, ist auch deren Proteinexpression durch die *Iragl*-Deletion beeinflusst. *Iragl*-defiziente Tiere weisen in der Milz eine erhöhte PKGI α -Expression auf, verglichen mit den Wildtypen (s. Abbildung 5.16D, G). Die Expression hat sich aber nur bei den weiblichen Mäusen und in der Gesamtauswertung signifikant unterschieden. Ähnlich zur Expression der PKGI α ist die Expression des IP₃R-III bei IRAG1-KO Mäusen leicht erhöht im Vergleich mit IRAG1-WT Mäusen (s. Abbildung 5.16E, G). Eine signifikante Zunahme ist aber nur in der Gesamtauswertung festgestellt worden. Die NO-GC- β_1 ist in der Milz von männlichen und weiblichen IRAG1-KO Mäusen sowie in der Gesamtauswertung der IRAG1-KO Mäuse gegenüber den IRAG1-WT Mäusen signifikant erhöht (s. Abbildung 5.16F, G).

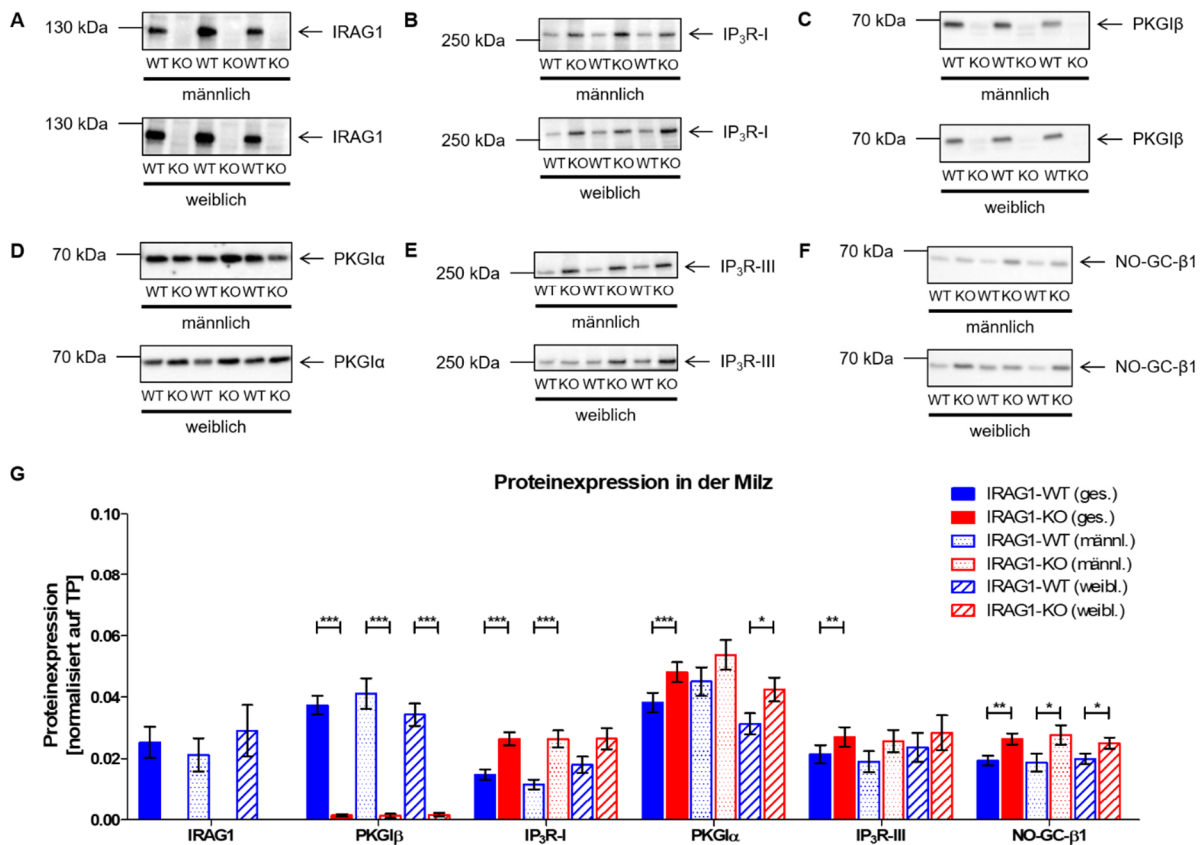


Abbildung 5.16: Expression von Proteinen des cGMP/PKGI-Signalweges in der Milz.

Repräsentative Western Blots der untersuchten Proteine von 15 Wochen alten IRAG1-WT (WT) und IRAG1-KO (KO) Mäusen (A-F) sowie die statistische Auswertung der Quantifizierung der Western Blots (G). **A:** In der Expression von IRAG1 sind zwischen männlichen und weiblichen IRAG1-WT Mäusen (gesamt: $n = 23$; männlich: $n = 11$; weiblich: $n = 12$) keine Unterschiede zu erkennen gewesen und eine Detektion von IRAG1 war bei IRAG1-KO Mäusen (gesamt: $n = 24$; männlich: $n = 12$; weiblich: $n = 12$) nicht möglich. **B:** In IRAG1-KO Mäusen (gesamt: $n = 22$; männlich: $n = 12$; weiblich: $n = 10$) kommt es zu einer Zunahme der IP₃R-I-Expression im Vergleich zu IRAG1-WT Mäusen (gesamt: $n = 22$; männlich: $n = 11$; weiblich: $n = 11$). **C:** Durch die *Iragl*-Defizienz kommt es zu einer deutlichen geschlechtsunabhängigen Reduktion der PKGIβ-Expression in den IRAG1-KO Mäusen (gesamt: $n = 22$; männlich: $n = 11$; weiblich: $n = 11$) gegenüber den Wildtypwurfgeschwistern (gesamt: $n = 24$; männlich: $n = 12$; weiblich: $n = 12$). **D:** In Folge der *Iragl*-Defizienz kommt es im Vergleich mit IRAG1-WT Mäusen (gesamt: $n = 22$; männlich: $n = 11$; weiblich: $n = 11$) bei IRAG1-KO Mäusen (gesamt: $n = 24$; männlich: $n = 12$; weiblich: $n = 12$) zu einer Zunahme der PKGIα-Proteinexpression. **E:** IRAG1-KO Mäuse (gesamt: $n = 23$; männlich: $n = 12$; weiblich: $n = 11$) zeigen in der Milz eine erhöhte IP₃R-III-Proteinexpression im Vergleich zu IRAG1-WT Mäusen (gesamt: $n = 23$; männlich: $n = 11$; weiblich: $n = 12$). **F:** Der Vergleich der Proteinexpression der NO-GC-β1 zwischen IRAG1-WT (gesamt: $n = 24$; männlich: $n = 11$; weiblich: $n = 13$) und IRAG1-KO Mäusen (gesamt: $n = 22$; männlich: $n = 11$; weiblich: $n = 11$) ergibt, dass IRAG1-KO Mäuse eine höhere Proteinexpression der NO-GC-β1 in der Milz aufweisen. **G:** Quantifizierung und statistische Auswertung der Proteinexpressionen (A-F) von IRAG1-WT und IRAG1-KO Mäusen – getrennt nach Geschlechtern (männlich (männl.); weiblich (weibl.)) und geschlechtsunabhängig (gesamt (ges.)). Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM sowie die signifikanten Unterschiede, die durch (*) ($p < 0,05$), (**) ($p < 0,01$) und (***) ($p < 0,001$) gekennzeichnet sind. Aufnahmen des Totalproteins (TP) sind in Kapitel 8.1 (s. Abbildung 8.3) zu finden.

Die *Iragl*-Deletion führt somit – wie auch im Colon – zu einer Veränderung der Proteinexpression relevanter Proteine des cGMP/PKGI-Signalweges.

5.7.3 Expression von Proteinen des cGMP/PKGI-Signalweges im Magen

Wie schon bereits beim Colon (s. 5.7.1) und bei der Milz (s. 5.7.2) beobachtet worden ist, ist auch beim Magen die IRAG1-Expression zwischen weiblichen und männlichen IRAG1-WT Mäusen nicht unterschiedlich (s. Abbildung 5.17A, G). Auch die Proteinexpression des IP₃R-I (s. Abbildung 5.17B, G) und der PKGI β (s. Abbildung 5.17C, G) sind im Magen von IRAG1-KO Mäusen signifikant reduziert gegenüber den IRAG1-WT Mäusen. Diese Reduktion ist geschlechtsunabhängig, analog zu den Beobachtungen im Colon (s. 5.7.1). Die PKGI α ist dagegen – wie auch in der Milz (s. 5.7.2) – in IRAG1-KO Mäusen stärker exprimiert gewesen im Vergleich mit den WT-Mäusen (s. Abbildung 5.17D, G). Der Unterschied zwischen IRAG1-KO

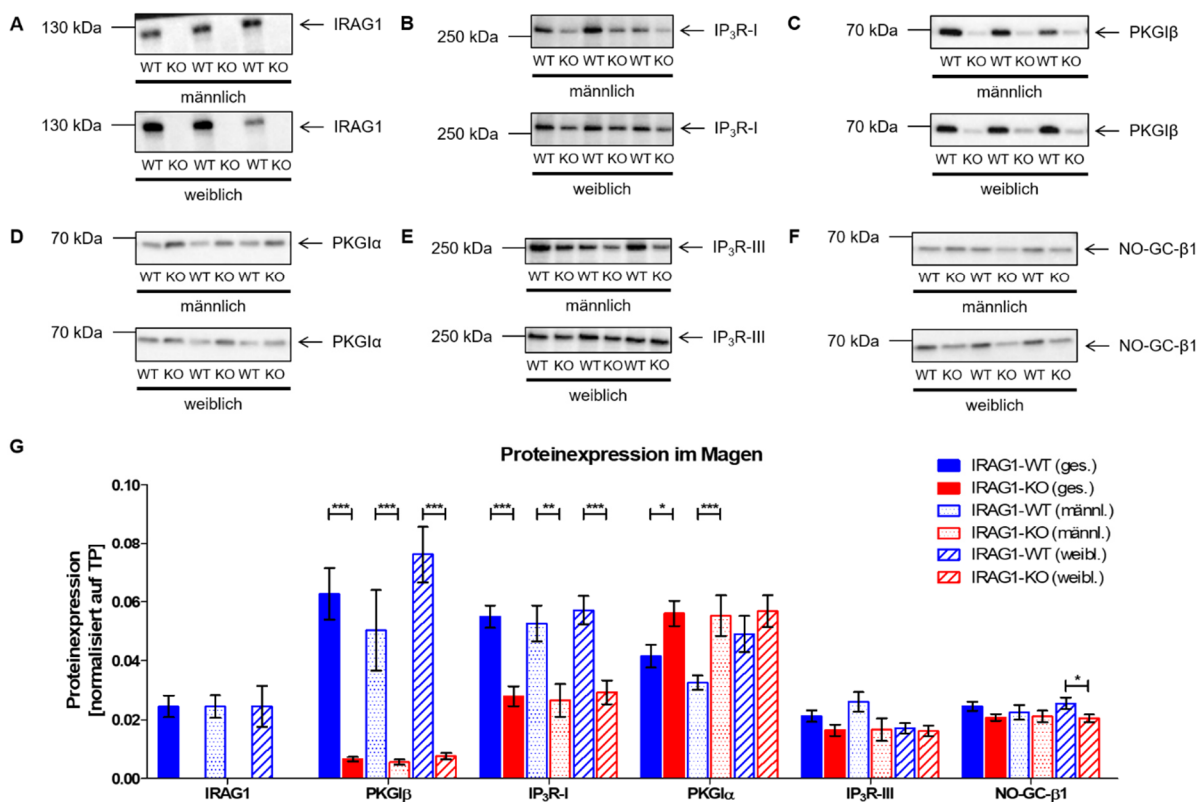


Abbildung 5.17: Expression von Proteinen des cGMP/PKGI-Signalweges im Magen.

Repräsentative Western Blots der untersuchten Proteine von 15 Wochen alten IRAG1-WT (WT) und IRAG1-KO (KO) Mäusen (A-F) sowie die statistische Auswertung der Quantifizierung der Western Blots (G). **A:** Die IRAG1-Expression ist zwischen männlichen und weiblichen IRAG1-WT Mäusen (gesamt: $n = 22$; männlich: $n = 12$; weiblich: $n = 10$) nicht unterschiedlich. Erwartungsgemäß ist eine Detektion von IRAG1 bei IRAG1-KO Mäusen (gesamt: $n = 23$; männlich: $n = 11$; weiblich: $n = 12$) nicht möglich gewesen. **B:** IRAG1-KO Mäuse (gesamt: $n = 22$; männlich: $n = 12$; weiblich: $n = 10$) haben eine reduzierte IP₃R-I-Proteinexpression im Vergleich zu IRAG1-WT Mäusen (gesamt: $n = 22$; männlich: $n = 12$; weiblich: $n = 10$). **C:** Bei IRAG1-KO Mäusen (gesamt: $n = 23$; männlich: $n = 11$; weiblich: $n = 12$) kommt es zu einer deutlichen geschlechtsunabhängigen Reduktion der PKGI β -Expression im Vergleich zu IRAG1-WT Mäusen (gesamt: $n = 23$; männlich: $n = 12$; weiblich: $n = 11$). **D:** Die Expression der PKGI α ist bei IRAG1-KO Mäusen (gesamt: $n = 21$; männlich: $n = 10$; weiblich: $n = 11$) gegenüber IRAG1-WT Mäusen (gesamt: $n = 24$; männlich: $n = 11$; weiblich: $n = 13$) erhöht. **E:** Zwischen IRAG1-KO Mäusen (gesamt: $n = 22$; männlich: $n = 10$; weiblich: $n = 12$) und IRAG1-WT Mäusen (gesamt: $n = 24$; männlich: $n = 11$; weiblich: $n = 13$) liegt kein Unterschied in der Proteinexpression des IP₃R-III vor. **F:** Die Expression der NO-GC- β 1 ist zwischen IRAG1-WT (gesamt: $n = 23$; männlich: $n = 11$; weiblich: $n = 12$) und IRAG1-KO Mäusen (gesamt: $n = 25$; männlich: $n = 12$; weiblich: $n = 13$) nicht verändert. **G:** Quantifizierung und statistische Auswertung der Proteinexpressionen (A-F) von IRAG1-WT und IRAG1-KO Mäusen – getrennt nach Geschlechtern (männlich (männl.); weiblich (weibl.)) und geschlechtsunabhängig (gesamt (ges.)). Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM und signifikante Unterschiede, die durch (*) ($p < 0,05$), (**) ($p < 0,01$) und (***) ($p < 0,001$) verdeutlicht sind. Aufnahmen des Totalproteins (TP) sind in Kapitel 8.1 (s. Abbildung 8.4) zu finden.

und -WT Mäusen ist aber nur bei männlichen Mäusen und in der Gesamtanalyse signifikant. Die Proteinexpression des IP₃R-III und der NO-GC-β1 ist in IRAG1-KO Mäusen nicht durch die *Irag1*-Deletion beeinflusst worden (s. Abbildung 5.17E, F, G).

Im Magen kommt es also – wie bereits im Colon und in der Milz beobachtet – in Folge des Fehlens von IRAG1 zu einer Veränderung der Expression relevanter Proteine des cGMP/PKGI-Signalweges.

5.8 Analyse der mRNA-Expression relevanter Gene des cGMP/PKGI-Signalweges

Wie im vorherigen Kapitel dargelegt, unterscheidet sich die Expression bestimmter Proteine zwischen *Irag1*-defizienten Mäusen und Wildtypen in Colon, Milz und Magen (s. 5.7). In Folge dieses Befundes hat sich die Frage nach der Ursache der veränderten Expression in den Organen der IRAG1-KO Mäuse gestellt. Hierfür gibt es zwei mögliche Erklärungen. Die erste Möglichkeit wäre, dass es durch die *Irag1*-Defizienz zu einer veränderten Expression der betreffenden Gene kommt. Als zweite Möglichkeit kommen posttranslationale Ereignisse in Betracht. Das heißt, dass nicht die Expression des jeweiligen Gens durch die *Irag1*-Deletion verändert ist, sondern dass es durch das Fehlen des Proteins IRAG1 beispielsweise zu beschleunigten Abbauprozessen dieser Proteine kommen kann. Um nun herauszufinden, inwieweit die *Irag1*-Defizienz einen Einfluss auf die Genexpression hat, ist die Expression der Gene – deren Proteinexpression zuvor bestimmt wurde – untersucht worden.

Die mRNA-Expression des Gens *Irag1*, das für das Protein IRAG1 codiert, ist in den Milzen von weiblichen IRAG1-WT Mäusen gegenüber den männlichen Mäusen signifikant erhöht gewesen. Im Magen hat sich genau der gegenteilige Befund gezeigt. Hier ist die mRNA-Expression bei den männlichen WT-Mäusen signifikant erhöht im Vergleich zu den weiblichen Mäusen (s. Abbildung 5.18A). Dagegen haben sich im Colon keine Unterschiede zwischen den beiden Geschlechtern der IRAG1-WT Mäuse ergeben. Wie erwartet war in den untersuchten Organen der IRAG1-KO Mäuse keine mRNA von *Irag1* nachweisbar.

Das Gen für den IP₃R-I (*Itp1*) unterscheidet sich in der mRNA-Expression im Colon nicht zwischen IRAG1-KO und IRAG1-WT Mäusen, unabhängig vom Geschlecht (s. Abbildung 5.18B). Der gleiche Befund hat sich auch für die mRNA-Expression von *Itp1* im Magen ergeben. In der Milz hat sich ein anderes Bild gezeigt. Nur bei weiblichen IRAG1-KO Mäusen ist eine signifikante Reduktion der *Itp1* mRNA-Expression zu beobachten gewesen.

