

Molekulare und physiologische Funktion von IRAG2 in Thrombozyten und im Pankreas



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER FAKULTÄT CHEMIE UND PHARMAZIE
LEHRSTUHL PHARMAKOLOGIE UND TOXIKOLOGIE
UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von

Sally Prüschenk

aus Pegnitz

im Jahr 2022

Die vorliegende Doktorarbeit entstand im Zeitraum von Oktober 2017 bis Oktober 2022 unter der Anleitung von Prof. Dr. rer. nat. Jens Schlossmann am Lehrstuhl für Pharmazie und Toxikologie des Instituts für Pharmazie der Universität Regensburg.

Teile der Arbeit wurden bereits im *International Journal of Molecular Sciences* (IJMS) veröffentlicht [100, 101].

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 07.11.2022

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 Prof. Dr. rer. nat. Achim Göpferich |
| 3. Prüfer: | Herr Prof. Dr. rer. nat. Rainer Schreiber |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 4 |
| 1.1 | Die NO/cGMP/PKG-Signalkaskade..... | 4 |
| 1.1.1 | Signaltransduktion | 4 |
| 1.1.2 | cGMP-abhängige Proteinkinasen..... | 6 |
| 1.1.3 | Das Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor assoziierte cGMP Kinase Substrat 1 | 8 |
| 1.1.4 | Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptoren | 10 |
| 1.2 | Das Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor assoziierte 2 | 11 |
| 1.2.1 | Struktur von IRAG2..... | 11 |
| 1.2.2 | Expression von IRAG2 | 12 |
| 1.2.3 | Funktion von IRAG2 | 12 |
| 1.3 | Die Thrombozyten | 14 |
| 1.3.1 | Morphologie und Funktion der Thrombozyten..... | 14 |
| 1.3.2 | Mechanismen der Thrombozytenaggregation und Aggregationshemmung | 16 |
| 1.3.3 | Pathophysiologische Bedeutung der Thrombozyten | 18 |
| 1.4 | Das Pankreas..... | 19 |
| 1.4.1 | Aufbau und Funktion des Pankreas | 19 |
| 1.4.2 | Sekretion von Verdauungsenzymen aus dem exokrinen Pankreas..... | 21 |
| 1.4.3 | Pathophysiologische Bedeutung des exokrinen Pankreas | 22 |
| 1.5 | Ziele der Arbeit..... | 23 |
| 2 | MATERIALIEN..... | 24 |
| 2.1 | Geräte..... | 24 |
| 2.2 | Software | 25 |
| 2.3 | Antikörper..... | 25 |
| 2.4 | Allgemeines Verbrauchsmaterial und versuchsspezifische Materialien | 27 |
| 2.4.1 | Allgemeine Verbrauchsmaterialien | 27 |
| 2.4.2 | Genotypisierung..... | 27 |
| 2.4.3 | Organentnahmen und proteinbiochemische Methoden | 28 |
| 2.4.4 | Analyse von Thrombozyten..... | 28 |
| 2.4.5 | Blutabnahme aus dem retrobulbären Plexus und Bestimmung der Amylase-Aktivität | 29 |
| 2.4.6 | Analyse von pankreatischen Azini..... | 29 |
| 2.4.7 | Histologie | 30 |
| 3 | METHODEN | 32 |
| 3.1 | Tierhaltung..... | 32 |
| 3.1.1 | Haltung von Mäusen | 32 |
| 3.1.2 | Zucht von <i>Irag2</i> -defizienten Mäusen..... | 32 |
| 3.1.3 | Bestimmung der Mausgewichte..... | 34 |
| 3.2 | Genotypisierung der Versuchstiere..... | 34 |
| 3.2.1 | Gewinnung genomischer DNA aus Biopsien | 35 |
| 3.2.2 | Polymerase-Kettenreaktion..... | 35 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.2.3 | Agarose-Gelelektrophorese..... | 37 |
| 3.3 | Organentnahme..... | 39 |
| 3.4 | Allgemeine proteinbiochemische Methoden..... | 40 |
| 3.4.1 | Proteinisolierung aus Geweben/Thrombozyten/Azini..... | 40 |
| 3.4.2 | Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry..... | 41 |
| 3.4.3 | (Co)-Immunpräzipitation..... | 42 |
| 3.4.4 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese..... | 44 |
| 3.4.5 | Western Blot..... | 48 |
| 3.5 | Analyse von Thrombozyten..... | 52 |
| 3.5.1 | Isolation muriner Thrombozyten..... | 52 |
| 3.5.2 | <i>In vitro</i> Phosphorylierung muriner Thrombozyten-Lysate..... | 53 |
| 3.5.3 | <i>Ex vivo</i> Phosphorylierung intakter muriner Thrombozyten..... | 55 |
| 3.5.4 | Messung der Thrombozytenaggregation mittels Aggregometer..... | 56 |
| 3.5.5 | Messung der Ca ²⁺ -Freisetzung in Thrombozyten..... | 58 |
| 3.6 | Blutabnahme aus dem retrobulbären Plexus..... | 61 |
| 3.7 | Bestimmung der Amylase-Aktivität im Plasma und in Pankreas-Lysaten..... | 62 |