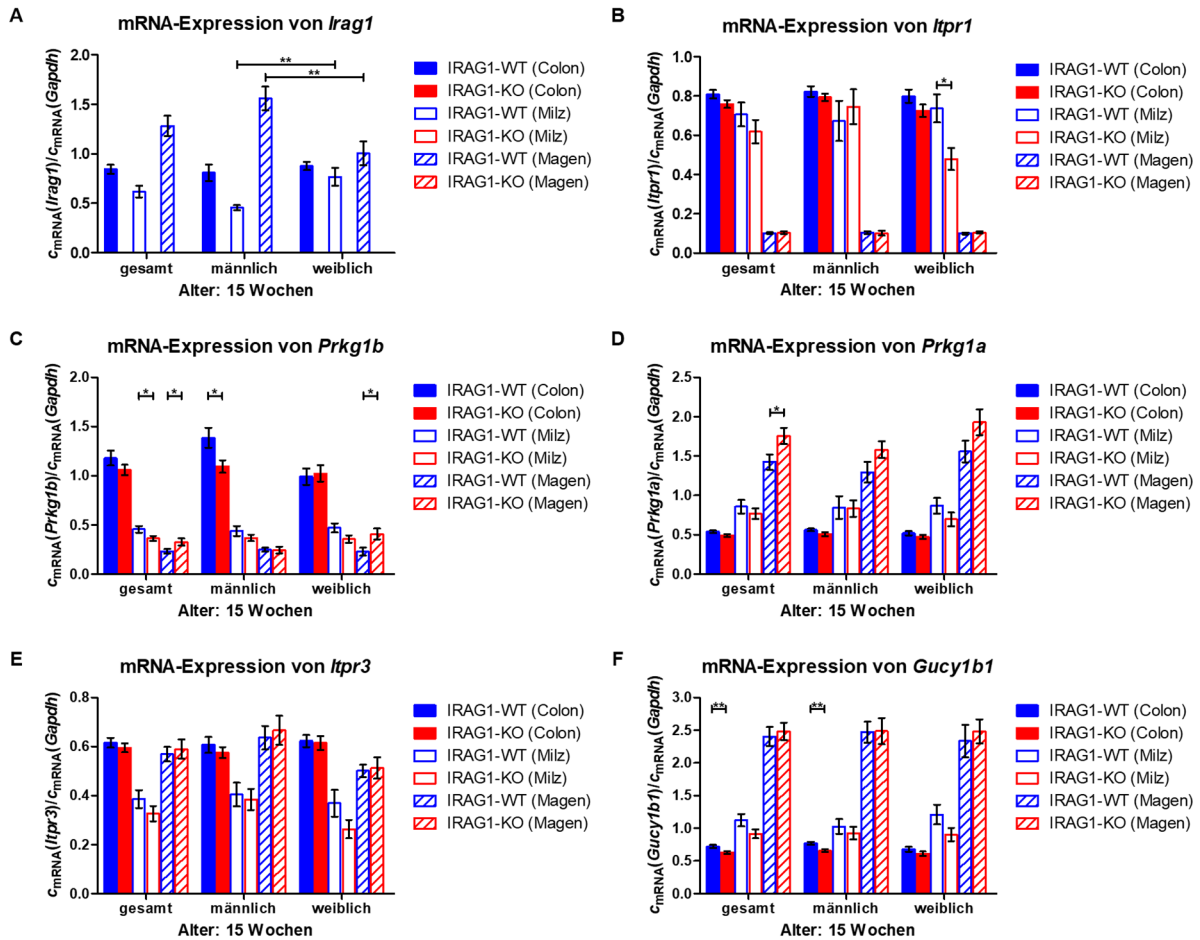


Abbildung 5.18: Expression der mRNA relevanter Gene des cGMP/PKGI-Signalweges.

In Colon, Milz und Magen 15 Wochen alter IRAG1-WT und IRAG1-KO Mäuse ist die mRNA-Expression von relevanten Genen des cGMP/PKGI-Signalweges untersucht worden. **A:** In IRAG1-KO Mäusen ist keine mRNA von *Irag1* nachweisbar (Colon: gesamt: $n = 24$, männlich: $n = 12$, weiblich: $n = 12$; Milz: gesamt: $n = 23$, männlich: $n = 12$, weiblich: $n = 11$; Magen: gesamt: $n = 24$, männlich: $n = 12$, weiblich: $n = 12$). Zwischen männlichen und weiblichen IRAG1-WT Mäusen unterscheidet sich die Expression der *Irag1*-mRNA nur in Milz und Magen (Colon: gesamt: $n = 23$, männlich: $n = 11$, weiblich: $n = 12$; Milz: gesamt: $n = 23$, männlich: $n = 11$, weiblich: $n = 12$; Magen: gesamt: $n = 24$, männlich: $n = 12$, weiblich: $n = 12$). **B:** Die mRNA-Expression von *Itpr1* unterscheidet sich im Colon und Magen nicht zwischen IRAG1-WT (Colon: gesamt: $n = 23$, männlich: $n = 11$, weiblich: $n = 12$; Magen: gesamt: $n = 24$, männlich: $n = 12$, weiblich: $n = 12$) und IRAG1-KO Mäusen (Colon: gesamt: $n = 24$, männlich: $n = 12$, weiblich: $n = 12$; Magen: gesamt: $n = 24$, männlich: $n = 12$, weiblich: $n = 12$). In der Milz kommt es zu einer Reduktion der Expression von *Itpr1* in IRAG1-KO Mäusen (gesamt: $n = 23$, männlich: $n = 12$, weiblich: $n = 11$) im Vergleich mit den IRAG1-WT Mäusen (gesamt: $n = 23$, männlich: $n = 11$, weiblich: $n = 12$). **C:** *Prkg1b*-mRNA ist im Colon und der Milz von IRAG1-KO Mäusen (Colon: gesamt: $n = 24$, männlich: $n = 12$, weiblich: $n = 12$; Milz: gesamt: $n = 23$, männlich: $n = 12$, weiblich: $n = 11$) gegenüber den WT-Mäusen (Colon: gesamt: $n = 23$, männlich: $n = 11$, weiblich: $n = 12$; Milz: gesamt: $n = 23$, männlich: $n = 11$, weiblich: $n = 12$) reduziert. Dagegen ist die Expression im Magen von IRAG1-KO Mäusen (gesamt: $n = 24$, männlich: $n = 12$, weiblich: $n = 12$) im Vergleich mit den IRAG1-WT Mäusen (gesamt: $n = 24$, männlich: $n = 12$, weiblich: $n = 12$) erhöht. **D:** Im Colon (IRAG1-WT: gesamt: $n = 23$, männlich: $n = 11$, weiblich: $n = 12$; IRAG1-KO: gesamt: $n = 23$, männlich: $n = 12$, weiblich: $n = 11$) und in der Milz (IRAG1-WT: gesamt: $n = 23$, männlich: $n = 11$, weiblich: $n = 12$; IRAG1-KO: gesamt: $n = 23$, männlich: $n = 12$, weiblich: $n = 11$) ist die mRNA-Expression von *Prkg1a* nicht durch die *Irag1*-Defizienz beeinflusst. Bei IRAG1-KO Mäusen (gesamt: $n = 22$, männlich: $n = 12$, weiblich: $n = 12$) kommt es im Magen zu einem leichten Anstieg der *Prkg1a*-mRNA gegenüber den Wildtypen (gesamt: $n = 24$, männlich: $n = 12$, weiblich: $n = 12$). **E:** Die Expression der *Itpr3*-mRNA ist durch die *Irag1*-Defizienz nicht beeinflusst (IRAG1-WT: Colon: gesamt: $n = 23$, männlich: $n = 11$, weiblich: $n = 12$; Milz: gesamt: $n = 23$, männlich: $n = 11$, weiblich: $n = 12$; Magen: gesamt: $n = 24$, männlich: $n = 12$, weiblich: $n = 12$; IRAG1-KO: Colon: gesamt: $n = 24$, männlich: $n = 12$, weiblich: $n = 12$; Milz: gesamt: $n = 23$, männlich: $n = 12$, weiblich: $n = 11$; Magen: gesamt: $n = 24$, männlich: $n = 12$, weiblich: $n = 12$). **F:** Die Expression der mRNA von *Gucy1b1* unterscheidet sich in der Milz (IRAG1-WT: gesamt: $n = 23$, männlich: $n = 11$, weiblich: $n = 12$; IRAG1-KO: gesamt: $n = 23$, männlich: $n = 12$, weiblich: $n = 11$) und im Magen (IRAG1-WT: gesamt: $n = 24$, männlich: $n = 12$, weiblich: $n = 12$; IRAG1-KO: gesamt: $n = 24$, männlich: $n = 12$, weiblich: $n = 12$) nicht zwischen den beiden Genotypen. Im Colon von IRAG1-KO Mäusen (gesamt: $n = 24$, männlich: $n = 12$, weiblich: $n = 12$) ist die *Gucy1b1*-mRNA erniedrigt im Vergleich mit IRAG1-WT Mäusen (gesamt: $n = 23$, männlich: $n = 11$, weiblich: $n = 12$). Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM und signifikante Unterschiede sind durch (*) ($p < 0,05$), (**) ($p < 0,01$) und (***) ($p < 0,001$) verdeutlicht.

Eine erhöhte Expression der *Itpr1*-mRNA hat sich dagegen in den Milzen männlicher IRAG1-KO Mäuse gezeigt, aber ohne signifikanten Unterschied zu den entsprechenden IRAG1-WT Mäusen.

Die mRNA-Expression von *Prkg1b* – das Gen, das für die PGKI β codiert – ist in den Cola von IRAG1-KO Mäusen reduziert gegenüber den entsprechenden IRAG1-WT Mäusen (s. Abbildung 5.18C). Diese Reduktion ist in der Gesamtauswertung und bei männlichen Mäusen aufgetreten. Aber nur bei männlichen IRAG1-KO Mäusen hat sich diese Reduktion signifikant gegenüber den entsprechenden Wildtypen unterschieden. Bei weiblichen IRAG1-KO Mäusen ist es dagegen zu keiner Veränderung der mRNA-Expression von *Prkg1b* gegenüber den IRAG1-WT Mäusen gekommen. In den Milzen von IRAG1-KO Mäusen ist, im Vergleich mit den Wildtypen, ebenfalls eine leichte Reduktion der *Prkg1b*-mRNA zu beobachten gewesen. Diese Reduktion hat sich aber nur in der Gesamtauswertung als signifikant dargestellt, im Gegensatz zu männlichen und weiblichen Mäusen. Die Expression der mRNA von *Prkg1b* ist im Magen von weiblichen IRAG1-KO Mäusen und in der Gesamtauswertung signifikant erhöht, verglichen mit den entsprechenden Wildtypen. Zwischen männlichen IRAG1-WT und IRAG1-KO Mäusen ist hat sich die Expression der *Prkg1b*-mRNA aber nicht unterschieden. Untersuchungen zur Expression der mRNA von *Prkg1a* – die für die PKGI α codiert – haben in den Cola und Milzen von IRAG1-KO Mäusen keine Veränderungen im Vergleich mit den entsprechenden IRAG1-WT Mäusen ergeben, unabhängig des jeweiligen Geschlechts (s. Abbildung 5.18D). Im Magen ist dagegen die Expression der *Prkg1a*-mRNA bei den *Irag1*-defizienten Mäusen erhöht, verglichen mit den Wildtypen. Nur in der Gesamtauswertung liegt aber ein signifikanter Unterschied zwischen den IRAG1-KO Mäusen und den IRAG1-WT Mäusen vor. Ein Unterschied der mRNA-Expression des für den IP₃R-III codierenden Gens *Itpr3* hat sich zwischen IRAG1-WT und IRAG1-KO Mäusen nicht gezeigt, unabhängig vom jeweiligen Organ oder Geschlecht (s. Abbildung 5.18E). Für die mRNA-Expression von *Gucylb1* – das Gen, das für die NO-GC- β 1 codiert – liegt ein ähnliches Ergebnis vor. Diese hat sich in Milz und Magen nicht zwischen IRAG1-KO und IRAG1-WT Mäusen, unabhängig vom Geschlecht, unterschieden (s. Abbildung 5.18F). In Cola *Irag1*-defizienter Mäuse ist dagegen die *Gucylb1*-mRNA in der Gesamtauswertung und bei männlichen Mäusen minimal signifikant reduziert gegenüber den IRAG1-WT Mäusen.

Es lässt sich also festhalten, dass die *Irag1*-Defizienz keine relevante Auswirkung auf die mRNA-Expression von den untersuchten Genen des cGMP/PGKI-Signalweges hat.

6 Diskussion

6.1 Zucht *Irag1*-defizienter Mäuse

Im Rahmen dieser Arbeit hat eine Beurteilung der IRAG1-KO Mauslinie stattgefunden, um herauszufinden, ob eine globale *Irag1*-Defizienz sich negativ auf die Zucht dieser Tiere auswirkt. Es hat sich dabei gezeigt, dass IRAG1-KO Mäuse keine erhöhte Sterblichkeit im Vergleich zu IRAG1-WT Mäusen aufweisen (s. Abbildung 5.1). Bisher ist für *Irag1*-defiziente Mäuse ein medianes Überleben von 29 Wochen bekannt gewesen (Desch et al. 2010). Eine ähnliche Lebenserwartung ist auch bei der Charakterisierung der *Irag1* ^{$\Delta 12/\Delta 12$} -Mäuse beschrieben worden. Die Hälfte der untersuchten Tiere mit diesem Genotyp verstarb in einem Alter, das jünger als sechs Monate war (Geiselhöringer et al. 2004b). Als Ursache für die gestiegene Lebenserwartung der *Irag1*-defizienten Mäuse ist hauptsächlich ein Grund zu nennen. Bei Desch et al. (2010) ist die Zucht und Haltung der IRAG1-KO Mauslinie in der konventionellen Haltung am Standort Vorklinikum der Universität Regensburg erfolgt. Dies ist auch bei den *Irag1* ^{$\Delta 12/\Delta 12$} -Mäusen der Fall gewesen. Im Laufe der Zeit ist die Zucht der IRAG1-KO Mäuse aber in die Barriere-Haltung am Standort Vorklinikum verlagert worden. Das bedeutet, dass die Zucht und Haltung ab einem gewissen Zeitpunkt ausschließlich unter SPF-Bedingungen erfolgt ist. Dass der Hygienestatus einer Tierhaltung von Bedeutung ist, ist anhand der globalen *Gnai2*-Maus – bei dieser wird durch eine Deletion das inhibitorische G-Protein $G\alpha_{12}$ nicht mehr exprimiert – dokumentiert. Befinden sich *Gnai2*^{-/-}-Mäuse in einer konventionellen Haltung, so sind serologisch Infektionen, Colitis und Adenokarzinome nachweisbar (Rudolph et al. 1995). Wird diese Maus aber unter IVC-Bedingungen (*inhalator ventilation cages*) gehalten, so werden diese Symptome nicht beobachtet (Wiege et al. 2013). Überträgt man diesen Befund auf die Zucht der IRAG1-KO Mäuse, so zeigt dies, dass sich der deutlich höhere Hygienestandard in der SPF-Haltung gegenüber der konventionellen Haltung positiv auf das Überleben der *Irag1*-defizienten Mäuse auswirkt. Es muss davon ausgegangen werden, dass der Kontakt mit Pathogenen in der Barriere-Haltung geringer oder kaum vorhanden ist. Daraus resultiert eine geringe Wahrscheinlichkeit für Infektionen, die sich dann negativ auf das Überleben der *Irag1*-defizienten Mäuse auswirken könnten.

Obwohl die Proteinexpression von IRAG1 und der PGKI β in den verschiedenen Geweben korreliert und die Phänotypen einer globalen *Irag1*-Defizienz oder -Mutation ähnlich denen einer globalen *Prkg1*-Defizienz sind, unterscheiden sich die Lebenserwartungen der einzelnen Mauslinien doch erheblich voneinander (Pfeifer et al. 1998; Geiselhöringer et al. 2004b;

Geiselhöringer et al. 2004a; Desch et al. 2010). Globale *Prkg1*-defiziente Mäuse haben eine deutlich reduzierte Lebenserwartung, 50% der Mäuse sterben innerhalb der ersten sechs Lebenswochen (Pfeifer et al. 1998; Weber et al. 2007). Die Generierung von sogenannten PGKI-Rescue Mäusen hat dazu geführt, dass diese Tiere eine höhere Lebenserwartung haben. Es handelt sich dabei um globale *Prkg1*-defiziente Mäuse, bei denen durch Modifikation des *Sm22alpha*-Gens wahlweise die PGKI α oder die PGKI β in Glattmuskelzellen überexprimiert wird (Weber et al. 2007). Interessanterweise haben LZM-PGKI α Mäuse keine verkürzte Lebenserwartung (Michael et al. 2008). Bei dieser Mauslinie liegt eine Mutation des Leucin-Zippers (LZM) vor, so dass die N-terminale Domäne, welche die Protein-Protein-Interaktion verantwortet, nicht mehr funktionsfähig ist. Somit entspricht diese Mauslinie auf eine gewisse Art und Weise einer PGKI α -KO Mauslinie. Das zeigt, dass es offenbar von Bedeutung für die Lebenserwartung einer Maus ist, welche der beiden PKGIs exprimiert wird. Die großen Unterschiede zwischen den Lebenserwartungen der *Prkg1*-defizienten Mauslinie und der *Irag1*-defizienten Mäuse – bei sehr ähnlichen Phänotypen – liegt in der großen physiologischen Bedeutung der PKGI begründet und des durch die *Prkg1*-Defizienz unterbrochenen NO/cGMP/PKGI-Signalweges. Diese Aussage wird auch dahingehend unterstützt, da für GC-KO Mäuse – bei diesen Mäusen wird die β_1 -Untereinheit der NO-GC nicht mehr exprimiert – ebenfalls eine sehr kurze Lebenszeit beschrieben ist (Friebe et al. 2007).

Bei den weiteren Analysen der Zucht hat sich gezeigt, dass die fehlende Expression von IRAG1 sich ebenfalls nicht negativ auswirkt. Im Untersuchungszeitraum hat es einen Aufzuchtverlust von 5,1% gegeben (s. 5.1.1) und liegt im Erwartbaren. Die Verteilung der Geschlechter (s. 5.1.2) unterscheidet sich nicht zwischen männlichen und weiblichen Mäusen. Auch die Verteilung der Genotypen entspricht den Mendelschen Regeln (s. 5.1.3). Diese Verteilung konnte auch bei *Irag1* ^{$\Delta 12/\Delta 12$} -Mäusen beobachtet werden (Geiselhöringer et al. 2004b).

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass die globale *Irag1*-Defizienz sich nicht negativ auf die Zucht und Haltung von *Irag1*-defizienten Mäusen auswirkt.

6.2 *Irag1*-Defizienz führt zu gastrointestinalen Blutungen

Mit Hilfe des Haemocult[®]-Tests ist untersucht worden, ob IRAG1-KO Mäuse gastrointestinale Blutungen aufweisen. Es ist dabei gezeigt worden, dass in einem Alter von 14 Wochen vor allem weibliche IRAG1-KO Mäuse an gastrointestinalen Blutungen leiden (s. Abbildung 5.2). Tiere im Alter von sechs Wochen weisen dagegen keine gastrointestinalen Blutungen auf (s. Abbildung 5.3). IRAG1-KO Mäuse und *Irag1* ^{Δ 12/ Δ 12}-Mäuse entwickeln mit zunehmendem Alter eine Vergrößerung des Gastrointestinaltraktes. Zusätzlich weisen die *Irag1* ^{Δ 12/ Δ 12}-Mausmutanten noch eine verlangsamte gastrointestinale Passagezeit auf (Geiselhöringer et al. 2004b; Desch et al. 2010). Eine Vergrößerung des Gastrointestinaltraktes und erhöhte Passagezeit konnte auch bei *Prkg1*-defizienten Mäusen beobachtet werden (Pfeifer et al. 1998). Dies gilt auch für die gastrointestinalen Blutungen (Singh et al. 2012; Angermeier et al. 2016). Als Ursache für die gastrointestinalen Blutungen werden duodenale Ulzerationen angenommen, in Folge einer gestörten Regulation des pH-Wertes. Durch das Fehlen der PKGI unterbleibt die Carbonat-Sekretion im Duodenum, sobald der saure Mageninhalt in das Duodenum gelangt (Singh et al. 2012). Mit der Gabe von Protonenpumpeninhibitoren (PPI) konnten die gastrointestinalen Blutungen und die Ulzerationen im Duodenum verhindert oder geheilt werden (Singh et al. 2012; Angermeier et al. 2016). Es ist davon auszugehen, dass das Fehlen von IRAG1 einen ähnlichen negativen Effekt auf den Gastrointestinaltrakt hat. Untersuchungen zu MRVII – dem humanen Homolog von IRAG1 – haben gezeigt, dass Mutationen von MRVII bei der Entstehung einer Achalasie beteiligt sind und es dadurch zu Schleimhautschäden kommen kann (Koehler et al. 2020; Palmieri et al. 2020). Somit ist es möglich, dass die *Irag1*-Defizienz bei den Mäusen ebenfalls zu Schäden oder Störungen der Schleimhaut führt. Ulzerationen im Duodenum, wie sie bei den *Prkg1*-defizienten Mäusen beschrieben wurden, konnten im Duodenum von IRAG1-KO Mäusen allerdings nicht nachgewiesen werden (s. Abbildung 5.14). Man kann deshalb vermuten, dass es bei *Irag1*-defizienten Mäusen durch die verlängerte Passagezeit im Gastrointestinaltrakt zu einem Phänomen kommt, das einer Obstipation ähnelt. Die Folge davon ist, dass die Fäzes härter wird und es so zu Verletzungen der Schleimhaut kommen kann, die zu kleinen lokalen Blutungen führen. Für GC-KO Mäuse werden als Konsequenz einer ebenfalls erhöhten gastrointestinalen Passagezeit ähnliche Folgen diskutiert (Friebe et al. 2007). Allerdings hängt es bei einer Defizienz der NO-GC davon ab, welche Untereinheit nicht mehr exprimiert wird. Wird nämlich die α_1 - oder α_2 -Untereinheit der NO-GC nicht mehr exprimiert, so entwickeln diese Mäuse keinen gastrointestinalen Phänotyp (Mergia et al. 2006).

Inwieweit die *Irag1*-Defizienz zu einer gestörten Regulation des pH-Wertes führt, ist fraglich. IRAG1 wird im Thalamus exprimiert, während die PKGI unter anderem im *Nucleus tractus solitarius*, Cerebellum, Cortex und Hippocampus nachgewiesen worden ist (Geiselhöringer et al. 2004a; Singh et al. 2012). Die unterschiedliche Lokalisation von IRAG1 und der PKGI im Gehirn geben einen Hinweis darauf, dass es durch das Fehlen von IRAG1 nicht zu einer negativen Beeinflussung der Regulation des pH-Werts über den *Nervus vagus* kommen könnte, wie es bei *Prkg1*-defizienten Mäusen beschrieben ist. Aufgrund der unterschiedlichen Lokalisationen von IRAG1 und der PKGI ist die Interaktion zwischen IRAG1 und der PKGIβ so aber nicht möglich.

Ein Problem bei der Beurteilung dieses Ergebnisses stellt auch die Testmethode dar. Mit dem Haemocult®-Test kann nur fäkales okkultes Blut nachgewiesen werden. Der Ort der Blutung ist mit diesem Test jedoch nicht näher lokalisierbar. Das heißt, dass Blutungen vom Beginn, also ab dem Ösophagus abwärts, bis zum Ende des Rumpfdarmes (Rektum) detektiert werden. Eine Eingrenzung der Region, in der möglicherweise die Blutungsquelle zu finden ist, würde eine Beurteilung hinsichtlich der Auswirkung einer *Irag1*-Defizienz auf den Verdauungstrakt erleichtern.

Es lässt sich somit festhalten, dass die globale *Irag1*-Defizienz bei 14 Wochen alten Mäusen zu gastrointestinalen Blutungen führt, die aber hauptsächlich bei weiblichen Mäusen auftreten.

6.3 Anämie assoziierte Splenomegalie in Folge einer *Irag1*-Defizienz

6.3.1 *Irag1*-Defizienz führt zu einer Eisenmangelanämie

Abgeleitet aus der Erkenntnis, dass die *Irag1*-Defizienz zu gastrointestinalen Blutungen führt, hat sich die Frage nach den Folgen dieser Blutungen ergeben. 15 Wochen alte IRAG1-KO Mäuse entwickeln dabei eine Anämie, die – wie bereits bei den gastrointestinalen Blutungen zu beobachten gewesen ist – hauptsächlich bei weiblichen Mäusen aufgetreten ist (s. Abbildung 5.6). Auch *Irag1*-defiziente Mäuse mit einem Alter von 54 Wochen oder älter leiden ebenfalls an einer Anämie (s. Abbildung 5.8).

Dass der NO/cGMP/PKGI-Signalweg bei der Entwicklung einer Anämie eine Rolle spielen kann, ist bereits aus der Literatur bekannt. So leiden globale *Prkg1*-defiziente Mäuse an einer Anämie (Föller et al. 2008; Angermeier et al. 2016). PKGI-Rescue Mäuse sind ebenfalls anämisch, aber nicht in so einer starken Ausprägung wie es bei globalen *Prkg1*-defizienten Mäusen der Fall ist. Es kann aber keine Aussage darüber getroffen werden, welche der beiden PKGI-

Rescue-Mauslinien – SM-I α oder SM-I β – stärker von diesem Phänotyp betroffen ist. Beide Mauslinien sind für diese Untersuchung genutzt worden und es wurde nicht zusätzlich nach diesen beiden Genotypen ausgewertet (Föller et al. 2008). Anhand von PKGI-Rescue Mäusen ist gezeigt worden, dass sich die Anämie mit zunehmendem Alter entwickelt. Interessanterweise ist die Entwicklung der Anämie aber offenbar davon abhängig, welche Isoform der PGKI deletiert oder nicht mehr funktionsfähig ist. LZM-PKGI α Mäuse zeigen nämlich keine Symptome einer Anämie, obwohl in diesen Mäusen nur noch die PKGI β exprimiert wird (Michael et al. 2008; Ramchandran et al. 2014). Die altersabhängige Entwicklung der Anämie ist auch bei IRAG1-KO Mäusen zu beobachten gewesen. Im Alter von sieben Wochen liegt noch keine Anämie vor (s. Abbildung 5.7). Bei 15 Wochen alten Mäusen und Mäusen, die ein Alter von mindestens 54 Wochen aufweisen, ist eine Anämie feststellbar gewesen (s. Abbildung 5.6, Abbildung 5.8).

Die Tatsache, dass die LZM-PKGI α Mäuse an keiner Anämie leiden, globale *Prkg1*-defiziente Mäuse dagegen schon, deutet darauf hin, dass die PKGI β bei der Entwicklung der Anämie eine gewisse Rolle spielen muss. Auch die *Irag1*-Defizienz führt zu einer Anämie, wenn auch in einer schwächeren Form als bei *Prkg1*-defizienten Mäusen. Berücksichtigt man zudem, dass unter einer *Irag1*-Defizienz die Proteinexpression der PKGI β in Colon, Milz und Magen drastisch reduziert ist (s. Abbildung 5.15C, G, Abbildung 5.16C, G und Abbildung 5.17C, G), so ist es naheliegend, dass eine Unterbrechung des PKGI β /IRAG1-Signalweges maßgeblich für die Entwicklung einer Anämie verantwortlich sein muss.

Ursachen für eine Anämie können vielfältig sein, ausgehend von Blutungen bis hin zu Störungen der Erythropoese. Um nun herauszufinden, ob die Ursache der Anämie eine inadäquate Erythropoese ist, besteht die Möglichkeit die Anzahl der Retikulozyten zu bestimmen und den Retikulozytenproduktionsindex (RPI) zu berechnen. Mit beiden Werten kann beurteilt werden, ob eine (in-)adäquate Regeneration der Erythropoese vorliegt (Nebe et al. 2010). Hierzu sind IRAG1-KO und IRAG1-WT Mäuse untersucht worden, die ein Alter von 54 Wochen oder älter aufgewiesen haben. Es sind diese Mäuse gewählt worden, weil so sichergestellt gewesen ist, dass diese an einer Anämie leiden. Durch das fortgeschrittene Alter der Mäuse kann zudem eine klare Aussage getroffen werden, ob die Regeneration des Blutes (in-)adäquat ist. Wie erwartet haben diese sehr alten IRAG1-KO Tiere ebenfalls an einer Anämie gelitten. Die Zahl der Retikulozyten wie auch der RPI ist bei diesen Mäusen erhöht gewesen im Vergleich zu den WT-Mäusen (s. Abbildung 5.8). Somit ist die Anämie bei den *Irag1*-defizienten Mäusen nicht auf eine inadäquate Regeneration des Blutes zurückzuführen. Im Gegenteil, die erhöhte Anzahl an

Retikulozyten ist ein Zeichen dafür, dass die Erythropoese verstärkt stattfindet, um den Mangel an Erythrozyten in Folge der gastrointestinalen Blutungen zu kompensieren. Tatsächlich kommt es auch im Rahmen von Blutungen zu einer Zunahme der Retikulozyten (Dormann 2008). Auch bei globalen *Prkg1*-defizienten Tieren ist die Anzahl der Retikulozyten erhöht und somit scheidet auch bei diesen Tieren eine Störung in der Erythropoese als Ursache für die Anämie aus (Föllner et al. 2008; Angermeier et al. 2016). Die gastrointestinalen Blutungen sind auch bei der *Prkg1*-Defizienz von entscheidender Bedeutung. Dies erkennt man an der Tatsache, dass durch die Gabe von PPI sowohl bei globalen *Prkg1*-defizienten als auch bei PKGI-Rescue Mäusen die Blutungen abnehmen und diese Tiere auch keine Symptome einer Anämie mehr aufweisen (Singh et al. 2012; Angermeier et al. 2016).

Die Anämie der *Irag1*-defizienten Mäuse ist somit nicht eine Folge einer gestörten Erythropoese, sondern – wie auch bei *Prkg1*-defizienten Mäusen – durch die gastrointestinalen Blutungen verursacht.

Eine weitere Ursache für die Entstehung der Anämie könnte bei den Erythrozyten selbst zu suchen sein. Föllner et al. (2008) postulieren, dass die PKGI als Mediator für die Lebensdauer der Erythrozyten eine Rolle spielt. In diesem Zusammenhang ist aber darauf hinzuweisen, dass die Datenlage bezüglich einer Expression der PKGI in Erythrozyten kontrovers diskutiert wird. Angermeier et al. (2016) verneinen eine Expression der PKGI in Erythrozyten. Um die Aussage über eine etwaige Expression der PKGI sicher treffen zu können, ist die Expressionsanalyse in drei verschiedenen Laboratorien durchgeführt worden. Gleichzeitig wird aber auch postuliert, dass die PKGI in Erythrozyten exprimiert wird (Föllner et al. 2008; Cortese-Krott et al. 2018). Immunhistochemische Untersuchungen des Knochenmarks haben zudem ergeben, dass die PKGI nur in Megakaryozyten nachweisbar gewesen ist. In den anderen Zellen des Knochenmarks ist eine Detektion der PKGI nicht möglich gewesen (Weber et al. 2007). Die Frage, ob die PKGI in Erythrozyten vorhanden ist, ist aber nicht unerheblich für eine mögliche Expression von IRAG1 in Erythrozyten. In der Wissenschaft herrscht ein Konsens darüber, dass Erythrozyten während der Erythropoese ihre Zellorganellen verlieren (Grasso et al. 1978; Mortensen et al. 2010; Moras et al. 2017). Somit verlieren die Erythrozyten auch das ER, mit dem IRAG1 aber wiederum verbunden ist (Schlossmann et al. 2000). Es ist somit aus theoretischen Überlegungen heraus eher unwahrscheinlich, dass IRAG1 in Erythrozyten vorzufinden ist. Experimentelle Daten unterstützen diese Annahme, da IRAG1 in Erythrozyten nicht nachgewiesen werden konnte (Angermeier et al. 2016). Dieser Befund wird dadurch bestätigt, dass MRVII in K562 Zellen nicht nachweisbar gewesen ist (Shaughnessy et al. 1999). Bei dieser

Zelllinie handelt es sich um Erythroleukämiezellen, die spontan zu Zellen differenzieren können, die charakteristische Merkmale von Vorstufen von Erythrozyten aufweisen (Lozzio et al. 1981). Damit kann ausgeschlossen werden, dass IRAG1 in Erythrozyten exprimiert ist und die *Irag1*-Defizienz für die Anämie verantwortlich wäre. In Bezug auf die kurativen Effekte der PPI-Gabe bei globalen *Prkg1*-defizienten Mäusen sowie den PGKI-Rescue Mäusen ist es ebenfalls unwahrscheinlich, dass eine mögliche Expression der PKGI in den Erythrozyten einen relevanten Einfluss auf die Anämie hat. Durch die PPI-Gabe werden die gastrointestinalen Blutungen unterbunden und die Tiere leiden nicht mehr an einer Anämie (Angermeier et al. 2016). Würde die *Prkg1*-Defizienz bei den Erythrozyten eine entscheidende Rolle spielen, so wäre davon auszugehen, dass die Tiere – trotz des Unterbindens der gastrointestinalen Blutungen – weiter an einer Anämie leiden, möglicherweise in einer abgeschwächten Form.

Die bei den *Irag1*-defizienten Mäusen beobachtete Anämie ist also sehr wahrscheinlich auf die gastrointestinalen Blutungen zurückzuführen.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit ist die Frage aufgekommen, an was für einer Art von Anämie die *Irag1*^{-/-}-Mäuse leiden. Dabei waren zwei Faktoren entscheidend, zum einen die erniedrigte Konzentration des Hämoglobins (s. Abbildung 5.6C) und zum anderen die erhöhten Werte für MCV und MCH (s. Abbildung 5.6D, E). Ein erniedrigter Hämoglobinwert ist immer als ein Hinweis für einen Eisenmangel oder eine Eisenmangelanämie zu sehen. Ausgelöst beispielsweise durch gastrointestinale Blutungen (Clark 2008; Goddard et al. 2011; Ganz 2013; Camaschella 2019; Cotter et al. 2020; Pavord et al. 2020). Aus diesem Grund sind von 15 Wochen alten IRAG1-WT und IRAG1-Mäusen die Konzentration des Eisens im Plasma und die Proteinexpression der *Ferritin Light Chain* (FLC) in der Milz und der Leber bestimmt worden. Wie erwartet sind bei den *Irag1*-defizienten Tieren die Eisenkonzentration im Plasma (s. Abbildung 5.9) und die Proteinexpression der FLC in Milz und Leber (s. Abbildung 5.10) erniedrigt gewesen.

Im Körper wird Eisen für verschiedene Prozesse benötigt, der wichtigste ist dabei der Transport von Sauerstoff mit Hilfe des in Erythrozyten befindlichen Hämoglobins. Aus diesem Grund befindet sich die meiste Menge an im Körper gespeicherten Eisen im Hämoglobin. Dies entspricht in etwa einem Anteil von 70% des gespeicherten Eisens, während nur ein kleiner Anteil des Eisens frei im Plasma vorkommt. Der Tagesbedarf an Eisen wird zum größten Teil über den Abbau von gealterten und/oder geschädigten Erythrozyten durch Makrophagen abgedeckt und findet hauptsächlich in Milz und Leber statt. Da der tägliche Bedarf an Eisen größer ist als die im Plasma verfügbare Menge an Eisen, ist der Eisenumsatz im Plasma deutlich höher

(Hentze et al. 2010; Ganz 2013; Silva and Faustino 2015). Ein wichtiges Protein für die Speicherung von Eisen im Körper ist das Ferritin, mit dessen Hilfe überschüssiges Eisen in der Leber gespeichert wird. Es handelt sich dabei um ein Multimer aus 24 Untereinheiten einer schweren – *Ferritin Heavy Chain* (FHC) – und einer leichten – *Ferritin Light Chain* (FLC) – Polypeptidkette und kann bis zu 4500 Fe^{3+} -Ionen speichern (Harrison and Arosio 1996; Liu and Theil 2005; Clark 2008; Shi et al. 2008; Hentze et al. 2010; Silva and Faustino 2015). Ferritin eignet sich somit zur Beurteilung der Eisenspeicher im Körper. Sind die Ferritinwerte erniedrigt, so ist das ein Hinweis, dass die körpereigenen Eisenspeicher leer sind und somit ein Indiz für einen Eisenmangel (Harrison and Arosio 1996; Hentze et al. 2010). Durch die niedrige Plasmaeisenkonzentration, die erniedrigte FLC-Expression und das erniedrigte Hämoglobin sind bei *Irag1*-defizienten Mäusen alle Kriterien erfüllt, die unter anderem für die Diagnose einer Eisenmangelanämie gefordert werden (Clark 2008). Dass bei IRAG1-KO Mäusen ein Eisenmangel vorliegt, ist auch an der geringeren Eisenfärbung in den Milzen dieser Tiere zu sehen (s. Abbildung 5.12). Normalerweise wird in der Milz durch Makrophagen, die am Abbau der Erythrozyten beteiligt sind, eine große Menge an Eisen gespeichert (Ganz 2013). An der deutlichen Blaufärbung in den Aufnahmen der Milzen der Wildtypen ist dies auch gut zu erkennen (s. Abbildung 5.12).