| 3.8 | Analyse isolierter pankreatischer Azini..... | 63 |
| 3.8.1 | Isolation pankreatischer Azini..... | 63 |
| 3.8.2 | Amylase-Sekretions-Assay..... | 66 |
| 3.8.3 | Messung der Ca ²⁺ -Freisetzung in isolierten pankreatischen Azini..... | 69 |
| 3.9 | Histologische Methoden..... | 71 |
| 3.9.1 | Herstellung histologischer Präparate (Paraffinschnitte)..... | 71 |
| 3.9.2 | Herstellung histologischer Präparate (Kryoschnitte)..... | 72 |
| 3.9.3 | X-Gal Färbung..... | 74 |
| 3.9.4 | Immunhistochemische Färbungen des Pankreas..... | 76 |
| 3.9.5 | Hämatoxylin-Eosin-Färbung des Pankreas..... | 77 |
| 3.10 | Statistische Auswertung..... | 78 |
| 4 | ERGEBNISSE..... | 79 |
| 4.1 | Funktion von IRAG2 in Thrombozyten..... | 79 |
| 4.1.1 | Expression von IRAG2 in Thrombozyten..... | 79 |
| 4.1.2 | Analyse der Interaktionspartner von IRAG2 in Thrombozyten..... | 80 |
| 4.1.3 | Expression von Proteinen des NO/cGMP/PKG-Signalweges in Thrombozyten..... | 82 |
| 4.1.4 | Phosphorylierung von IRAG2 in Thrombozyten..... | 83 |
| 4.1.5 | Einfluss von IRAG2 auf die Ca ²⁺ -Freisetzung in Thrombozyten..... | 84 |
| 4.1.6 | Einfluss von IRAG2 auf die Thrombozytenaggregation..... | 86 |
| 4.1.7 | Einfluss von IRAG2 auf die NO/cGMP-abhängige Hemmung der Thrombozytenaggregation..... | 88 |
| 4.2 | Funktion von IRAG2 im Pankreas..... | 91 |
| 4.2.1 | Expression von IRAG2 in Azinus-Zellen des exokrinen Pankreas..... | 91 |
| 4.2.2 | Interaktion von IRAG2 mit IP ₃ -Rezeptoren im Pankreas..... | 94 |
| 4.2.3 | Expression der IP ₃ -Rezeptoren in Pankreata von IRAG2-WT und IRAG2-KO Mäusen..... | 95 |
| 4.2.4 | Vergleich der Ca ²⁺ -Freisetzung in isolierten pankreatischen Azini von IRAG2-WT und IRAG2-KO Mäusen..... | 96 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 4.2.5 | Vergleich der Amylase-Sekretion in isolierten pankreatischen Azini von IRAG2-WT und IRAG2-KO Mäusen..... | 100 |
| 4.2.6 | Vergleich der Amylase-Aktivität in Lysaten und im Plasma von IRAG2-WT und IRAG2-KO Mäusen..... | 101 |
| 4.2.7 | Immunhistochemische Analyse der Amylase-Menge in den Pankreata von IRAG2-WT und IRAG2-KO Mäusen..... | 102 |
| 4.2.8 | Histologische Untersuchung der Pankreata mittels HE-Färbung..... | 103 |
| 4.2.9 | Analyse der Gewichte von IRAG2-WT und IRAG2-KO Mäusen bis zum Absetzen..... | 104 |
| 5 | DISKUSSION | 106 |
| 5.1 | Analyse der Expression von IRAG2 und dessen Interaktionspartnern..... | 106 |
| 5.1.1 | Expression von IRAG2 in Thrombozyten und im Pankreas..... | 106 |
| 5.1.2 | Interaktionspartner von IRAG2 in Thrombozyten und im Pankreas sowie Bedeutung der Interaktion mit den IP ₃ -Rezeptoren..... | 108 |
| 5.2 | Funktion von IRAG2 in Thrombozyten..... | 110 |
| 5.2.1 | NO/cGMP-abhängige Phosphorylierung von IRAG2..... | 110 |
| 5.2.2 | Einfluss von IRAG2 auf die Ca ²⁺ -Freisetzung in Thrombozyten..... | 111 |
| 5.2.3 | Einfluss von IRAG2 auf die Thrombozytenaggregation und die NO/cGMP-abhängige Aggregationshemmung..... | 114 |
| 5.3 | Funktion von IRAG2 im Pankreas..... | 116 |
| 5.3.1 | Einfluss der IRAG2-Defizienz auf die Ca ²⁺ -Freisetzung und auf Ca ²⁺ -Oszillationen in pankreatischen Azinus-Zellen..... | 116 |
| 5.3.2 | Einfluss der IRAG2-Defizienz auf die Funktion des exokrinen Pankreas sowie auf die Gewichte der Mäuse..... | 119 |
| 6 | ZUSAMMENFASSUNG | 122 |
| 6.1 | Funktion von IRAG2 in Thrombozyten..... | 122 |
| 6.2 | Funktion von IRAG2 im Pankreas..... | 124 |
| 7 | LITERATURVERZEICHNIS | 126 |
| 8 | ANHANG | 138 |
| 8.1 | Abbildungsverzeichnis..... | 138 |
| 8.2 | Tabellenverzeichnis..... | 140 |
| 8.3 | Abkürzungsverzeichnis..... | 141 |
| 8.4 | Totalproteinaufnahmen..... | 146 |
| 8.5 | Wissenschaftliche Veröffentlichungen..... | 149 |
| 8.5.1 | Publikationen im Rahmen der Dissertation..... | 149 |
| 8.5.2 | Weitere Publikationen..... | 149 |
| 8.5.3 | Posterpräsentationen..... | 149 |
| 8.6 | Danksagung..... | 150 |
| 8.7 | Eidesstattliche Erklärung..... | 151 |