Eine weitere Bestätigung dafür, dass die *Irag1*-defizienten Mäuse einen Eisenmangel aufweisen, ist die reduzierte mRNA-Expression von *Hamp* in der Leber dieser Mäuse (s. Abbildung 5.11A). *Hamp* ist das Gen, das für das Protein Hepcidin codiert. Hepcidin wird in der Leber gebildet und seine Hauptfunktion besteht darin, die intestinale Eisenaufnahme aus der Nahrung, die Freisetzung von recyceltem Eisen aus Makrophagen oder von gespeichertem Eisen aus den Hepatozyten zu regulieren. Zusätzlich reguliert es die Plasmakonzentration von Eisen über die Bindung an den Eisenexporter Ferroportin. Es handelt sich bei Hepcidin somit um das zentrale Protein zur Regulation der Eisenhämostase. Reguliert wird die Expression von Hepcidin über die systemische Verfügbarkeit von Eisen. Eine erhöhte Eisenkonzentration führt zu einer erhöhten Expression von Hepcidin und somit zu einer Hemmung der Aufnahme und/oder Freisetzung von Eisen. Bei einem Eisenmangel kommt es dagegen zu niedrigen Spiegeln von Hepcidin (Clark 2008; Hentze et al. 2010; Ganz and Nemeth 2012; Ganz 2013; Silva and Faustino 2015; Angermeier et al. 2016; Camaschella 2019). Die vorliegenden Befunde bei den *Irag1*^{-/-}-Mäusen stehen auch im Einklang mit der Literatur. Bei globalen *Prkg1*-defizienten Mäusen und bei PKGI-Rescue Mäusen ist ebenfalls eine Eisenmangelanämie beschrieben, allerdings in deutlich ausgeprägterer Form. Durch die PPI-Gabe, also das Unterbinden der gastrointestinalen Blutungen, wird der Eisenmangel verhindert. Dies erlaubt den Rückschluss, dass

die Blutungen verantwortlich für die Eisenmangelanämie sind (Angermeier et al. 2016). Die gastrointestinalen Blutungen sind aber nicht die einzige mögliche Ursache für den Eisenmangel. Hepcidin wird auch durch eine gesteigerte Erythropoese inhibiert. Eine gesteigerte Erythropoese führt ebenfalls zu einem erhöhten Bedarf an Eisen (Clark 2008; Hentze et al. 2010; Ganz and Nemeth 2012; Silva and Faustino 2015). Bei *Irag1*-defizienten Mäusen liegt eine gesteigerte Erythropoese vor, was an der erhöhten Zahl der Retikulozyten und dem erhöhten RPI zu sehen ist (s. Abbildung 5.8F, G).

Die Funktion des Transferrin-Rezeptors 1 (TfR1) ist es, die Aufnahme von Eisen in die Zellen zu vermitteln (Hentze et al. 2010; Ganz 2013; Silva and Faustino 2015). Liegt nun ein Eisenmangel vor, so kommt es zu einer vermehrten Expression des TfR1, damit vermehrt Eisen in die Zellen aufgenommen werden kann (Harrison and Arosio 1996; Hentze et al. 2010). Dieser Effekt ist auch bei globalen *Prkg1*-Mäusen zu beobachten, die in Folge der Anämie eine erhöhte mRNA-Expression des TfR1 aufweisen. Diese passt sich dann durch die Gabe von PPI wieder der TfR1-Expression von Wildtypmäusen an (Angermeier et al. 2016). Um zu überprüfen, ob auch bei IRAG1-KO Mäusen eine vermehrte Aufnahme von Eisen in die Zelle stattfindet, ist die Expression der mRNA des *Tfr1*-Gens in der Leber untersucht worden. Interessanterweise hat sich keine veränderte Genexpression bei IRAG1-KO Mäusen im Vergleich mit den IRAG1-WT Mäusen gezeigt (s. Abbildung 5.11B). Es findet somit offenbar keine verstärkte Aufnahme von Eisen in die Zellen statt.

Die bei *Irag1*-defizienten Mäusen vorliegende Eisenmangelanämie ist also eine Folge der gastrointestinalen Blutungen. Die Blutungen sind ursächlich dafür, dass es durch den chronischen Blutverlust zu einer negativen Eisenbilanz kommt. In Folge des Blutverlustes geht mehr Eisen aus dem Körper verloren, als in den Körper aufgenommen werden kann und durch den Abbau gealterter oder geschädigter Erythrozyten zur Verfügung steht. Verstärkt wird dieser Effekt zusätzlich noch durch die gesteigerte Erythropoese.

Wie bereits erwähnt zeigen *Irag1*-defiziente Mäuse erhöhte Werte für MCV und MCH (s. Abbildung 5.6D, E) und leiden somit an einer makrozytären Anämie. Dies ist insofern ungewöhnlich, da in Folge des Eisenmangels eine mikrozytäre Anämie zu erwarten gewesen wäre (Dormann 2008). Der Auslöser einer makrozytären Anämie ist meist ein Mangel an Vitamin B12 oder Folat, weshalb diese beiden Parameter bestimmt worden sind. Weibliche IRAG1-KO Mäuse haben einen Mangel an Vitamin B12 gezeigt. Bei männlichen IRAG1-KO Mäusen und in der Auswertung für beide Geschlechter ist der Vitamin B12 Mangel nicht nachweisbar gewesen (s. Abbildung 5.13A). Die Konzentration an Folat ist bei IRAG1-KO Mäusen dagegen

erhöht gewesen (s. Abbildung 5.13B). Vitamin B12 und Folat spielen bei der Erythropoese eine wichtige Rolle, da sie für die Proliferation der Erythroblasten während der Ausdifferenzierung mit verantwortlich sind. Ein Mangel an einer dieser beiden Substanzen beeinträchtigt unter anderem die DNA-Synthese und verursacht die Apoptose der Erythroblasten (Koury and Ponka 2004). Die Daten zu den IRAG1-KO Mäusen stehen in Einklang mit der Literatur. Für *Prkg1*-defiziente Mäuse sowie für PKGI-Rescue Mäuse ist ebenfalls eine makrozytäre Anämie beschrieben (Föllner et al. 2008; Angermeier et al. 2016). Die Konzentration von Vitamin B12 und Folat sind dabei in *Prkg1*-defizienten Mäusen erniedrigt gewesen, aber im Vergleich mit den Kontrollmäusen zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Als Erklärung für den Mangel ist dabei eine Malabsorption in Folge des gastrointestinalen Phänotyps der Tiere angenommen worden. Bei PKGI-Rescue Mäusen haben sich die Spiegel von Vitamin B12 und Folat dagegen nicht von denen der Kontrollmäuse unterschieden (Föllner et al. 2008). Neben einer makrozytären Anämie wäre die Folge eines Mangels an Vitamin B12 oder Folat eine erniedrigte Anzahl an Retikulozyten (Dormann 2008). Dies ist bei der *Irag1*-Defizienz aber nicht der Fall (s. Abbildung 5.8F, G). Ursachen für einen Mangel an Vitamin B12 und/oder Folat können beispielsweise Resorptionsstörungen, eine verminderte Zufuhr oder eine gestörte Utilisation sein. Aber auch ein vermehrter Verbrauch dieser beiden Stoffe im Rahmen der Erythropoese kann die Ursache für einen Mangel darstellen (Haferlach 2020).

Der Vitamin B12 Mangel ist somit sehr wahrscheinlich nicht auf eine Malabsorption zurückzuführen, in deren Folge es zu einer makrozytären Anämie kommt. Vielmehr ist es wahrscheinlich, dass die gesteigerte Erythropoese der *Irag1*-defizienten Mäuse mit der Zeit zu einem Vitamin B12 Mangel führt, mit der Folge einer makrozytären Anämie.

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass es durch die *Irag1*-Deletion zu einer Eisenmangelanämie kommt, da die Eisenbilanz durch die gastrointestinalen Blutungen negativ ist. Der Blutverlust bei *Irag1*-defizienten Mäusen führt zu einer gesteigerten Erythropoese, um diesen auszugleichen. Die gesteigerte Erythropoese führt zudem zu einer Hypocobalaminämie, die die Ursache der makrozytären Anämie ist.

Die hier beschriebenen pathologischen Vorgänge einer *Irag1*-Defizienz, die zur Entstehung der Anämie und der daraus resultierenden Veränderungen führen, sind in Abbildung 6.1 nochmals schematisch dargestellt.

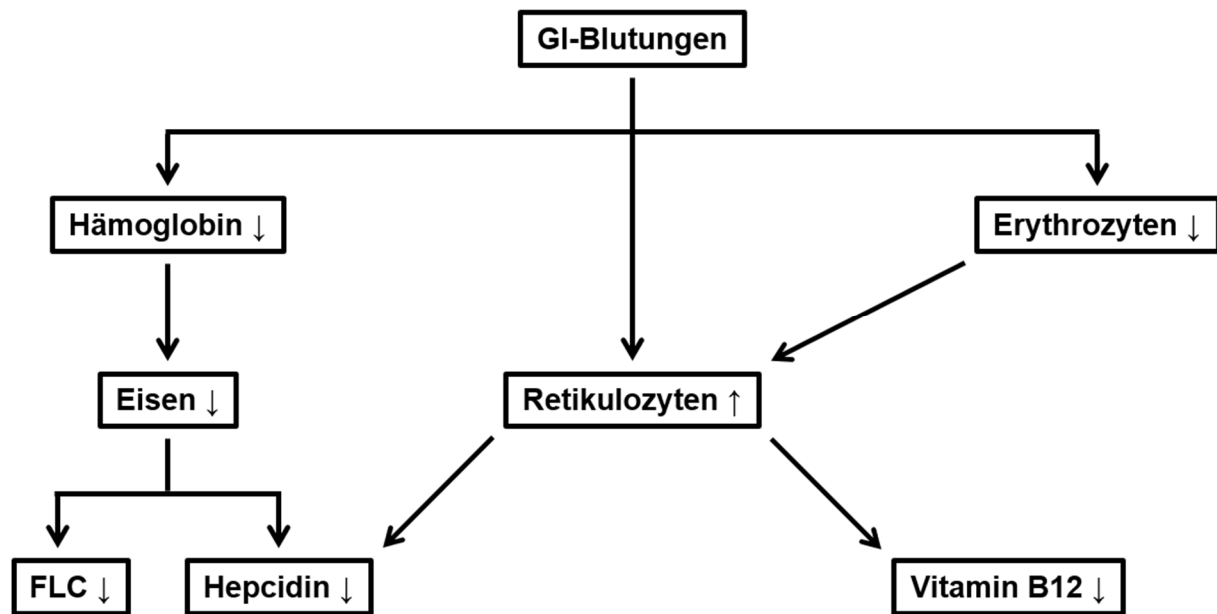


Abbildung 6.1: Schematische Darstellung der Entstehung der Eisenmangelanämie.

In Folge der gastrointestinalen Blutungen kommt es bei *Iragl*-defizienten Mäusen zu einer Abnahme der Hämoglobinkonzentration und der Erythrozyten. Die gesteigerte Erythropoese in Folge der Blutungen wie auch die Blutungen selbst führen zu einer Zunahme der Retikulozyten. In Folge des erniedrigten Hämoglobins kommt es zu einem Mangel an Eisen und dadurch zu einer verminderten Bildung von Hepcidin. Die Reduktion der Bildung von Hepcidin wird dabei durch die gesteigerte Erythropoese verstärkt. Zu dem kommt es durch die gesteigerte Erythropoese zu einem Mangel an Vitamin B12.

6.3.2 *Iragl*-Defizienz führt in Folge der Eisenmangelanämie zu einer Splenomegalie

Die Ursachen der pathologischen Prozesse, die zur Ausbildung einer Splenomegalie führen, können vielfältig sein. Hierzu zählt man Infiltrationen, wie beispielsweise Leukämien oder das Hodgkin-Lymphom, verminderter Blutabfluss durch portale Hypertension, unter anderem verursacht durch eine Leberzirrhose, und durch eine verstärkte Aktivität der Milz selbst. Hierbei kann die Ursache eine gestörte oder verstärkte Immunreaktion sein oder der verstärkte Abbau veränderter oder defekter Blutzellen in Folge einer Anämie.

Im Rahmen von vorausgegangen Arbeiten an *Iragl*-defizienten Mäusen und *Iragl*^{Δ12/12}-Mausmutanten hat es bereits Hinweise auf eine Splenomegalie gegeben (Geiselhöringer et al. 2004b; Desch et al. 2010). Aus diesem Grund ist diese Fragestellung auch in der vorliegenden Arbeit aufgegriffen worden, zumal es einen Zusammenhang zwischen Anämie und Splenomegalie gibt.

Die Untersuchungen haben dabei ergeben, dass die *Iragl*-Defizienz bei 15 Wochen alten Mäusen zu einem erhöhten Milzgewicht und einem erhöhten Verhältnis von Milzgewicht zu Körpergewicht führt im Vergleich mit den Wildtypwurfgeschwistern (s. Abbildung 5.4A, C). Bei sieben Wochen alten Mäusen waren dagegen keine diesbezüglichen Veränderungen feststellbar (s. Abbildung 5.5A, C). Auffallend ist auch hier, dass wie bei den hämatologischen Parametern

hauptsächlich nur weibliche *Irag1*^{-/-}-Mäuse betroffen gewesen sind. Das Körpergewicht der IRAG1-KO Mäuse hat sich nicht von dem Körpergewicht der IRAG1-WT Mäuse unterschieden (s. Abbildung 5.4B). Es konnte somit sehr früh als eine mögliche Ursache für das erhöhte Verhältnis aus Milzgewicht zu Körpergewicht ausgeschlossen werden. Die Splenomegalie ist somit sehr wahrscheinlich durch die Anämie hervorgerufen worden.

Von *Prkg1*-defizienten und PKGI-Rescue Mäusen ist bekannt, dass sie neben der Anämie auch an einer Splenomegalie leiden. Diese ist bei PKGI-Rescue Mäusen mit zunehmendem Alter immer stärker ausgeprägt (Föller et al. 2008; Angermeier et al. 2016). Indem *Prkg1*-defizienten Mäusen und PKGI-Rescue Mäusen Esomeprazol (PPI) über das Futter verabreicht worden ist, sind nicht nur die gastrointestinalen Blutungen und dadurch die Anämie verhindert oder gelindert worden. In Folge der Behandlung mit PPI ist es bei diesen Mäusen zu keiner Ausbildung der Splenomegalie gekommen (Angermeier et al. 2016). Die Autoren haben daraus geschlossen, dass die Splenomegalie eine Folge der Anämie sein muss. Dass es einen klinischen Zusammenhang zwischen einer Eisenmangelanämie und einer Splenomegalie gibt, ist mit Hilfe des divalenten Metallionentransporters 1 (DMT1) nachgewiesen worden. Bei DMT1 handelt es sich um ein integrales Membranprotein, das vor allem auf der apikalen duodenalen Bürstensaummembran lokalisiert ist. Es transportiert Fe²⁺-Ionen, die zuvor von Fe³⁺ zu Fe²⁺ reduziert worden sind, in das Zytoplasma der Enterozyten. Neben Eisen wird über DMT1 unter anderem auch Cobalt und Zink transportiert (Hentze et al. 2010; Ganz 2013; Silva and Faustino 2015; Camaschella 2019). Mäuse, bei denen intestinales DMT1 deletiert worden ist (DMT1^{int/int}), sind nicht mehr in der Lage Eisen über den Gastrointestinaltrakt aufzunehmen. Diese Mäuse leiden dadurch an einem Eisenmangel und so können dessen Effekte auf den Organismus untersucht werden. DMT1^{int/int}-Mäuse zeigen die klassischen Symptome einer Eisenmangelanämie wie beispielsweise einen reduzierten Hämoglobingehalt, eine erniedrigte Erythrozytenzahl, eine erhöhte Anzahl an Retikulozyten sowie eine verminderte mRNA-Expression von *Hamp* (Shawki et al. 2015). Alle diese Symptome sind auch bei der *Irag1*-Defizienz vorzufinden. Zudem entwickeln die DMT1^{int/int}-Mäuse, in Folge der fehlenden intestinalen Expression von DMT1, eine Splenomegalie. Das heißt, dass sich eine Splenomegalie auch durch einen Eisenmangel entwickeln kann.

Füttert man Wildtypmäuse mit einer Diät, die wenig Eisen enthält, so entwickeln diese ebenfalls eine Eisenmangelanämie. Neben einer Reduktion des Hämoglobins und einem Anstieg der Retikulozyten kommt es auch zu einer vermehrten Expression von Phosphatidylserin (PS) auf den Erythrozyten. Die Erythrozyten weisen deshalb unter diesen Bedingungen eine verkürzte Lebensdauer auf (Kempe et al. 2006). Föller et al. (2008) haben die Splenomegalie bei *Prkg1*-

defizienten Mäusen mit der verkürzten Lebensdauer der Erythrozyten begründet. Durch die *Prgkl*-Defizienz kommt es auf den Erythrozyten zu einer vermehrten Expression von PS. PS dient Makrophagen als Signal zur Phagozytose der Erythrozyten in der Milz. Es entsteht somit ein Kreislauf von einer verstärkten Ansammlung von Erythrozyten und Makrophagen in der Milz, der schlussendlich zu der Splenomegalie führt. Anhand der Ausführungen in Kapitel 6.3.1 gibt es keine Evidenz, dass IRAG1 in irgendeiner Form an diesen Prozessen in den Erythrozyten beteiligt ist.

Überträgt man diese Daten nun auf die Symptome, die eine *Iragl*-Defizienz zur Folge hat, so kommt man zu folgendem Fazit. Durch die *Iragl*-Defizienz kommt es zu gastrointestinalen Blutungen, die eine Anämie zur Folge haben. Die Blutungen an sich und die gesteigerte Erythropoese, um die Anämie zu kompensieren, führen dann zu einem Eisenmangel. Der Eisenmangel wirkt sich auf die Erythrozyten in der Form aus, dass diese möglicherweise vermehrt PS auf ihrer Oberfläche exprimieren. Diese Erythrozyten werden deshalb vermehrt und schneller in der Milz durch Makrophagen abgebaut. So baut sich über die Zeit hin ein Kreislauf auf, aus einer andauernden Zunahme an Erythrozyten und Makrophagen in der Milz, so dass es zur Ausbildung der Splenomegalie kommt. Die Splenomegalie ist bei einer *Iragl*-Defizienz somit ein sekundäres Symptom der Anämie und nicht die Ursache für die Anämie.

Eine weitere mögliche Ursache für eine Splenomegalie kann auch eine pulmonale arterielle Hypertonie (PAH) sein. Untersuchungen an Patienten, die an einer idiopathischen und hereditären PAH leiden, haben ergeben, dass diese Patienten eine Splenomegalie entwickeln können (Tonelli et al. 2013). Dieser Befund ist dahingehend interessant, da IRAG1-KO Mäuse eine pulmonale Hypertonie entwickeln (Biswas et al. 2020). In wieweit und ob die PAH eine weitere Ursache für die Entwicklung einer Splenomegalie darstellt oder für deren Verstärkung von Bedeutung ist, muss aber in weiteren Studien untersucht werden.

Es ist auffallend gewesen, dass die in dieser Arbeit beschriebenen pathologischen Effekte einer *Iragl*-Defizienz hauptsächlich bei weiblichen Mäusen aufgetreten sind. Ob das ein für den cGMP/PKGI-Signalweg spezifischer Effekt ist, ist leider nicht einfach zu klären. Föller et al. (2008) haben für ihre gesamten Untersuchungen männliche und weibliche Mäuse verwendet und die Resultate nicht zusätzlich geschlechtsspezifisch ausgewertet. Von Angermeier et al. (2016) sind keine Informationen über das Geschlecht der untersuchten Mäuse vorhanden. Bekannt ist aber, dass es cGMP-abhängige geschlechtsspezifische Effekte auf den Gastrointestinaltrakt gibt. An diesen Effekten ist Estrogen beteiligt, weshalb diese im weiblichen Organismus stärker ausgeprägt sind als im männlichen Organismus (Al-Shboul et al. 2018). Es besteht also

durchaus die Möglichkeit, dass es weitere geschlechtsabhängige Effekte bei der Regulation des Gastrointestinaltraktes gibt. Die Untersuchungen an den DMT1^{int/int}-Mäusen sind zu einem großen Teil an männlichen und weiblichen Mäusen durchgeführt und geschlechtsspezifisch ausgewertet worden. Dabei hat sich wiederum gezeigt, dass die Effekte der Deletion von DMT1 sich zwischen den männlichen und den weiblichen Mäusen nicht unterscheiden haben (Shawki et al. 2015). Somit scheint die Aufnahme von Eisen aus dem Gastrointestinaltrakt nicht durch geschlechtsspezifische Effekte beeinflusst zu sein.

Generell bleibt festzuhalten, dass eine Anämie und ein Eisenmangel ein Gesundheitsproblem sind, das die ganze Welt betrifft und eine der häufigsten Erkrankungen bei Frauen ist. Ursachen können neben einer Mangelernährung – unter anderem verursacht durch Veganismus –, eine Schwangerschaft oder auch Blutungen unterschiedlicher Genese sein. Bei Frauen sind vor allem die uterinen Blutungen und die Menstruationsblutung die Hauptursache für einen Eisenmangel oder eine (Eisenmangel-)Anämie. Der Eisengehalt bei menstruierenden Frauen liegt im Mittel bei 40 mg·kg⁻¹ des Körpergewichtes, während er bei Männern bei 50 mg·kg⁻¹ des Körpergewichtes liegt. Durch die Menstruationsblutung verliert eine Frau pro Tag 10 mg Eisen und während des gesamten Menstruationszyklus insgesamt 42 mg Eisen. Im Vergleich dazu liegt der tägliche Verlust an Eisen bei Männern und nichtmenstruierenden Frauen bei 1 mg pro Tag (Clark 2008; Benson et al. 2021).

6.4 Einfluss der *Irag1*-Defizienz auf die Expression von Proteinen im cGMP/PKGI-Signalweg

Die *Irag1*-Defizienz führt in Bezug auf die Anämie zu einem ähnlichen Phänotyp, wie er bei der *Prkg1*-Defizienz zu beobachten ist. Dies war überraschend, obwohl es bekannt war, dass IRAG1 von der PKGI β phosphoryliert wird und die Intensität der Proteinexpression und Lokalisation der beiden Proteine korreliert (Geiselhöringer et al. 2004a). Aus diesem Grund ist in Colon, Milz und Magen von IRAG1-WT und IRAG1-KO Mäusen die Protein- und Genexpression von Proteinen untersucht worden, die für den cGMP/PKGI-Signalweg relevant sind.

Überraschend war dabei das Ergebnis *in puncto* Proteinexpression der PKGI β in diesen drei Geweben. In Folge der *Irag1*-Defizienz ist die Proteinexpression der PKGI β in Colon, Milz und Magen drastisch reduziert (s. Abbildung 5.15C, G, Abbildung 5.16C, G, Abbildung 5.17C, G). Die PKGI β ist in diesen Geweben fast nicht mehr nachweisbar. Ein ähnlicher Befund ist im Colon von *Irag1* ^{$\Delta 12/\Delta 12$} -Mäusen bereits beschrieben worden, wie auch bei *Irag1*^{-/-}-Mäusen,

allerdings ohne statistische Auswertung (Geiselhöringer et al. 2004b; Desch et al. 2010). Auch in der Lunge und im rechten Ventrikel des Herzens kommt es bei IRAG1-KO Mäusen zu dieser deutlichen Reduktion der Proteinexpression der PKGI β (Biswas et al. 2020). Die Ergebnisse zur Proteinexpression der PKGI β in Colon, Milz und Magen von globalen *Irag1*-defizienten Mäusen stehen damit im Einklang mit der Literatur. Allerdings hat sich nun die Frage nach der Ursache für diese deutlich verringerte Proteinexpression gestellt, für die es zwei Möglichkeiten gibt. Die erste Möglichkeit ist, dass es in Folge der *Irag1*-Defizienz zu einer veränderten Genexpression kommt, so dass weniger mRNA vorliegt und schlussendlich weniger PKGI β -Protein gebildet wird. Als zweite Möglichkeit kann in Betracht gezogen werden, dass es durch die *Irag1*-Defizienz zu posttranslationalen Effekten kommt, die Einfluss auf die Expression oder die Stabilität des PKGI β -Proteins haben. Dabei hat sich herausgestellt, dass sich der mRNA-Gehalt von *Prkg1b* in den IRAG1-KO Mäusen kaum von dem der IRAG1-WT Mäuse unterschieden hat (s. Abbildung 5.18C). Somit ist die reduzierte Proteinexpression der PKGI β keine Folge einer verminderten Genexpression durch die *Irag1*-Defizienz. Es kann somit angenommen werden, dass IRAG1 von enormer Bedeutung für die Stabilität der PKGI β ist, sehr wahrscheinlich durch die Bildung des Komplexes aus IRAG1, PKGI β und IP₃R-I (Schlossmann et al. 2000). PKGI β und PKGI α stabilisieren sich nicht gegenseitig. Dies ist in Untersuchungen zur Proteinexpression von PKGI β und PKGI α in LZM-PKGI α Mäusen gezeigt worden. Obwohl die PKGI α nicht mehr in diesen Mäusen exprimiert worden ist, ist die Proteinexpression der PKGI β unverändert geblieben (Michael et al. 2008; Ramchandran et al. 2014). Als einer der potenziellen Abbaumechanismen der PKGI β kann eine verstärkte Ubiquitinierung vermutet werden, wie er für die PKGI α bekannt ist (Dey et al. 2009).

Die Proteinexpression der PKGI α , die kein Interaktionspartner von IRAG1 ist, ist im Colon von *Irag1*-defizienten Mäusen nicht verändert (s. Abbildung 5.15D, G). Dies ist im Einklang mit den bereits bekannten Daten zur Proteinexpression der PKGI α im Colon und der Aorta von *Irag1*^{-/-}- und *Irag1* ^{Δ 12/ Δ 12}-Mäusen (Geiselhöringer et al. 2004b; Desch et al. 2010). In der Milz und im Magen von IRAG1-KO Mäusen ist dagegen die Expression der PKGI α erhöht gewesen (s. Abbildung 5.16D, G, Abbildung 5.17D, G). Allerdings ist nur im Magen von IRAG1-KO Mäusen die mRNA-Expression von *Prkg1a* erhöht (s. Abbildung 5.18D). In der Lunge von *Irag1*-defizienten Mäusen ist die Proteinexpression der PKGI α ebenfalls nicht verändert (Biswas et al. 2020). Eine mögliche Erklärung für die erhöhte Proteinexpression der PKGI α in der Milz *Irag1*-defizienter Mäuse kann in der Splenomegalie zu suchen sein. Durch die Splenomegalie befinden sich unweigerlich mehr Zellen aus dem Blut in der Milz, darunter auch Thrombozyten, die die PKGI α exprimieren. Es ist somit möglich, dass die gemessene Erhöhung der

PKGI α -Proteinexpression eine Folge der erhöhten Anzahl an Thrombozyten in der Milz ist (Geiselhöringer et al. 2004a). Schlussendlich ist PKGI α nicht in der Lage die reduzierte Expression der PKGI β zu kompensieren. In diesem Zusammenhang ist auch zu beachten, dass globale *Prkg1*-Mäuse einen ausgeprägten Phänotyp bezüglich Anämie und Splenomegalie haben (Pfeifer et al. 1998; Föller et al. 2008; Singh et al. 2012; Angermeier et al. 2016). LZM-PKGI α Mäuse leiden dagegen nicht an diesem Phänotyp, haben keine veränderte Proteinexpression der PKGI β und haben keine reduzierte Lebenserwartung (Michael et al. 2008; Ramchandran et al. 2014).

Es ist somit anzunehmen, dass bei den hier beschriebenen Phänotypen einer globalen *Irag1*-Defizienz die reduzierte Proteinexpression der PKGI β ein weiterer Faktor für die Entwicklung dieser Phänotypen darstellt. Daraus lässt sich ableiten, dass die Unterbrechung des PKGI β /IRAG1-Signalweges von entscheidender Bedeutung ist, da globale *Prkg1*-defiziente Mäuse die gleichen Phänotypen entwickeln.

Die Untersuchung der Proteinexpression des IP₃R-I hat gezeigt, dass dieser ebenfalls durch die *Irag1*-Deletion beeinflusst wird. Im Colon und Magen von IRAG1-KO Mäusen ist eine reduzierte Expression des IP₃R-I festgestellt worden (s. Abbildung 5.15B, G, Abbildung 5.17B, G). Die Analyse der mRNA von *Itpr1* in diesen Organen ist dagegen bei den IRAG1-KO Mäusen nicht reduziert gewesen im Vergleich mit IRAG1-WT Mäusen (s. Abbildung 5.18B). Beobachtungen, die dieses Ergebnis unterstützen, sind bereits im Colon von globalen *Irag1*^{-/-}- und *Irag1* ^{Δ 12/ Δ 12}-Mäusen gemacht worden (Geiselhöringer et al. 2004b; Desch et al. 2010). In der Milz hat sich ein anderes Resultat ergeben. In IRAG1-KO Mäusen ist es zu einer erhöhten Proteinexpression des IP₃R-I gekommen (s. Abbildung 5.16B, G), trotz einer verminderten mRNA-Expression (s. Abbildung 5.18B). Dass eine Defizienz von IRAG1 auch zu einer vermehrten Expression des IP₃R-I führt, ist auch in der Lunge und des rechten Ventrikels des Herzens beobachtet worden (Biswas et al. 2020).

Da die mRNA-Expression des für den IP₃R-I codierenden Gens in den meisten Organen von IRAG1-KO Mäusen nicht verändert ist, unterstützt dieser Befund ebenfalls die Hypothese, dass IRAG1 einen stabilisierenden Effekt auf seine Interaktionspartner hat.

6.5 Hypothese zur Bedeutung des PKGI β /IRAG1-Signalweges

Auf Grundlage der in dieser Arbeit erhobenen Daten und den Gemeinsamkeiten der pathophysiologischen Phänotypen der globalen *Irag1*- und der globalen *Prkg1*-Defizienz, lässt sich folgende Hypothese für die Bedeutung des PKGI β /IRAG1-Signalweges formulieren (s. Abbildung 6.2). In Wildtypmäusen führt der intakte cGMP/PKGI-Signalweg dazu, dass sich die Mäuse normal entwickeln. PKGI α und PKGI β phosphorylieren ihre Substratproteine, unter anderem IRAG1. Bei *Prkg1*-defizienten Mäusen ist der von cGMP ausgehende Signalweg aufgrund der Deletion der PKGI unterbrochen. Die Substratproteine können so nicht von der PKGI α oder der PKGI β phosphoryliert werden. Das hat zur Folge, dass die *Prkg1*-defizienten Mäuse unter anderem gastrointestinale (GI) Beschwerden, eine Anämie und Splenomegalie entwickeln. *Irag1*-defiziente Mäuse zeigen in abgeschwächter Form die gleichen pathophysiologischen Veränderungen. Durch das Fehlen von IRAG1 kommt es zu einer Reduktion des PKGI β -Proteins, weshalb die Phosphorylierung von Substratproteinen der PKGI β abnimmt. Die Expression der PKGI α ist durch die *Irag1*-Defizienz nicht beeinflusst und somit kommt es auch zu keinen Veränderungen in den von der PKGI α ausgehenden Signalwegen.

Eine Unterbrechung des PKGI β /IRAG1-Signalweges ist somit maßgeblich verantwortlich für die Ausbildung der gastrointestinalen Beschwerden, der Anämie und der Splenomegalie sowohl bei *Prkg1*- als auch bei *Irag1*-defizienten Mäusen.

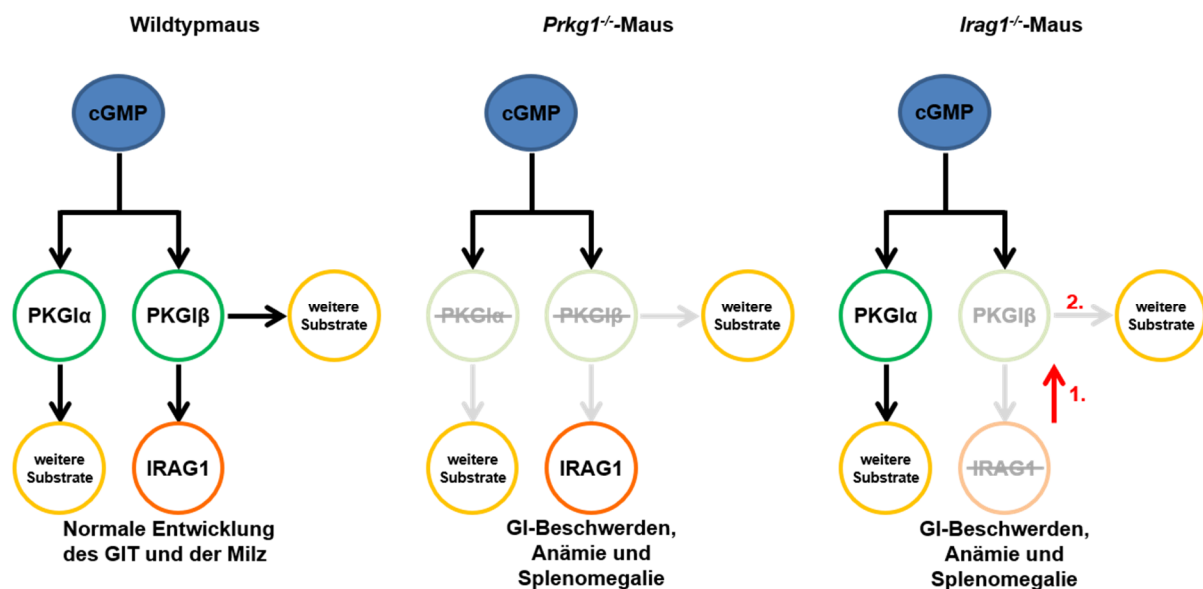


Abbildung 6.2: Hypothese zur Funktion des PKGI β /IRAG1-Signalweges.

Wildtypmäuse haben einen funktionsfähigen cGMP/PKGI-Signalweg und somit keinerlei Beschwerden. Sowohl die PKGI α als auch die PKGI β können uneingeschränkt ihre Substratproteine phosphorylieren. Bei *Prkg1*^{-/-}-Mäusen kommt es zur Entwicklung von gastrointestinalen (GI) Beschwerden, einer Anämie und Splenomegalie. *Irag1*^{-/-}-Mäuse entwickeln in abgeschwächter Form dieselben Phänotypen. In Folge der *Irag1*-Defizienz kommt es zusätzlich zu einer Reduktion des PKGI β -Proteins (1.) und zu einer Abnahme der Phosphorylierung von Substraten der PKGI β (2.). Die durchgestrichenen Enzyme und Proteine repräsentieren die Deletion des entsprechenden Gens und somit auch die nicht vorhandene Expression. Inaktive oder abgeschwächte Signalwege sind mit Hilfe von hellen Farben dargestellt.

7 Zusammenfassung

Das Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor assoziierte cGMP Kinase Substrat 1 (IRAG1) ist ein Substratprotein des NO/cGMP/PKG-Signalweges und bildet zusammen mit der PKGI β und dem IP₃R-I einen Komplex. Als Substratprotein des NO/cGMP/PKG-Signalweges wird IRAG1 von der PKGI β phosphoryliert und reguliert so die über cGMP vermittelte IP₃-abhängige Ca²⁺-Freisetzung. Im murinen Organismus weist IRAG1 eine große Gewebedistribution auf und ist hauptsächlich in glattmuskelhaltigen Geweben lokalisiert, beispielsweise im Colon, dem Magen oder der Lunge. Aber auch in Thrombozyten und in geringem Umfang in der Milz ist IRAG1 zu finden. Durch die Bildung des Komplexes mit der PKGI β korrelieren IRAG1 und PKGI β in der Lokalisation und Intensität der Proteinexpression. Aus der fast ubiquitären Expression der PKGs ergibt sich für den NO/cGMP/PKG-Signalweg eine enorme Bedeutung. So führt eine *Prkg1*-Defizienz unter anderem zu gastrointestinalen Blutungen, einer Anämie und Splenomegalie.

Aufgrund der Tatsache, dass die Lokalisation und Proteinexpression von IRAG1 und PKGI β eng miteinander korrelieren, ist im Rahmen dieser Arbeit der (patho-)physiologische Einfluss von IRAG1 auf die Entstehung einer Anämie und Splenomegalie hin untersucht worden.

In Folge der *Irag1*-Defizienz leiden die IRAG1-KO Mäusen an gastrointestinalen Blutungen und einer Anämie. Beide Symptome manifestieren sich erst ab einem Alter von 14 Wochen. Die nähere Charakterisierung der Anämie hat dabei ergeben, dass die Tiere sowohl an einem Eisenmangel als auch an einer Hypocobalaminämie leiden, bei einer adäquaten Regeneration des Blutes. Weiterhin entwickeln *Irag1*-defiziente Mäuse mit zunehmendem Alter eine Splenomegalie. Interessanterweise sind die beobachteten Symptome dabei hauptsächlich bei weiblichen *Irag1*^{-/-}-Mäusen aufgetreten.

Die beobachtete Eisenmangelanämie ist die Folge der gastrointestinalen Blutungen, da es durch die Blutungen zu einer negativen Eisenbilanz kommt. Auch die Splenomegalie ist sehr wahrscheinlich auf den Eisenmangel zurückzuführen, da hypochrome Erythrozyten beschleunigt in der Milz abgebaut werden. Ursache für die Hypocobalaminämie ist dagegen die gesteigerte Erythropoese, die in den IRAG1-KO Mäusen nachgewiesen werden konnte.