1 Einleitung

1.1 Die NO/cGMP/PKG-Signalkaskade

1.1.1 Signaltransduktion

Für die Entdeckung des gasförmigen Moleküls Stickstoffmonoxid (NO) als Signalmolekül im kardiovaskulären System erhielten die Forscher R. F. Furchgott, L. J. Ignarro und F. Murad 1998 den Nobelpreis für Medizin [102]. Die Bedeutung und die Funktionen dieses Botenstoffes sind noch heute von großem Interesse und Gegenstand aktueller Forschung. NO entfaltet seine Wirkung im Körper durch eine Dilatation von Gefäßen. Einige Pharmaka, die NO freisetzen, stehen bereits seit Jahren zur Verfügung. Der wohl bekannteste Wirkstoff ist dabei der NO-Donor Nitroglycerin, welcher vor allem in der Therapie der Angina pectoris Anwendung findet [55, 79].

Die endogene Bildung des gasförmigen Radikals NO wird durch die Enzymfamilie der NO-Synthasen (NOS) katalysiert. Diese setzen das Substrat L-Arginin unter Verbrauch von Sauerstoff und Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) zum Botenstoff NO und L-Citrullin um (s. Abbildung 1-1). Von den NO-Synthasen sind bislang drei Isoformen bekannt: die endotheliale NOS (eNOS, NOS3), die induzierbare NOS (iNOS, NOS2) sowie die neuronale NOS (nNOS, NOS1). Die eNOS und die nNOS werden konstitutiv exprimiert, weshalb diese als konstitutive NO-Synthasen bezeichnet werden. Die iNOS hingegen ist auf transkriptioneller Ebene induzierbar. Ursprünglich bezog sich die Namensgebung der NO-Synthasen dabei auf die Gewebe, in denen die jeweiligen Isoformen erstmals beschrieben wurden [34, 35].

Als gasförmiges Molekül mit kurzer Halbwertszeit kann NO sehr schnell durch die Zellmembran in das Zytosol diffundieren. Dort ist der wichtigste NO-Rezeptor die lösliche Guanylylzyklase (NO-GC, sGC). Bei diesem Enzym handelt es sich um ein Heterodimer, von dem je eine α_1 - und α_2 - sowie eine β_1 - und β_2 -Untereinheit beschrieben sind. Die α_1/β_1 - sowie die α_2/β_1 -Isoform sind dabei am weitesten verbreitet. Ein funktionelles Dimer, das die β_2 -Untereinheit enthält, wurde allerdings noch nicht beschrieben [36, 63, 83]. An der β -Untereinheit befindet sich eine prosthetische Häm-Gruppe. Durch Bindung von NO an diese Häm-Gruppe kommt es zu einer katalytischen Umwandlung von Guanosin-5'-triphosphat (GTP) in das zyklische Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP) [3, 36, 57, 83, 133]. Neben der Bildung über die NO-GC kann cGMP auch über die partikuläre Guanylylzyklase (pGC), die in

der Zellmembran verankert ist, gebildet werden. Bei der pGC handelt es sich um einen Rezeptor für die natriuretischen Peptide – atriales natriuretisches Peptid (ANP), B-Typ natriuretisches Peptid (*brain natriuretic peptide*, BNP) und C-Typ natriuretisches Peptid (CNP) [36, 68]. cGMP ist ein bedeutender Botenstoff, der an der Regulation einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt ist. Zielstrukturen dieses Moleküls sind beispielsweise zyklische Nukleotid-gesteuerte Kationenkanäle (CNG-Kanäle) und Phosphodiesterasen (PDEs). Die Haupteffektoren von cGMP stellen jedoch die cGMP-abhängigen Proteinkinasen (PKG, cGK) dar [12, 53, 55]. Diese werden in Kapitel 1.1.2 näher beschrieben.

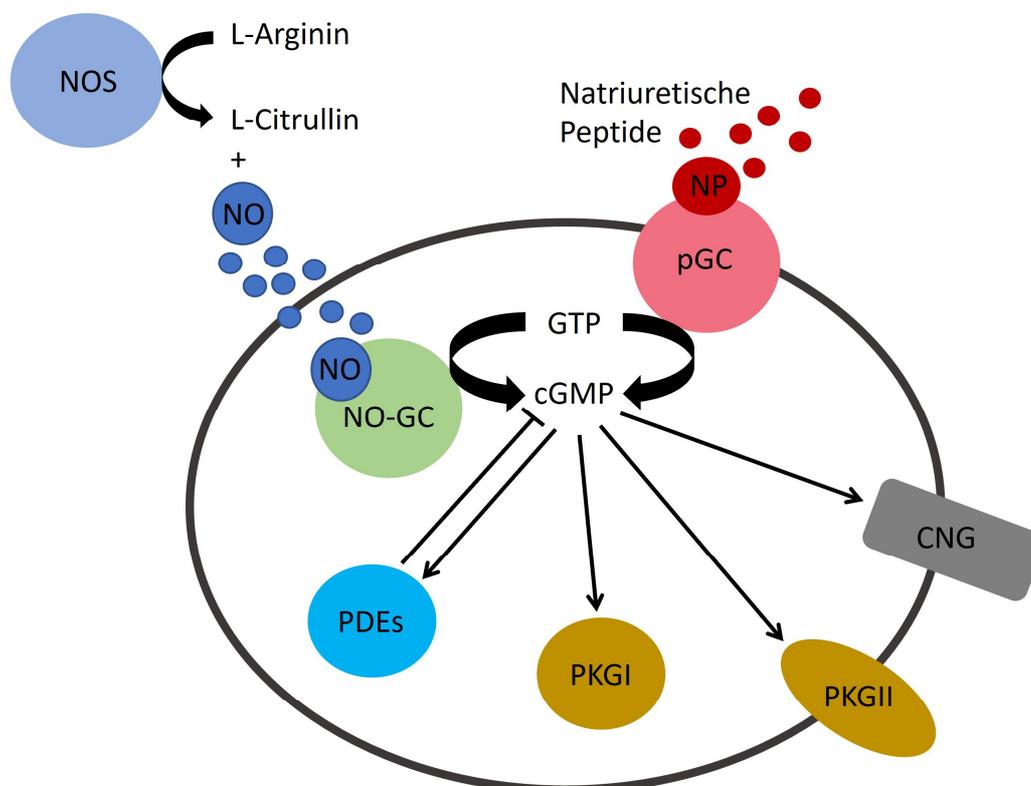


Abbildung 1-1: Der NO/cGMP/PKG-Signalweg

Das gasförmige Stickstoffmonoxid (NO) wird durch die NO-Synthase (NOS) aus L-Arginin gebildet und diffundiert durch die Zellmembran ins Zytoplasma, wo es an die lösliche Guanylylzyklase (NO-GC) bindet. Die aktivierte NO-GC katalysiert anschließend die Umwandlung von Guanosin-5'-triphosphat (GTP) in das zyklische Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP). cGMP kann außerdem durch die partikuläre Guanylylzyklase (pGC) gebildet werden. Diese wird durch die natriuretischen Peptide (NP) aktiviert. Zielstrukturen von cGMP sind vor allem die cGMP-abhängigen Proteinkinasen (PKGI und PKGII), sowie zyklische Nukleotid-gesteuerte Kationenkanäle (CNG) und Phosphodiesterasen (PDEs). Die weitere Beschreibung befindet sich im Text.