In einem weiteren Teil der Arbeit ist der Einfluss der *Irag1*-Defizienz auf die Expression von relevanten Proteinen des cGMP/PKGI-Signalweges untersucht worden. Hierbei hat sich gezeigt, dass es durch die fehlende Proteinexpression von IRAG1 zu einer deutlich reduzierten Proteinexpression der PKGI β kommt. Eine reduzierte mRNA-Expression von *Prkg1b* ist aber

nicht die Ursache, so dass es sich um einen posttranslationalen Effekt handeln muss. Dagegen ist die Proteinexpression der PKGI α nicht durch die *Irag1*-Defizienz beeinflusst. Für den IP₃R-I ist in einigen Organen ebenfalls eine reduzierte Proteinexpression festgestellt worden. IRAG1 hat somit einen entscheidenden Einfluss auf die Stabilität seiner Interaktionspartner, mit denen es zusammen den Komplex bildet.

Zusammenfassend kommt es somit bei einer *Irag1*-Defizienz zu gastrointestinalen Blutungen und als deren Folge zu einer Anämie und Ausbildung einer Splenomegalie. Gleichzeitig führt die *Irag1*-Deletion zu einer deutlich reduzierten Proteinexpression der PKGI β . Die Defizienz des PKGI β /IRAG1-Signalweges ist somit verantwortlich für die Entstehung der gastrointestinalen Blutungen, der Anämie und Splenomegalie bei *Irag1*-defizienten und *Prkg1*-defizienten Mäusen. Zudem kann mit der globalen *Irag1*-defizienten Maus nicht nur die (patho-)physiologische Funktion von IRAG1 untersucht werden, sie ist auch ein hilfreicher Modellorganismus, um im Rahmen von zukünftigen Studien die (patho-)physiologische Funktion der PKGI β auf Proteinebene, bei gleichzeitiger Expression der PKGI α , zu untersuchen.

8 Anhang

8.1 Totalproteinaufnahmen

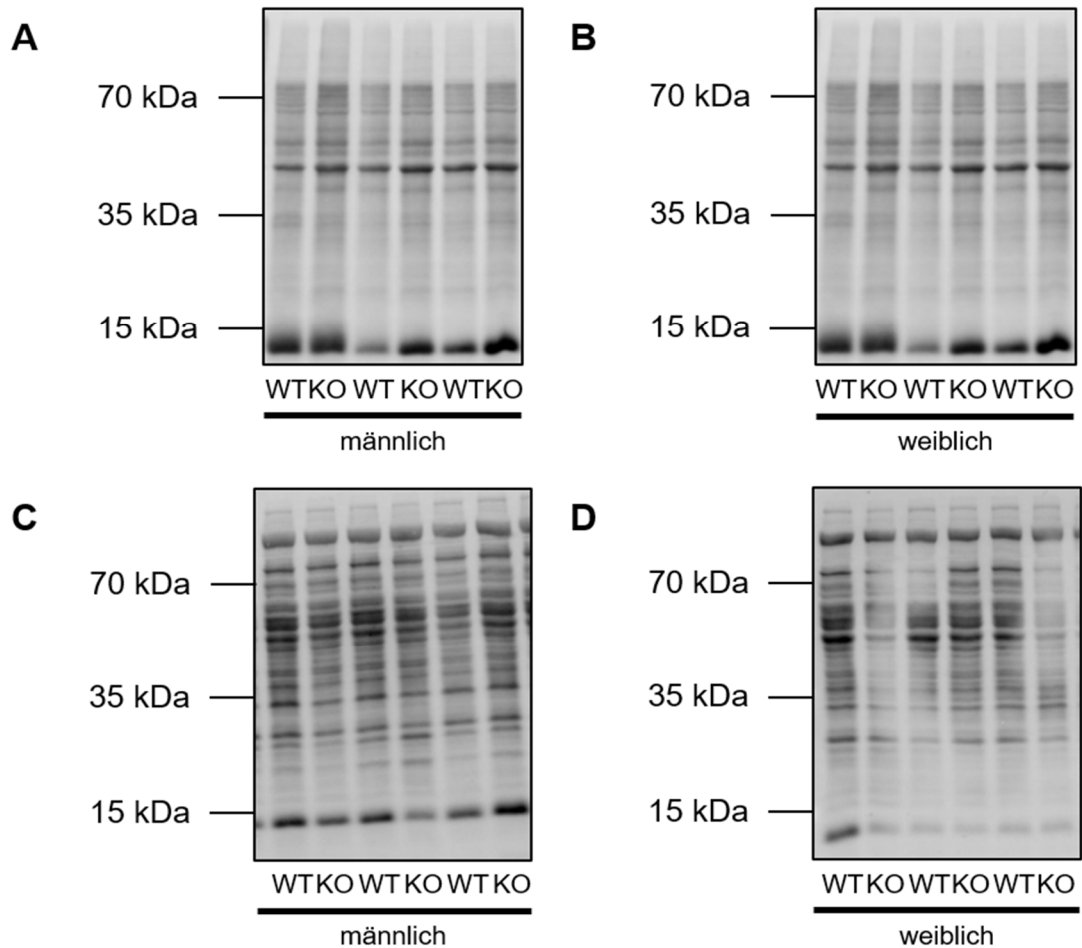


Abbildung 8.1: Totalproteinaufnahmen von Milz und Leber.

Totalproteinaufnahmen von Milz (A, B) und Leber (C, D) von männlichen und weiblichen IRAG1-WT (WT) und IRAG1-KO Mäusen (KO). Die Aufnahmen zur FLC-Expression sind in Kapitel 5.5.2 (s. Abbildung 5.10A, C) zu finden.

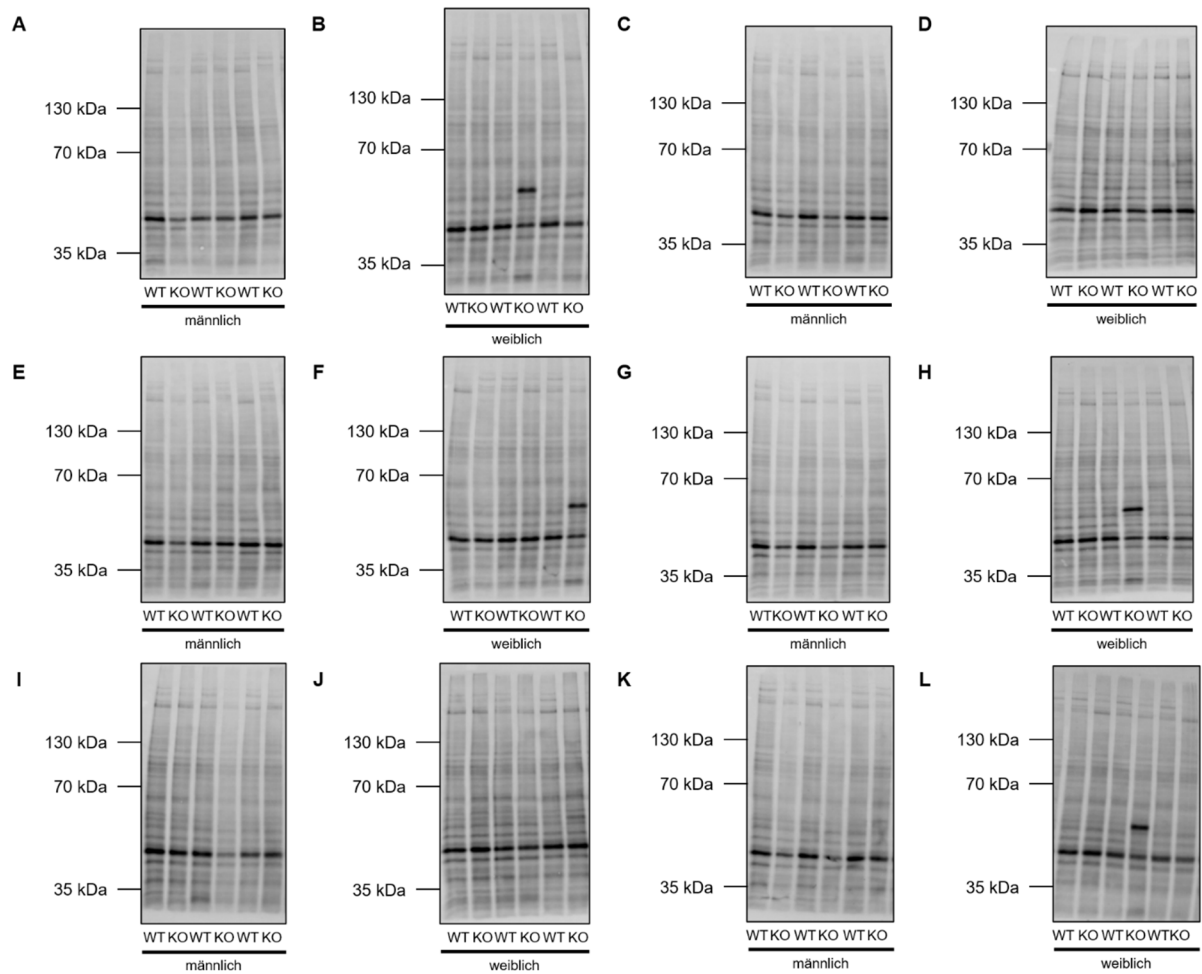


Abbildung 8.2: Totalproteinaufnahmen von Cola.

Totalproteinaufnahmen von männlichen und weiblichen IRAG1-WT (WT) und IRAG1-KO Mäusen (KO). **A, B:** Totalproteinaufnahme zur Proteinexpression von IRAG1. **C, D:** Totalproteinaufnahme zur Proteinexpression des IP₃R-I. **E, F:** Totalproteinaufnahme zur Proteinexpression der PKGI β . **G, H:** Totalproteinaufnahme zur Proteinexpression der PKGI α . **I, J:** Totalproteinaufnahme zur Proteinexpression des IP₃R-III. **K, L:** Totalproteinaufnahme zur Proteinexpression der NO-GC- β 1. Die Aufnahmen zur Expression der jeweiligen Proteine sind in Kapitel 5.7.1 (s. Abbildung 5.15) zu finden.

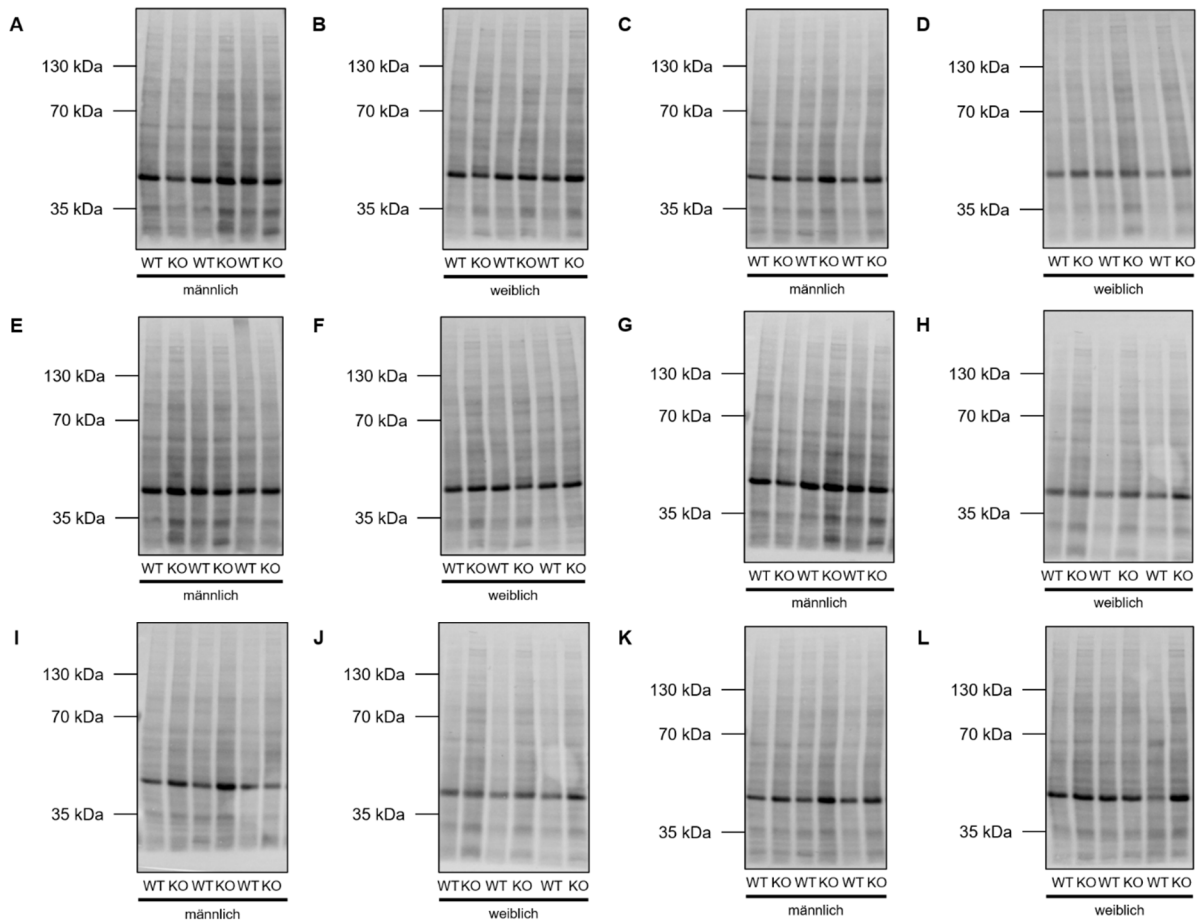


Abbildung 8.3: Totalproteinaufnahmen von Milzen.

Totalproteinaufnahmen von männlichen und weiblichen IRAG1-WT (WT) und IRAG1-KO Mäusen (KO). **A, B:** Totalproteinaufnahme zur Proteinexpression von IRAG1. **C, D:** Totalproteinaufnahme zur Proteinexpression des IP₃R-I. **E, F:** Totalproteinaufnahme zur Proteinexpression der PKGI β . **G, H:** Totalproteinaufnahme zur Proteinexpression der PKGI α . **I, J:** Totalproteinaufnahme zur Proteinexpression des IP₃R-III. **K, L:** Totalproteinaufnahme zur Proteinexpression der NO-GC- β 1. Die Aufnahmen zur Expression der jeweiligen Proteine sind in Kapitel 5.7.2 (s. Abbildung 5.16) zu finden.

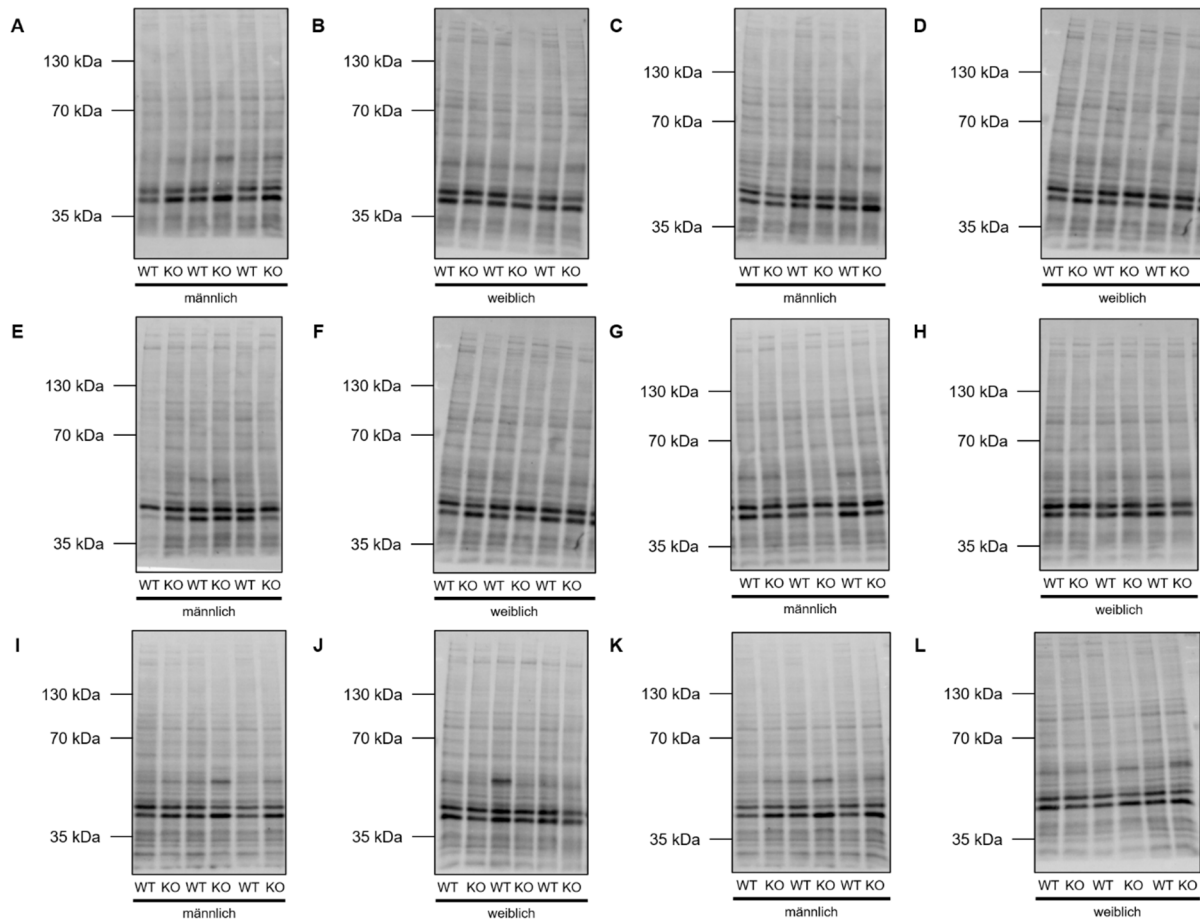


Abbildung 8.4: Totalproteinaufnahmen vom Magen.

Totalproteinaufnahmen von männlichen und weiblichen IRAG1-WT (WT) und IRAG1-KO Mäusen (KO). **A, B:** Totalproteinaufnahme zur Proteinexpression von IRAG1. **C, D:** Totalproteinaufnahme zur Proteinexpression des IP_3R -I. **E, F:** Totalproteinaufnahme zur Proteinexpression der PKGI β . **G, H:** Totalproteinaufnahme zur Proteinexpression der PKGI α . **I, J:** Totalproteinaufnahme zur Proteinexpression des IP_3R -III. **K, L:** Totalproteinaufnahme zur Proteinexpression der NO-GC- β 1. Die Aufnahmen zur Expression der jeweiligen Proteine sind in Kapitel 5.7.3 (s. Abbildung 5.17) zu finden.

9 Literaturverzeichnis

- Al-Shboul, O.A; M. S. Nazzal; A. G. Mustafa; A. N. Al-Dwairi; M. A. Alqudah; A. Abu Omar; M. A. Alfaqih; M. I. Alsalem (2018). "Estrogen relaxes gastric muscle cells via a nitric oxide- and cyclic guanosine monophosphate-dependent mechanism: A sex-associated differential effect." Exp Ther Med **16**(3): 1685–1692.
- Ammendola, A; A. Geiselhöringer; F. Hofmann; J. Schlossmann (2001). "Molecular determinants of the interaction between the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-associated cGMP kinase substrate (IRAG) and cGMP kinase I β ." J Biol Chem **276**(26): 24153–24159.
- Angermeier, E; K. Domes; R. Lukowski; J. Schlossmann; B. Rathkolb; M. Hraběde Angelis; F. Hofmann (2016). "Iron deficiency anemia in cyclic GMP kinase knockout mice." Hematologica **101**(2): e48-51.
- Antl, M; M.-L. von Brühl; C. Eiglsperger; M. Werner; I. Konrad; T. Kocher; M. Wilm; F. Hofmann; S. Massberg; J. Schlossmann (2007). "IRAG mediates NO/cGMP-dependent inhibition of platelet aggregation and thrombus formation." Blood **109**(2): 552–559.
- Bender, A.T; J. A. Beavo (2006). "Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use." Pharmacol Rev **58**(3): 488–520.
- Benson, C.S; A. Shah; S. J. Stanworth; C. J. Frise; H. Spiby; S. J. Lax; J. Murray; A. A. Klein (2021). "The effect of iron deficiency and anaemia on women's health." Anaesthesia **76 Suppl 4**: 84–95.
- Biel, M; M. Seeliger; A. Pfeifer; K. Kohler; A. Gerstner; A. Ludwig; G. Jaissle; S. Fauser; E. Zrenner; F. Hofmann (1999). "Selective loss of cone function in mice lacking the cyclic nucleotide-gated channel CNG3." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(13): 7553–7557.
- Biswas, S; B. Kojonazarov; S. Hadzic; M. Majer; G. Bajraktari; T. Novoyatleva; H. Ardeschir Ghofrani; F. Grimminger; W. Seeger; N. Weissmann; J. Schlossmann; R. Theo Schermuly (2020). "IRAG1 Deficient Mice Develop PKG1 β Dependent Pulmonary Hypertension." Cells **9**(10).
- Bonnevier, J; R. Fässler; A. P. Somlyo; A. V. Somlyo; A. Arner (2004). "Modulation of Ca²⁺ sensitivity by cyclic nucleotides in smooth muscle from protein kinase G-deficient mice." J Biol Chem **279**(7): 5146–5151.
- Camaschella, C. (2019). "Iron deficiency." Blood **133**(1): 30–39.
- Casteel, D.E; T. Zhang; S. Zhuang; R. B. Pilz (2008). "cGMP-dependent protein kinase anchoring by IRAG regulates its nuclear translocation and transcriptional activity." Cell Signal **20**(7): 1392–1399.
- Cha, B; J. Ho Kim; H. Hut; B. M. Hogema; J. Nadarja; M. Zizak; M. Cavet; W. Lee-Kwon; S. M. Lohmann; A. Smolenski; C. Ming Tse; C. Yun; H. R. de Jonge; M. Donowitz (2005). "cGMP inhibition of Na⁺/H⁺ antiporter 3 (NHE3) requires PDZ domain adapter NHERF2, a broad specificity protein kinase G-anchoring protein." J Biol Chem **280**(17): 16642–16650.
- Chanrion, B; C. La Mannoury Cour; F. Bertaso; M. Lerner-Natoli; M. Freissmuth; M. J. Millan; J. Bockaert; P. Marin (2007). "Physical interaction between the serotonin transporter and neuronal nitric oxide synthase underlies reciprocal modulation of their activity." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(19): 8119–8124.

- Chomczynski, P; N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156–159.
- Chomczynski, P; N. Sacchi (2006). "The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on." Nat Protoc **1**(2): 581–585.
- Clark, S.F. (2008). "Iron deficiency anemia." Nutr Clin Pract **23**(2): 128–141.
- Cortese-Krott, M.M; E. Mergia; C. M. Kramer; W. Lückstädt; J. Yang; G. Wolff; C. Panknin; T. Bracht; B. Sitek; J. Pernow; J.-P. Stasch; M. Feelisch; D. Koesling; M. Kelm (2018). "Identification of a soluble guanylate cyclase in RBCs: preserved activity in patients with coronary artery disease." Redox Biol **14**: 328–337.
- Cotter, J; C. Baldaia; M. Ferreira; G. Macedo; I. Pedroto (2020). "Diagnosis and treatment of iron-deficiency anemia in gastrointestinal bleeding: A systematic review." World J Gastroenterol **26**(45): 7242–7257.
- Desch, M; K. Sigl; B. Hieke; K. Salb; F. Kees; D. Bernhard; A. Jochim; B. Spießberger; K. Höcherl; R. Feil; S. Feil; R. Lukowski; J. W. Wegener; F. Hofmann; J. Schlossmann (2010). "IRAG determines nitric oxide- and atrial natriuretic peptide-mediated smooth muscle relaxation." Cardiovasc Res **86**(3): 496–505.
- Dey, N.B; J. L. Busch; S. H. Francis; J. D. Corbin; T. M. Lincoln (2009). "Cyclic GMP specifically suppresses Type-Ia cGMP-dependent protein kinase expression by ubiquitination." Cell Signal **21**(6): 859–866.
- DORMANN, A., Ed. (2008). *Laborwerte*. ScienceDirect Books. Elsevier Urban & Fischer, München.
- Draijer, R; A. B. Vaandrager; C. Nolte; H. R. de Jonge; U. Walter; V. W. van Hinsbergh (1995). "Expression of cGMP-dependent protein kinase I and phosphorylation of its substrate, vasodilator-stimulated phosphoprotein, in human endothelial cells of different origin." Circ Res **77**(5): 897–905.
- el-Husseini, A.E; C. Bladen; S. R. Vincent (1995). "Molecular characterization of a type II cyclic GMP-dependent protein kinase expressed in the rat brain." J Neurochem **64**(6): 2814–2817.
- Engvall, E; P. Perlmann (1971). "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G." Immunochemistry **8**(9): 871–874.
- Feil, R; S. M. Lohmann; H. de Jonge; U. Walter; F. Hofmann (2003). "Cyclic GMP-dependent protein kinases and the cardiovascular system: insights from genetically modified mice." Circ Res **93**(10): 907–916.
- Feil, S; P. Zimmermann; A. Knorn; S. Brummer; J. Schlossmann; F. Hofmann; R. Feil (2005). "Distribution of cGMP-dependent protein kinase type I and its isoforms in the mouse brain and retina." Neuroscience **135**(3): 863–868.
- Föller, M; S. Feil; K. Ghoreschi; S. Koka; A. Gerling; M. Thunemann; F. Hofmann; B. Schuler; J. Vogel; B. Pichler; R. S. Kasinathan; J. P. Nicolay; S. M. Huber; F. Lang; R. Feil (2008). "Anemia and splenomegaly in cGKI-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(18): 6771–6776.

- Förstermann, U; H. H.H.W. Schmidt; J. S. Pollock; H. Sheng; J. A. Mitchell; T. D. Warner; M. Nakane; F. Murad (1991). "Isoforms of nitric oxide synthase Characterization and purification from different cell types." Biochemical Pharmacology **42**(10): 1849–1857.
- Förstermann, U; W. C. Sessa (2012). "Nitric oxide synthases: regulation and function." Eur Heart J **33**(7): 829-37, 837a-837d.
- Friebe, A; D. Koesling (2003). "Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase." Circ Res **93**(2): 96–105.
- Friebe, A; E. Mergia; O. Dangel; A. Lange; D. Koesling (2007). "Fatal gastrointestinal obstruction and hypertension in mice lacking nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(18): 7699–7704.
- Fritsch, R.M; D. Saur; M. Kurjak; D. Oesterle; J. Schlossmann; A. Geiselhöringer; F. Hofmann; H.-D. Allescher (2004). "InsP₃R-associated cGMP kinase substrate (IRAG) is essential for nitric oxide-induced inhibition of calcium signaling in human colonic smooth muscle." J Biol Chem **279**(13): 12551–12559.
- Furchgott, R.F; J. V. Zawadzki (1980). "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine." Nature **288**(5789): 373–376.
- Gambaryan, S; C. Häusler; T. Markert; D. Pöhler; T. Jarchau; U. Walter; W. Haase; A. Kurtz; S. M. Lohmann (1996). "Expression of type II cGMP-dependent protein kinase in rat kidney is regulated by dehydration and correlated with renin gene expression." J Clin Invest **98**(3): 662–670.
- Ganz, T. (2013). "Systemic iron homeostasis." Physiol Rev **93**(4): 1721–1741.
- Ganz, T; E. Nemeth (2012). "Hepcidin and iron homeostasis." Biochim Biophys Acta **1823**(9): 1434–1443.
- Geiselhöringer, A; M. Gaisa; F. Hofmann; J. Schlossmann (2004a). "Distribution of IRAG and cGKI-isoforms in murine tissues." FEBS Lett **575**1-3: 19–22.
- Geiselhöringer, A; M. Werner; K. Sigl; P. Smital; R. Wörner; L. Acheo; J. Stieber; P. Weinmeister; R. Feil; S. Feil; J. Wegener; F. Hofmann; J. Schlossmann (2004b). "IRAG is essential for relaxation of receptor-triggered smooth muscle contraction by cGMP kinase." EMBO J **23**(21): 4222–4231.
- Goddard, A.F; M. W. James; A. S. McIntyre; B. B. Scott (2011). "Guidelines for the management of iron deficiency anaemia." Gut **60**(10): 1309–1316.
- Grasso, J.A; A. L. Sullivan; S. C. Chan (1978). "Studies of the endoplasmic reticulum and plasma membrane-bound ribosomes in erythropoietic cells." J Cell Sci **31**: 165–178.
- Gregor, D.H. (1967). "Diagnosis of large-bowel cancer in the asymptomatic patient." JAMA **201**(12): 943–945.
- Green, D.J; A. Maiorana; G. O'Driscoll; R. Taylor (2004). "Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans." J Physiol **561**Pt 1: 1–25.
- Guillen, J. (2012). "FELASA guidelines and recommendations." J Am Assoc Lab Anim Sci **51**(3): 311–321.

- Haferlach, T. (2020). *Hämatologische Erkrankungen. Atlas und Diagnostisches Handbuch*. Springer Berlin / Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Harrison, P.M; P. Arosio (1996). "The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation." *Biochim Biophys Acta* **1275**(3): 161–203.
- Hastka, J., Metzgeroth, G., and Gattermann, N. (2021). *Eisenmangel und Eisenmangelanämie. Leitlinie*. Empfehlungen der Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen.
- Haug, L.S; V. Jensen; O. Hvalby; S. I. Walaas; A. C. Ostvold (1999). "Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by cyclic nucleotide-dependent kinases in vitro and in rat cerebellar slices in situ." *J Biol Chem* **274**(11): 7467–7473.
- Hentze, M.W; M. U. Muckenthaler; B. Galy; C. Camaschella (2010). "Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism." *Cell* **142**(1): 24–38.
- Hofmann, F. (2005). "The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases." *J Biol Chem* **280**(1): 1–4.
- Hofmann, F; A. Ammendola; J. Schlossmann (2000). "Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases." *J Cell Sci* **113** (Pt 10): 1671–1676.
- Hofmann, F; R. Feil; T. Kleppisch; J. Schlossmann (2006). "Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion." *Physiol Rev* **86**(1): 1–23.
- Hofmann, F; J. W. Wegener (2013). "cGMP-dependent protein kinases (cGK)." *Methods Mol Biol* **1020**: 17–50.
- Huber, A; W. L. Neuhuber; N. Klugbauer; P. Ruth; H. D. Allescher (2000). "Cysteine-rich protein 2, a novel substrate for cGMP kinase I in enteric neurons and intestinal smooth muscle." *J Biol Chem* **275**(8): 5504–5511.
- Ignarro, L.J; G. M. Buga; K. S. Wood; R. E. Byrns; G. Chaudhuri (1987). "Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(24): 9265–9269.
- Ignarro, L.J; G. Cirino; A. Casini; C. Napoli (1999). "Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview." *J Cardiovasc Pharmacol* **34**(6): 879–886.
- Ignarro, L.J; J. N. Degnan; W. H. Baricos; P. J. Kadowitz; M. S. Wolin (1982). "Activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide requires heme comparison of heme-deficient, heme-reconstituted and heme-containing forms of soluble enzyme from bovine lung." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **718**(1): 49–59.
- Ignarro, L.J; R. G. Harbison; K. S. Wood; P. J. Kadowitz (1986). "Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid." *J Pharmacol Exp Ther* **237**(3): 893–900.
- Jiang, W; P. Wang; H. Yu; Y. Zhang; K. Zhao; H. Du; X. Bai (2014). "Development of a SYBR Green I based one-step real-time PCR assay for the detection of Hantaan virus." *J Virol Methods* **196**: 145–151.
- Kass, D.A; E. Takimoto; T. Nagayama; H. C. Champion (2007). "Phosphodiesterase regulation of nitric oxide signaling." *Cardiovasc Res* **75**(2): 303–314.

- Katsuki, S; W. Arnold; C. Mittal; F. Murad (1977). "Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine." J Cyclic Nucleotide Res **3**(1): 23–35.
- Keilbach, A; P. Ruth; F. Hofmann (1992). "Detection of cGMP dependent protein kinase isozymes by specific antibodies." Eur J Biochem **208**(2): 467–473.
- Kempe, D.S; P. A. Lang; C. Duranton; A. Akel; K. S. Lang; S. M. Huber; T. Wieder; F. Lang (2006). "Enhanced programmed cell death of iron-deficient erythrocytes." FASEB J **20**(2): 368–370.
- Koehler, K; D. Hmida; J. Schlossmann; D. Landgraf; N. Reisch; M. Schuelke; A. Huebner (2020). "Homozygous mutation in murine retrovirus integration site 1 gene associated with a non-syndromic form of isolated familial achalasia." Neurogastroenterology & Motility: e13923.
- Koesling, D; M. Russwurm; E. Mergia; F. Mullershausen; A. Friebe (2004). "Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase: structure and regulation." Neurochem Int **45**(6): 813–819.
- Koury, M.J; P. Ponka (2004). "New insights into erythropoiesis: the roles of folate, vitamin B12, and iron." Annu Rev Nutr **24**: 105–131.
- Kratochvil, J.F; R. H. Burris; M. K. Seikel; J. M. Harkin (1971). "Isolation and characterization of α -guaiacolic acid and the nature of guaiacum blue." Phytochemistry **10**(10): 2529–2531.
- Krumenacker, J.S; K. A. Hanafy; F. Murad (2004). "Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase." Brain Research Bulletin **62**(6): 505–515.
- Kuhn, M. (2003). "Structure, regulation, and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on guanylyl cyclase-A." Circ Res **93**(8): 700–709.
- Kumar, R; R. W. Joyner; P. Komalavilas; T. M. Lincoln (1999). "Analysis of expression of cGMP-dependent protein kinase in rabbit heart cells." J Pharmacol Exp Ther **291**(3): 967–975.
- Kyhse-Andersen, J. (1984). "Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose." J Biochem Biophys Methods **103**-4: 203–209.
- Ladner, C.L; K. Tran; M. Le; R. J. Turner; R. A. Edwards (2014). "Excited state photoreaction between the indole side chain of tryptophan and halocompounds generates new fluorophores and unique modifications." Photochem Photobiol **90**(5): 1027–1033.
- Ladner, C.L; J. Yang; R. J. Turner; R. A. Edwards (2004). "Visible fluorescent detection of proteins in polyacrylamide gels without staining." Anal Biochem **326**(1): 13–20.
- Laemmli, U.K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680–685.
- Liu, X; E. C. Theil (2005). "Ferritin as an iron concentrator and chelator target." Ann N Y Acad Sci **1054**: 136–140.
- Lloyd-Jones, D.M; K. D. Bloch (1996). "The vascular biology of nitric oxide and its role in atherogenesis." Annu Rev Med **47**: 365–375.

- Lohmann, S.M; A. B. Vaandrager; A. Smolenski; U. Walter; H. R. de Jonge (1997). "Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases." Trends Biochem Sci **22**(8): 307–312.
- Lowry, O.H; N. J. Rosebrough; A. L. Farr; R. J. Randall (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265–275.
- Lozzio, B.B; C. B. Lozzio; E. G. Bamberger; A. S. Feliu (1981). "A multipotential leukemia cell line (K-562) of human origin." Proc Soc Exp Biol Med **166**(4): 546–550.
- Lüllmann-Rauch, R. (2015). *Taschenlehrbuch Histologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Markert, T; A. B. Vaandrager; S. Gambaryan; D. Pöhler; C. Häusler; U. Walter; H. R. de Jonge; T. Jarchau; S. M. Lohmann (1995). "Endogenous expression of type II cGMP-dependent protein kinase mRNA and protein in rat intestine. Implications for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator." J Clin Invest **96**(2): 822–830.
- Marletta, M.A. (1994). "Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis." Cell **78**(6): 927–930.
- Marsh, N; A. Marsh (2000). "A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology." Clin Exp Pharmacol Physiol **27**(4): 313–319.
- McLean, E; M. Cogswell; I. Egli; D. Wojdyla; B. de Benoist (2009). "Worldwide prevalence of anaemia, WHO Vitamin and Mineral Nutrition Information System, 1993-2005." Public Health Nutr **12**(4): 444–454.
- Mergia, E; A. Friebe; O. Dangel; M. Russwurm; D. Koesling (2006). "Spare guanylyl cyclase NO receptors ensure high NO sensitivity in the vascular system." J Clin Invest **116**(6): 1731–1737.
- Mergia, E; M. Russwurm; G. Zoidl; D. Koesling (2003). "Major occurrence of the new $\alpha_2\beta_1$ isoform of NO-sensitive guanylyl cyclase in brain." Cell Signal **15**(2): 189–195.
- Michael, S.K; H. K. Surks; Y. Wang; Y. Zhu; R. Blanton; M. Jamnongjit; M. Aronovitz; W. Baur; K. Ohtani; M. K. Wilkerson; A. D. Bonev; M. T. Nelson; R. H. Karas; M. E. Mendelsohn (2008). "High blood pressure arising from a defect in vascular function." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(18): 6702–6707.
- Moras, M; S. D. Lefevre; M. A. Ostuni (2017). "From Erythroblasts to Mature Red Blood Cells: Organelle Clearance in Mammals." Front Physiol **8**: 1076.
- Mortensen, M; D. J. P. Ferguson; M. Edelmann; B. Kessler; K. J. Morten; M. Komatsu; A. K. Simon (2010). "Loss of autophagy in erythroid cells leads to defective removal of mitochondria and severe anemia in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(2): 832–837.
- Mullis, K.B; F. A. Faloon (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." Methods Enzymol **155**: 335–350.
- Nathan, C; Q. W. Xie (1994). "Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls." Cell **78**(6): 915–918.
- Nebe, C.T; H. Diem; H. Heimpel (2010). "Aktuelle Aspekte zur Bestimmung der Retikulozytenzahl / Current aspects of reticulocyte analysis." LaboratoriumsMedizin **34**(6): 295–304.