Die Wirkdauer des gebildeten cGMP hängt von den PDEs ab. Bei diesen handelt es sich um Enzyme, die zyklische Nukleotide, wie cGMP oder zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat

(cAMP), durch Hydrolyse spalten können. Dabei wird cGMP zu Guanosin-5'-monophosphat (GMP) und cAMP zu Adenosin-5'-monophosphat (AMP) abgebaut. Bislang konnten elf Familien von PDEs identifiziert werden, die durch alternatives Spleißen entstehen. cGMP wird hauptsächlich durch die PDE5,6 und 9 spezifisch hydrolysiert, während die spezifische Hydrolyse von cAMP überwiegend über die PDE4,7 und 8 vermittelt wird. Alle anderen PDEs sind in der Lage sowohl cGMP als auch cAMP abzubauen [26, 64]. Weiterhin kann cGMP die Aktivität der PDE2 und 3 modulieren, welche ebenfalls cAMP spezifisch hydrolysieren, indem cGMP entweder die PDE2 aktiviert oder die PDE3 hemmt. Über diesen sogenannten *crossstalk* kann cGMP somit Einfluss auf die cAMP-Konzentration in einer Zelle nehmen [7, 117, 146].

1.1.2 cGMP-abhängige Proteinkinasen

Die cGMP-abhängigen Proteinkinasen (PKG, cGK) gehören zur Klasse der Serin/Threonin-Kinasen und stellen die mit Abstand wichtigsten Effektoren von cGMP dar. Nach Aktivierung durch cGMP katalysieren sie die Übertragung einer Phosphatgruppe von Adenosintriphosphat (ATP) auf die Aminosäuren Serin (Ser) oder Threonin (Thr) bestimmter Zielproteine [55, 73, 114]. Es existieren zwei Gene, die für diese Enzyme codieren. Das Gen *Prkg1* codiert für die PKGI, von der aufgrund von alternativem Spleißen zwei Isoformen exprimiert werden – PKGI α und PKGI β . Diese beiden PKGI-Isoformen sind als lösliche Proteinkinasen im Zytosol lokalisiert. Die PKGII hingegen wird von dem Gen *Prkg2* codiert und liegt durch eine N-Myristoylierung fest verankert an der Zellmembran vor [32, 127, 136].

Generell sind die PKGs aus drei funktionellen Domänen aufgebaut: eine N-terminale Domäne, eine katalytische Domäne sowie eine regulatorische Domäne (s. Abbildung 1-2). Die N-terminale Domäne beinhaltet sowohl das Leucin-Zipper-Motiv, das für die Dimerisierung des Enzyms von Bedeutung ist, als auch eine autoinhibitorische Domäne, durch die die Aktivierung des katalytischen Zentrums kontrolliert wird. An der C-terminalen katalytischen Domäne befindet sich je eine Bindungsstelle für ATP und für das Substratprotein, auf das die Phosphatgruppe übertragen wird. In der regulatorischen Domäne sind zwei cGMP-Bindungsstellen lokalisiert, die sich in ihrer Affinität zu cGMP unterscheiden. Eine Bindestelle weist dabei eine hohe Affinität zu cGMP auf, während die andere eine niedrige Affinität zeigt. Durch die Bindung von cGMP kommt es zu einer Konformationsänderung des Enzyms, wodurch die Inhibierung durch die autoinhibitorische Domäne aufgehoben wird und die Phosphorylierung des Substrates ermöglicht wird [54, 55].

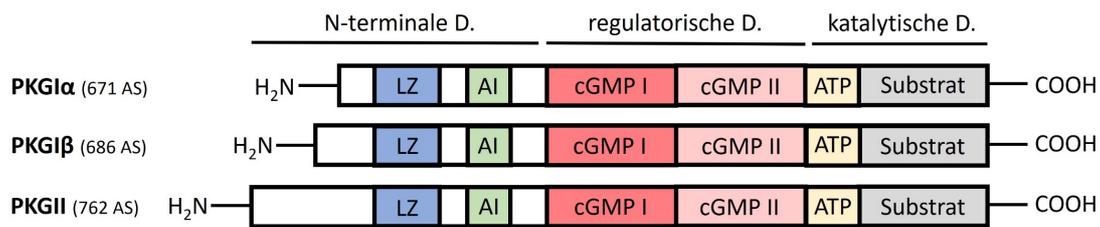


Abbildung 1-2: Aufbau der cGMP-abhängigen Proteinkinasen

Die N-terminale Domäne (N-terminale D.) beinhaltet das Leucin-Zipper-Motiv (LZ) sowie die autoinhibitorische Domäne (AI). In der regulatorischen Domäne (regulatorische D.) befinden sich zwei Bindestellen für zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP I und cGMP II). In der katalytischen Domäne sind sowohl die Bindestellen für Adenosintriphosphat (ATP) als auch für die Substratproteine (Substrat) lokalisiert. Die verschiedenen cGMP-abhängigen Proteinkinasen (PKGIα, PKGIβ und PKGII) unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Aminosäuren (AS). Eine weitere Erläuterung befindet sich im Text.

Die PKGs werden in vielen verschiedenen Geweben exprimiert. Eine starke Expression der PKGI kann in Thrombozyten, in der glatten Muskulatur, in der Niere, im Cerebellum, in den Spinalganglien, im Hippocampus und in der neuromuskulären Endplatte gezeigt werden. Die beiden Isoformen der PKGI unterscheiden sich dabei hinsichtlich ihrer Expression in den unterschiedlichen Geweben. Während die PKGIα vor allem in der Lunge, im Herz, in den Spinalganglien sowie im Cerebellum lokalisiert ist, kann die PKGIβ vor allem in Thrombozyten und in Neuronen des Hippocampus nachgewiesen werden. Eine Co-Expression von PKGIα und PKGIβ liegt in glattmuskulären Geweben wie Uterus, Blutgefäßen sowie Darm und Trachea vor [44, 54]. Die PKGII ist dagegen im Gehirn, in der Niere, in der Lunge, in Chondrozyten, in der Nebennierenrinde und in der Darmmukosa lokalisiert [31, 54, 73, 130, 135].

Für die PKGI ist eine Vielzahl von Substraten bekannt. Einige können dabei von beiden Isoformen phosphoryliert werden, andere nur spezifisch von einer der beiden Isoformen. Von vielen Substratproteinen ist die Spezifität hingegen noch nicht bekannt [55, 110]. Das Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein (VASP), das an der Regulation des Aktin Zytoskeletts und am Transport von Vesikeln beteiligt ist, wird ubiquitär exprimiert und kann sowohl über die PKGIα als auch über die PKGIβ phosphoryliert werden [18, 51]. Die Untereinheit der Myosinphosphatase *myosin phosphatase targeting subunit 1* (MYPT1) wird spezifisch über die PKGIα phosphoryliert. Durch die Phosphorylierung von MYPT1 wird die Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase (MLCP) aktiviert, was eine Abnahme der Ca^{2+} -Sensitivität zur Folge hat [142]. Das Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor assoziierte cGMP Kinase Substrat 1 (IRAG1) hingegen, welches die Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern moduliert,

interagiert spezifisch mit der PKGI β und wird auch durch diese phosphoryliert [45, 109]. IRAG1 wird in Kapitel 1.1.3 näher beschrieben.

Ein Substrat der PKGII ist beispielsweise der *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR). Bei diesem Protein handelt es sich um einen Chloridkanal, der unter anderem in der Lunge lokalisiert ist und für die Entstehung der Mukoviszidose von Bedeutung ist [128]. Weiterhin soll durch Aktivierung der PKGII die Renin-Sekretion aus den juxtaglomerulären Zellen der Niere unterdrückt werden [131].

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

Das Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor assoziierte cGMP Kinase Substrat 1 (IRAG1) wurde erstmals im Jahr 2000 von *Schlossmann et al.* beschrieben. Bis vor kurzem wurde es auch IRAG genannt und dessen humanes Homolog trägt die Bezeichnung MRV1 (*murine retrovirus integration site 1*) [109]. IRAG1 besitzt an seinem C-terminalem Ende eine Transmembrandomäne, über die es am endoplasmatischen Retikulum (ER) verankert ist. Zudem weist es eine coiled-coil-Domäne auf, die eine Protein-Protein-Wechselwirkung mit dem Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor Typ 1 (IP₃R1) ermöglicht (s. Abbildung 1-5). Weiterhin sind zwei Phosphorylierungsstellen für die PKGI β vorhanden. IRAG1 liegt dabei mit der PKGI β und dem IP₃R1 in einem trimären Komplex vor [1, 109]. Eine Interaktion von IRAG1 mit der PKGI α oder der PKGII konnte bisher jedoch nicht gezeigt werden. Die Interaktion zwischen der PKGI β und IRAG1 findet zwischen der Leucin-Zipper-Region am N-Terminus der PKGI β und der Peptidsequenz zwischen den Aminosäuren 152 und 184 des IRAG1-Proteins statt. Diese stabile Interaktion erfolgt dabei unabhängig von cGMP. Die Folge dieser Interaktion ist eine cGMP-abhängige Phosphorylierung von IRAG1 an der Aminosäure Ser696, was wiederum in einer Hemmung der durch den IP₃R1 vermittelten Ca²⁺-Freisetzung aus dem ER resultiert (s. Abbildung 1-3) [1, 19, 45, 109].

IRAG1 konnte bereits in einigen Organen und Geweben lokalisiert werden. Eine hohe Expression ist dabei in der glatten Muskulatur zu finden. Dazu zählen zum Beispiel Magen, Lunge, Uterus und Harnblase. Auch in Thrombozyten kann eine große Menge an IRAG1 nachgewiesen werden. In der Milz hingegen ist IRAG1 nur in geringen Mengen vorhanden [44, 109]. Neuere Arbeiten zeigen auch eine Expression von IRAG1 im murinen Sinusknoten [97].

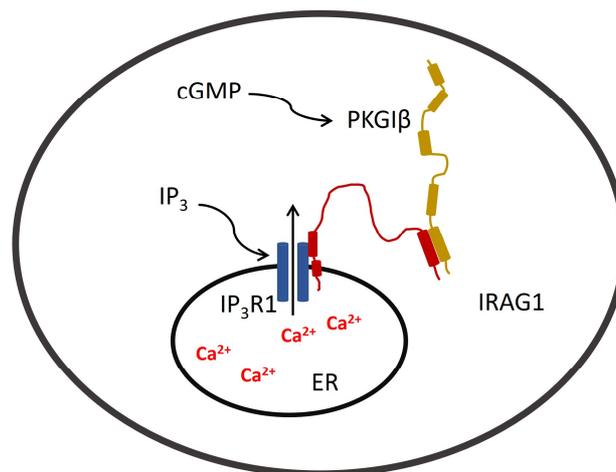


Abbildung 1-3: Trimärer Signalkomplex aus IRAG1, PKGI β und IP₃R1

Das Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor assoziierte cGMP Kinase Substrat 1 (IRAG1) liegt zusammen mit der cGMP-abhängigen Proteinkinase I β (PKGI β) und dem Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor Typ 1 (IP₃R1) in einem trimären Komplex vor. Nach Stimulation mit zyklischem Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP) kommt es zu einer Phosphorylierung von IRAG1, was in einer Hemmung der Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) vermittelten Calcium (Ca²⁺)-Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) resultiert. Die weitere Erklärung befindet sich im Text.

Die (patho-)physiologischen Funktionen von IRAG1 sind noch zu einem großen Teil unbekannt und Gegenstand aktueller Forschung. Untersucht wurde die Funktion von IRAG1 erstmals an IRAG1 ^{Δ 12/ Δ 12}-Mäusen, bei denen das Exon 12 des *Irag1*-Gens, das für den N-terminalen Bereich der coiled-coil-Domäne codiert, deletiert wurde. Durch diese Mutation wurde die Interaktion mit dem IP₃R1 unterbunden. In IRAG1 ^{Δ 12/ Δ 12}-Tieren konnte dabei ein vergrößerter Gastrointestinaltrakt sowie eine verminderte Darmmotilität beobachtet werden. Auch an globalen IRAG1-KO Mäusen, bei denen das Exon 3 des *Irag1*-Gens deletiert wurde, konnte eine Vergrößerung des Gastrointestinaltraktes gezeigt werden. Zudem war in beiden KO-Mauslinien die gastrointestinale Relaxation verringert [28, 45].