- Ny, L; A. Pfeifer; A. Aszòdi; M. Ahmad; P. Alm; P. Hedlund; R. Fässler; K. E. Andersson (2000). "Impaired relaxation of stomach smooth muscle in mice lacking cyclic GMP-dependent protein kinase I." Br J Pharmacol **129**(2): 395–401.
- Palmer, R.M; D. S. Ashton; S. Moncada (1988). "Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine." Nature **333**(6174): 664–666.
- Palmieri, O; T. Mazza; G. Bassotti; A. Merla; S. Tolone; T. Biagini; A. Cuttitta; F. Bossa; G. Martino; T. Latiano; G. Corritore; D. Gioffreda; O. Palumbo; M. Carella; A. Panza; A. Andriulli; A. Latiano (2020). "microRNA-mRNA network model in patients with achalasia." Neurogastroenterology & Motility **32**(3): e13764.
- Pavord, S; J. Daru; N. Prasannan; S. Robinson; S. Stanworth; J. Girling (2020). "UK guidelines on the management of iron deficiency in pregnancy." Br J Haematol **188**(6): 819–830.
- Peters, C.H; M. E. Myers; J. Juchno; C. Haimbaugh; H. Bichraoui; Y. Du; J. R. Bankston; L. A. Walker; C. Proenza (2020). "Isoform-specific regulation of HCN4 channels by a family of endoplasmic reticulum proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **117**(30): 18079–18090.
- Peterson, G.L. (1977). "A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable." Anal Biochem **83**(2): 346–356.
- Peterson, G.L. (1979). "Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall." Anal Biochem **100**(2): 201–220.
- Pfeifer, A; A. Aszòdi; U. Seidler; P. Ruth; F. Hofmann; R. Fässler (1996). "Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP-dependent protein kinase II." Science **274**(5295): 2082–2086. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8953039/>.
- Pfeifer, A; P. Klatt; S. Massberg; L. Ny; M. Sausbier; C. Hirneiss; G. X. Wang; M. Korth; A. Aszòdi; K. E. Andersson; F. Krombach; A. Mayerhofer; P. Ruth; R. Fässler; F. Hofmann (1998). "Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice." EMBO J **17**(11): 3045–3051.
- Radomski, M.W; R. M. Palmer; S. Moncada (1990). "Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(24): 10043–10047.
- Ramchandran, R; A. Raghavan; D. Geenen; M. Sun; L. Bach; Q. Yang; J. Usha Raj (2014). "PKG-1 α leucine zipper domain defect increases pulmonary vascular tone: implications in hypoxic pulmonary hypertension." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **307**(7): L537–44.
- Rastaldo, R; P. Pagliaro; S. Cappello; C. Penna; D. Mancardi; N. Westerhof; G. Losano (2007). "Nitric oxide and cardiac function." Life Sci **81**(10): 779–793.
- Rick, W. (1990). *Klinische Chemie und Mikroskopie*. Springer-Lehrbuch. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Rudolph, U; M. J. Finegold; S. S. Rich; G. R. Harriman; Y. Srinivasan; P. Brabet; G. Boulay; A. Bradley; L. Birnbaumer (1995). "Ulcerative colitis and adenocarcinoma of the colon in G α_{i2} -deficient mice." Nat Genet **10**(2): 143–150.
- Russwurm, M; D. Koesling (2004). "NO activation of guanylyl cyclase." EMBO J **23**(22): 4443–4450.

- Ruth, P; W. Landgraf; A. Keilbach; B. May; C. Egleme; F. Hofmann (1991). "The activation of expressed cGMP-dependent protein kinase isozymes I α and I β is determined by the different amino-termini." Eur J Biochem **202**(3): 1339–1344.
- Salmhofer, H; W. L. Neuhuber; P. Ruth; A. Huber; M. Russwurm; H. D. Allescher (2001). "Pivotal role of the interstitial cells of Cajal in the nitric oxide signaling pathway of rat small intestine. Morphological evidence." Cell Tissue Res **305**(3): 331–340.
- Sausbier, M; H. Zhao; R. Schubert; U. Sausbier; U. Abdullah; A. Huber; S. Feil; R. Feil; F. Hofmann; W. Neuhuber; H.-D. Allescher; P. Ruth (2005). "Enhanced vascular cGMP/cGK I signaling and hypotonia in cysteine-rich-protein 2-deficient mice." BMC Pharmacol **5S1**.
- Schinner, E; K. Salb; J. Schlossmann (2011). "Signaling via IRAG is essential for NO/cGMP-dependent inhibition of platelet activation." Platelets **22**(3): 217–227.
- Schinner, E; A. Schramm; F. Kees; F. Hofmann; J. Schlossmann (2013). "The cyclic GMP-dependent protein kinase I α suppresses kidney fibrosis." Kidney international **84**(6): 1198–1206.
- Schlossmann, J; A. Ammendola; K. Ashman; X. Zong; A. Huber; G. Neubauer; G. X. Wang; H. D. Allescher; M. Korth; M. Wilm; F. Hofmann; P. Ruth (2000). "Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP₃ receptor and cGMP kinase I β ." Nature **404**(6774): 197–201.
- Schlossmann, J; M. Desch (2011). "IRAG and novel PKG targeting in the cardiovascular system." Am J Physiol Heart Circ Physiol **301**(3): H672-82.
- Schlossmann, J; R. Feil; F. Hofmann (2003). "Signaling through NO and cGMP-dependent protein kinases." Ann Med **35**(1): 21–27.
- Schlossmann, J; R. Feil; F. Hofmann (2005). "Insights into cGMP signalling derived from cGMP kinase knockout mice." Front Biosci **10**: 1279–1289.
- Schramm, A; F. Schweda; M. Luisa S. Sequeira-Lopez; F. Hofmann; P. Sandner; J. Schlossmann (2019). "Protein Kinase G Is Involved in Acute but Not in Long-Term Regulation of Renin Secretion." Front Pharmacol **10**: 800.
- Scott, J.D. (1991). "Cyclic nucleotide-dependent protein kinases." Pharmacology & Therapeutics **50**(1): 123–145.
- Shaughnessy, J.D; D. A. Largaespada; E. Tian; C. F. Fletcher; B. C. Cho; P. Vyas; N. A. Jenkins; N. G. Copeland (1999). "Mrv1, a common MRV integration site in BXH2 myeloid leukemias, encodes a protein with homology to a lymphoid-restricted membrane protein Jaw1." Oncogene **18**(12): 2069–2084.
- Shawki, A; S. R. Anthony; Y. Nose; M. A. Engevik; E. J. Niespodzany; T. Barrientos; H. Öhrvik; R. T. Worrell; D. J. Thiele; B. Mackenzie (2015). "Intestinal DMT1 is critical for iron absorption in the mouse but is not required for the absorption of copper or manganese." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **309**(8): G635-47.
- Shi, H; K. Z. Bencze; T. L. Stemmler; C. C. Philpott (2008). "A cytosolic iron chaperone that delivers iron to ferritin." Science **320**(5880): 1207–1210.
- Silva, B; P. Faustino (2015). "An overview of molecular basis of iron metabolism regulation and the associated pathologies." Biochim Biophys Acta **1852**(7): 1347–1359.

- Singh, A.K; B. Spießberger; W. Zheng; F. Xiao; R. Lukowski; J. W. Wegener; P. Weinmeister; D. Saur; S. Klein; M. Schemann; D. Krüger; U. Seidler; F. Hofmann (2012). "Neuronal cGMP kinase I is essential for stimulation of duodenal bicarbonate secretion by luminal acid." FASEB J **26**(4): 1745–1754.
- Soderling, S.H; S. J. Bayuga; J. A. Beavo (1998). "Identification and characterization of a novel family of cyclic nucleotide phosphodiesterases." J Biol Chem **273**(25): 15553–15558.
- Sonnenburg, W.K; J. A. Beavo (1994). "Cyclic GMP and Regulation of Cyclic Nucleotide Hydrolysis. In *Advances in pharmacology. Cyclic GMP; Synthesis, Metabolism, and Function*, J. T. AUGUST, M. W. ANDERS AND F. MURAD, Eds. Elsevier, Burlington: 87–114.
- Straubinger, J; K. Boldt; A. Kuret; L. Deng; D. Krattenmacher; N. Bork; M. Desch; R. Feil; S. Feil; M. Nemer; M. Ueffing; P. Ruth; S. Just; R. Lukowski (2017). "Amplified pathogenic actions of angiotensin II in cysteine-rich LIM-only protein 4-negative mouse hearts." FASEB J **31**(4): 1620–1638.
- Tang, K.M; G. Wang; P. Lu; R. H. Karas; M. Aronovitz; S. P. Heximer; K. M. Kaltenbronn; K. J. Blumer; D. P. Siderovski; Y. Zhu; M. E. Mendelsohn; M. Tang; G. Wang (2003). "Regulator of G-protein signaling-2 mediates vascular smooth muscle relaxation and blood pressure." Nat Med **9**(12): 1506–1512.
- Tonelli, A.R; R. Yadav; A. Gupta; A. V. Arrossi; G. A. Heresi; R. A. Dweik (2013). "Spleen size in idiopathic and heritable pulmonary arterial hypertension." Respiration **85**(5): 391–399.
- Tripathi, P; P. Tripathi; L. Kashyap; V. Singh (2007). "The role of nitric oxide in inflammatory reactions." FEMS Immunol Med Microbiol **51**(3): 443–452.
- Vaandrager, A.B; A. G.M. Bot; P. Ruth; A. Pfeifer; F. Hofmann; H. R. de Jonge (2000). "Differential role of cyclic GMP-dependent protein kinase II in ion transport in murine small intestine and colon." Gastroenterology **118**(1): 108–114.
- Vaandrager, A.B; E. M. Ehlert; T. Jarchau; S. M. Lohmann; H. R. de Jonge (1996). "N-terminal myristoylation is required for membrane localization of cGMP-dependent protein kinase type II." J Biol Chem **271**(12): 7025–7029.
- Vaandrager, A.B; A. Smolenski; B. C. Tilly; A. B. Houtsmuller; E. M. Ehlert; A. G. Bot; M. Edixhoven; W. E. Boomaars; S. M. Lohmann; H. R. de Jonge (1998). "Membrane targeting of cGMP-dependent protein kinase is required for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel activation." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(4): 1466–1471.
- van Weemen, B.K; A. H.W.M. Schuurs (1971). "Immunoassay using antigen-enzyme conjugates." FEBS Lett **15**(3): 232–236.
- Vente, J. de; E. Asan; S. Gambaryan; M. Markerink-van Ittersum; H. Axer; K. Gallatz; S. Lohmann; M. Palkovits (2001). "Localization of cGMP-dependent protein kinase type II in rat brain." Neuroscience **108**(1): 27–49.
- Voipio, H.-M; P. Baneux; I. A. Gomez de Segura; J. Hau; S. Wolfensohn (2008). "Guidelines for the veterinary care of laboratory animals: report of the FELASA/ECLAM/ESLAV Joint Working Group on Veterinary Care." Lab Anim **42**(1): 1–11.

- Vos, T; T. Bärnighausen; J. B. Jonas; B. Schöttker; S. Mohammed (2017). "Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016. A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016." *The lancet <London>*. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673617321542>.
- Wagner, L.E; W.-H. Li; D. I. Yule (2003). "Phosphorylation of type-1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by cyclic nucleotide-dependent protein kinases: a mutational analysis of the functionally important sites in the S2⁺ and S2⁻ splice variants." *J Biol Chem* **278**(46): 45811–45817.
- Waldmann, R; S. Bauer; C. Göbel; F. Hofmann; K. H. Jakobs; U. Walter (1986). "Demonstration of cGMP-dependent protein kinase and cGMP-dependent phosphorylation in cell-free extracts of platelets." *Eur J Biochem* **158**(1): 203–210.
- Weber, S; D. Bernhard; R. Lukowski; P. Weinmeister; R. Wörner; J. W. Wegener; N. Valtcheva; S. Feil; J. Schlossmann; F. Hofmann; R. Feil (2007). "Rescue of cGMP kinase I knockout mice by smooth muscle specific expression of either isozyme." *Circ Res* **101**(11): 1096–1103.
- WELSCH, U., KUMMER, W., AND DELLER, T., Eds. (2018). *Histologie. Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie: das Lehrbuch*. Elsevier, München.
- Werner, C; G. Raivich; M. Cowen; T. Strelakova; I. Sillaber; J. T. Buters; R. Spanagel; F. Hofmann (2004). "Importance of NO/cGMP signalling via cGMP-dependent protein kinase II for controlling emotionality and neurobehavioural effects of alcohol." *Eur J Neurosci* **20**(12): 3498–3506.
- Werner, C.G; V. Godfrey; R. R. Arnold; G. L. Featherstone; D. Bender; J. Schlossmann; M. Schiemann; F. Hofmann; K. B. Pryzwansky (2005). "Neutrophil dysfunction in guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase I-deficient mice." *J Immunol* **175**(3): 1919–1929.
- Wernet, W; V. Flockerzi; F. Hofmann (1989). "The cDNA of the two isoforms of bovine cGMP-dependent protein kinase." *FEBS Lett* **251**1-2: 191–196.
- Wiege, K; S. R. Ali; B. Gewecke; A. Novakovic; F. M. Konrad; K. Pexa; S. Beer-Hammer; J. Reutershan; R. P. Piekorz; R. E. Schmidt; B. Nürnberg; J. Engelbert Gessner (2013). "Gα_{i2} is the essential Gα_i protein in immune complex-induced lung disease." *J Immunol* **190**(1): 324–333.
- Wobst, J; H. Schunkert; T. Kessler (2018). "Genetic alterations in the NO-cGMP pathway and cardiovascular risk." *Nitric Oxide* **76**: 105–112.
- Wooldridge, A.A; J. A. MacDonald; F. Erdodi; C. Ma; M. A. Borman; D. J. Hartshorne; T. A. J. Haystead (2004). "Smooth muscle phosphatase is regulated in vivo by exclusion of phosphorylation of threonine 696 of MYPT1 by phosphorylation of Serine 695 in response to cyclic nucleotides." *J Biol Chem* **279**(33): 34496–34504.
- Wörner, R; R. Lukowski; F. Hofmann; J. W. Wegener (2007). "cGMP signals mainly through cAMP kinase in permeabilized murine aorta." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**(1): H237-44.

10 Veröffentlichungen

Einzelne Teile der vorliegenden Arbeit sind bereits in Fachzeitschriften veröffentlicht und im Rahmen von Kongressteilnahmen präsentiert worden.

10.1 Publikationen

10.1.1 Publikationen im Rahmen der Dissertation

*Majer, M., S. Prüschenk and J. Schlossmann (2021). "Loss of PKGI β /IRAG1 Signaling Causes Anemia-Associated Splenomegaly." Int J Mol Sci **22**(11): 5458.*

*Biswas, S., B. Kojonazarov, S. Hadzic, M. Majer, G. Bajraktari, T. Novoyatleva, H. A. Ghofrani, F. Grimminger, W. Seeger, N. Weissmann, J. Schlossmann and R. T. Schermuly (2020). "IRAG1 Deficient Mice Develop PKGI β Dependent Pulmonary Hypertension." Cells **9**(10): 2280.*

10.1.2 Weitere Publikationen

*Prüschenk, S., M. Majer, R. Schreiber and J. Schlossmann (2021). "IRAG2 Interacts with IP₃-Receptor Types 1, 2, and 3 and Regulates Intracellular Ca²⁺ in Murine Pancreatic Acinar Cells." Int J Mol Sci **22**(24): 13409.*

10.2 Kongressteilnahmen

5th German Pharm-Tox Summit 2020, Leipzig: Poster

4th German Pharm-Tox Summit 2019, Stuttgart: Vortrag

Hot Topics in Signal Transduction & cGMP Research 2018, Tübingen: Vortrag und Poster

3th German Pharm-Tox Summit 2018, Göttingen: Poster

2th German Pharm-Tox Summit 2017, Heidelberg: Poster

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, meinen herzlichen Dank aussprechen.

Zuallererst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Jens Schlossmann für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Überlassung des spannenden Themas und die Betreuung sowie das mir entgegengebrachte Vertrauen bedanken.

Ein herzliches Dankeschön auch an Herrn PD Dr. Max Keller für die Bereitschaft zur Anfertigung des Zweitgutachtens.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Ekkehard Haen und bei Herrn Prof. Dr. Sigurd Elz für ihre Bereitschaft, als weiterer Prüfer bzw. Vorsitzender des Prüfungsausschusses zu fungieren, herzlich bedanken.

Ein großes Dankeschön geht an Astrid Seefeld für die vielen hilfreichen Tipps und Tricks, die den Laboralltag um einiges einfacher gemacht haben, und für ihre Einweisung – zusammen mit Gertraud Wilberg – in die Geheimnisse der hämatologischen Analytik. Aber auch vielen Dank dafür, dass sie mit ihrer herzlichen und humorvollen Art an so manchen Tagen Sonne ins Labor gebracht hat. An dieser Stelle darf ebenso Simon Kerler nicht unerwähnt bleiben, danke für die Genotypisierung und die Hilfe bei der Versorgung unserer „Mitarbeiter“.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe – Leo, Robert und Philipp, aber vor allem bei Sally und Martina – sowie bei Herrn Prof. Dr. Frieder Kees und Herrn Dr. Christoph Dorn. Martina danke ich ganz herzlich nicht nur für die gute Planung und Unterstützung in allen organisatorischen Anliegen, sondern auch für ihr offenes Ohr. Ein großer Dank gebührt Sally für die vielen kleinen und großen Hilfen im Laboralltag, bei der Revision des Papers und bei der Korrektur der Arbeit. Euch allen danke ich aber vor allem für die Unterstützung und das mir entgegengebrachte Verständnis im letzten Jahr.

Schließlich gebührt mein größter Dank meiner Mutter und meinem Bruder für die Unterstützung und den Rückhalt über all die Jahre.

12 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den 18.02.2022

(Michael Majer)