Eine große Bedeutung kommt IRAG1 in Thrombozyten zu, wo es nach Stimulation mit cGMP die Ca²⁺-Freisetzung und damit die Thrombozytenaggregation hemmt. In Untersuchungen zeigten IRAG1-KO Thrombozyten eine erhöhte Ca²⁺-Freisetzung sowie eine erhöhte Aggregationsrate. Bei Stimulation mit cGMP ist die Aggregationshemmung in IRAG1-KO Tieren nahezu aufgehoben. IRAG1 vermittelt somit die NO/cGMP-abhängige Hemmung der Thrombozytenaggregation. Bei Deletion von IRAG1 kann weiterhin eine erhöhte Thrombusbildung nachgewiesen werden. Somit wird auch die Bildung von Thromben durch IRAG1 beeinflusst [2, 107].

1.1.4 Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptoren

Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptoren (IP₃R) sind Ca²⁺-Ionen-Kanäle, die am ER lokalisiert sind und eine bedeutende Rolle in den Ca²⁺-Signalwegen einnehmen. Bei Stimulation der Phospholipase C (PLC) kommt es zur Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG). IP₃ kann daraufhin an die IP₃-Rezeptoren binden, was zu einer Freisetzung von Calcium (Ca²⁺) aus dem ER führt [9, 10, 50].

In Säugetieren existieren drei Isoformen des IP₃-Rezeptors, die von drei verschiedenen Genen codiert werden – IP₃R1, IP₃R2 und IP₃R3 [118]. Diese zeigen grundsätzlich einen ähnlichen Aufbau mit einer ausgeprägten Homologie in ihren Aminosäuresequenzen, unterscheiden sich jedoch in ihrem Expressionsmuster sowie in ihrer Affinität zu IP₃ und Calcium [60, 87, 123]. Generell sind die IP₃-Rezeptoren als Tetramere aufgebaut, die sich aus vier IP₃R-Untereinheiten zusammensetzen und dabei eine Kanalpore formen [21, 85]. Jede Untereinheit kann zunächst klassisch in drei funktionelle Domänen unterteilt werden: eine N-terminale Ligand-Bindungsdomäne, eine modulatorische Domäne und eine C-terminale Transmembrandomäne, welche die Kanalpore bildet [38, 39, 86, 87]. Neuere Untersuchungen des IP₃R1 postulieren jedoch ein sogenanntes Fünf-Domänen-Strukturmodell, bei der durch IP₃-Bindung verursachte Konformationsänderungen berücksichtigt werden (s. Abbildung 1-4).

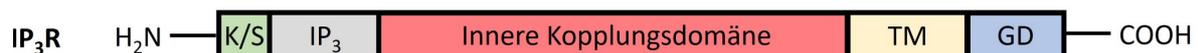


Abbildung 1-4: Fünf-Domänen-Strukturmodell des IP₃-Rezeptors

Postulierter struktureller Aufbau des Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptors (IP₃R) aus der N-terminalen Kupplungs-/Suppressordomäne (K/S), der Inositol-1,4,5-trisphosphat-Bindungsdomäne (IP₃), der inneren Kopplungsdomäne, der Transmembrandomäne/kanalbildenden Domäne (TM) sowie der C-terminalen *Gatekeeper*-Domäne (GD). Eine weitere Erläuterung befindet sich im Text.

In diesem Modell werden die IP₃-Rezeptoren somit in fünf funktionelle Domänen eingeteilt: eine N-terminale Kupplungs-/Suppressordomäne, eine IP₃-Bindungsdomäne, eine innere Kopplungsdomäne, eine Transmembrandomäne/kanalbildende Domäne sowie eine *Gatekeeper*-Domäne. Bindet IP₃ an die IP₃-Bindungsdomäne, so wird das Signal über die innere Kopplungsdomäne und die Transmembrandomäne/kanalbildende Domäne an die *Gatekeeper*-Domäne weitergeleitet. Diese bewirkt wiederum eine Konformationsänderung der

Transmembrandomäne/kanalbildenden Domäne, wodurch es zu einer Kanalöffnung kommt. Wird jedoch die Suppressordomäne aktiviert, kommt es durch eine Konformationsänderung zur Hemmung der Bindung von IP₃ an die IP₃-Bindungsdomäne. Neben der Signalweiterleitung kann an der inneren Kopplungsdomäne beispielsweise eine Phosphorylierung der IP₃-Rezeptoren durch Proteinkinasen und somit eine Modulation der IP₃-Rezeptor Aktivität erfolgen [65, 87].

Das Ausmaß der Beteiligung der verschiedenen IP₃-Rezeptor Subtypen an den Ca²⁺-Signalwegen ist noch weitgehend unbekannt [50]. Eine bedeutende Rolle kommt den IP₃-Rezeptoren bei sekretorischen Prozessen zu. Im exokrinen Pankreas beispielsweise scheinen vor allem die IP₃-Rezeptor Subtypen 2 und 3 von Bedeutung zu sein [40]. Der IP₃R1 hingegen kommt in großen Mengen im Gehirn vor, wo er eine bedeutende Rolle bei Lernprozessen, bei bestimmten Verhaltensweisen sowie bei der Gedächtnisleistung einnimmt [37, 59, 81, 93].

1.2 Das Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor assoziierte 2

1.2.1 Struktur von IRAG2

Das Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor assoziierte 2 (IRAG2) wird auch als Jaw1 oder *lymphoid restricted membrane protein* (LRMP) bezeichnet und wurde erstmals im Jahr 1994 von Behrens *et al.* beschrieben [5]. Bei IRAG2 handelt es sich um ein Membranprotein, das aus 539 Aminosäuren besteht und über eine C-terminale Transmembrandomäne am ER lokalisiert ist. Das Targeting an das ER erfolgt dabei posttranslational. Aufgrund seiner N-terminalen zytosolischen Domäne und der luminalen C-terminalen Transmembrandomäne wird es den Typ-II Membranproteinen zugeordnet. Der hydrophobe, C-terminale Membrananker von IRAG2 zeigt dabei strukturelle Ähnlichkeiten mit den SNAP-Rezeptoren (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein*), die für Vesikeltargeting sowie Vesikelfusion von Bedeutung sind. Außerdem weist IRAG2 im mittleren Drittel des Proteins eine coiled-coil-Domäne auf, durch die Protein-Protein-Wechselwirkungen möglich sind [5, 6]. Vor allem innerhalb dieser coiled-coil-Domäne ist eine ausgeprägte Homologie von 44 % zwischen IRAG2 und IRAG1 erkennbar, wodurch ähnliche Interaktionspartner der beiden Proteine denkbar wären [97, 115, 116]. Vergleicht man die Struktur von IRAG1 und IRAG2, so fehlt bei IRAG2 jedoch die Sequenz, die für eine stabile Interaktion mit der PKGIß notwendig ist (s. Abbildung 1-5) [1, 19].

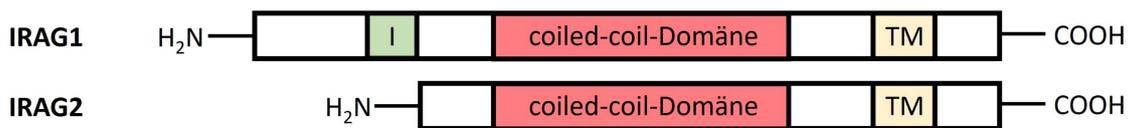


Abbildung 1-5: Strukturmodell von IRAG1 und IRAG2

Vergleich des strukturellen Aufbaus des Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor assoziierten cGMP Kinase Substrats 1 (IRAG1) und des Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor assoziierten 2 (IRAG2). Beide Proteine besitzen eine C-terminale Transmembrandomäne (TM) sowie eine coiled-coil-Domäne. IRAG1 weist zudem eine Interaktionsdomäne (I) für eine stabile Interaktion mit der PKGI β auf, die bei IRAG2 fehlt. Die weitere Beschreibung befindet sich im Text.

1.2.2 Expression von IRAG2

Die Expression von IRAG2 konnte zunächst in lymphoiden Geweben gezeigt werden. Dabei war die mRNA von IRAG2 in humanen B- und T-Zelllinien sowie in den murinen Geweben von Milz und Thymus nachweisbar. Auf Proteinebene konnte die IRAG2-Expression in der Milz und im Thymus von Mäusen nachgewiesen werden [5]. In humanen Geweben und Zellen konnte die Proteinexpression von IRAG2 in der Zunge, in den Mandeln, in Zymogenproduzierenden Zellen des Magens, in der Milz sowie in neoplastischen Geweben, wie zum Beispiel in B-Zell-Lymphomen, detektiert werden [124].

Später konnte IRAG2 auch in nicht-lymphoiden Geweben und Zellen lokalisiert werden. So war in den circumvallaten, foliaten und fungiformen Geschmackspapillen vom Typ süß, bitter und umami, in Bürstenzellen des Darms und im Sinusknoten eine IRAG2-Expression nachweisbar [23, 97, 116].

1.2.3 Funktion von IRAG2

Die molekularen und physiologischen Funktionen von IRAG2 sind noch zu großen Teilen unerforscht. Bereits bekannt ist jedoch, dass IRAG2 in den circumvallaten Geschmackspapillen der Zunge mit dem IP₃R3 colokalisiert. Außerdem konnte eine Interaktion mit dem IP₃R3 in heterolog transfizierten COS7-Zellen festgestellt werden. Da die IP₃-Ca²⁺-Signalkaskade eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion der Geschmacksrichtung süß, bitter und umami spielt, liegt die Vermutung nahe, dass IRAG2 eine Rolle bei der Geschmacksweiterleitung spielt [116].

Chang et al. wiesen in co-transfizierten MEF-Zellen (*mouse embryo fibroblast*) eine Interaktion von IRAG2 mit dem IP₃R2 nach, welcher der dominierende IP₃-Rezeptor Subtyp in intestinalen Bürstenzellen ist. Dabei konnte festgestellt werden, dass IRAG2 den Ca²⁺-Flux in den MEF-Zellen fördert. Dieser Ca²⁺-Flux ist wiederum in den intestinalen Bürstenzellen für die Interleukin-25-Freisetzung von Bedeutung und damit für die Typ-II Immunantwort. Nach parasitären Infektionen wiesen IRAG2-KO Tiere daher eine gestörte Immunantwort sowie eine erhöhte Menge an Parasiten im Darm auf. Zudem konnte im Rahmen dieser Untersuchungen gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor p53 eine hohe Expression von IRAG2 in intestinalen Bürstenzellen gewährleistet und somit dessen Transkription reguliert. Eine p53-Defizienz führte hierbei zu einer verminderten IRAG2-Expression, zu vermindertem Ca²⁺-Flux in Zellen sowie zu einer verminderten Immunreaktion. IRAG2 scheint daher ein wichtiger Mediator in der p53-vermittelten Typ-II Immunantwort in intestinalen Bürstenzellen nach parasitären Infektionen zu sein [23].

Auch *Okumura et al.* untersuchten die Auswirkungen von IRAG2 auf Ca²⁺-Signalwege. Dabei konnte in heterolog transfizierten HEK-Zellen (*human embryonic kidney*) festgestellt werden, dass IRAG2 die Ca²⁺-Freisetzung fördert. Außerdem wurde in diesem Rahmen auch gezeigt, dass IRAG2 über dessen coiled-coil-Domäne mit allen IP₃-Rezeptor Subtypen interagiert und damit deren Aktivität auf unterschiedliche Weise fördert [95].

Neben der Interaktion mit den IP₃-Rezeptoren ist eine Interaktion von IRAG2 – sowie von IRAG1 – mit den HCN4-Kanälen (*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 4*) beschrieben. Hierbei zeigen IRAG1 und IRAG2 jedoch unterschiedliche Effekte auf diese Kanäle. Während IRAG1 die Kanalfunktion fördert, bewirkt IRAG2 einen Funktionsverlust der Kanäle [97].

Weiterhin zeigt der C-Terminus von IRAG2 eine partielle Homologie zu dem PPPX-Motiv der KASH-Proteine (*Klarsicht/ANC-1/Syne/homology*), das aus vier Aminosäuren besteht [56]. Außerdem konnte IRAG2 an der äußeren Kernmembran detektiert werden, wo es mit SUN-Proteinen (Sad-1/UNC-84) sowie mit den Mikrotubuli interagiert. In diesem Zusammenhang konnte nachgewiesen werden, dass IRAG2 an der Aufrechterhaltung der Form des Zellkerns beteiligt ist, da ein Knockdown von IRAG2 zu starken Deformationen des Zellkerns führt. Aus diesem Grund liegt die Vermutung nahe, dass IRAG2 als KASH-Protein innerhalb eines sogenannten LINC-Komplexes (*linker of nucleus and cytoskeletons*) fungieren könnte und somit die Form der Zellkerne stabilisiert [66].

Auch an der Organisation und Formation der Struktur des ER scheint IRAG2 beteiligt zu sein. IRAG2 hemmt dabei über dessen N-terminale Domäne die Formation eines OSER (*organized smooth endoplasmic reticulum*), wodurch die Lokalisation der Interaktionspartner von IRAG2 am ER beibehalten wird [67].

1.3 Die Thrombozyten

1.3.1 Morphologie und Funktion der Thrombozyten

Thrombozyten sind hochspezialisierte Zellen, die eine wichtige Rolle bei der Blutgerinnung, der Wundheilung sowie der Bildung von Thromben spielen. Auch bei inflammatorischen Prozessen sind diese von Bedeutung. Unter normalen physiologischen Bedingungen zirkulieren die Thrombozyten dabei im Blut, ohne in Kontakt mit dem Endothel zu stehen oder mit anderen Thrombozyten zu interagieren. Kommt es jedoch zu Gefäßverletzungen, wird eine Kaskade ausgelöst, die letztlich zur Entstehung eines Aggregates aus Thrombozyten führt. Dadurch können Endothelschäden im Rahmen der primären Hämostase repariert werden. Allerdings kann diese Aggregation auch zur Bildung von Thromben – mit schwerwiegenden kardiovaskulären Folgen – führen [25, 61].

Generell handelt es sich bei Thrombozyten um kleine, kernlose Plättchen mit einer Dicke von etwa 0,5–0,75 μm und einem Längendurchmesser von ca. 1–4 μm . Ein erwachsener Mensch besitzt im Schnitt etwa 150.000–400.000 Thrombozyten/ μl Blut. Liegt die Thrombozytenzahl unter 50.000 Thrombozyten/ μl spricht man von einer Thrombozytopenie [15]. Gebildet werden die Thrombozyten durch Abschnürung aus den Vorläuferzellen – den sogenannten Proplättchen. Diese entstehen wiederum durch Abschnürung des Zytoplasmas aus den Megakaryozyten des Knochenmarks. Der gesamte Vorgang wird auch als Thrombopoese bezeichnet. Die Bildung der Thrombozyten aus den Vorläuferzellen erfolgt dabei sowohl unter dem Einfluss von Zytokinen als auch unter Kontrolle des Megakaryozytenwachstumsfaktors Thrombopoietin. Dieser stellt ein Glykoproteinhormon dar und wird in den Hepatozyten der Leber gebildet. Die Verweildauer der Thrombozyten im Blut liegt etwa bei sieben bis zehn Tagen. Anschließend werden sie in der Leber, der Milz und der Lunge abgebaut [15, 25, 49, 111].

Strukturell lassen sich die Thrombozyten in verschiedene Zonen unterteilen: die periphere Zone, die strukturelle Zone (*Sol-Gel* Zone), die Organellen-Zone sowie das Membransystem [46].

- Die periphere Zone besteht aus der inneren und äußeren Zellmembran (Phospholipiddoppelschicht), die aus Glykoproteinen aufgebaut und von einer Glykokalyx umgeben ist. Die Glykoproteine dienen dabei als Oberflächenrezeptoren, welche für die Adhäsion und Aktivierung der Thrombozyten von Bedeutung sind [43, 46, 99].
- Unterhalb der Zellmembran befindet sich die strukturelle Zone. Diese ist aus dem Zytoskelett aufgebaut, das aus Aktin, Myosin und Tubulin gebildet wird. Die Glykoproteinrezeptoren an der Oberfläche sind dabei über Linkermoleküle mit dem Zytoskelett verbunden. Durch diese Verbindung behält der Thrombozyt seine diskoide Ruheform und wird stabilisiert. Zudem wird die Verschmelzung der Granula mit der Zellmembran und somit die Sekretion von gerinnungsfördernden Stoffen verhindert. Nach Aktivierung der Thrombozyten dissoziieren die Oberflächenrezeptoren vom Zytoskelett ab, wodurch die Granula mit der Zellmembran verschmelzen und somit Exozytosevorgänge stattfinden können. Auch die Veränderung der Thrombozytenoberfläche – der sogenannte *shape-change* – wird durch das Zytoskelett ermöglicht [43, 46, 99].
- Die Zone der Organellen befindet sich im Zentrum der Zelle im Zytoplasma. Darin sind die verschiedenen Speichergranula zu finden, bei denen zwischen elektronendichten Granula, α -Granula und Lysosomen unterschieden wird. Die elektronendichten Granula enthalten unter anderem ATP, Adenosindiphosphat (ADP) und Serotonin. Die Elektronendichte ist dabei vor allem auf Ca^{2+} -Ionen sowie anorganische Phosphate zurückzuführen. In den α -Granula sind Proteine des Blutplasmas, wie beispielsweise Fibrinogen, Albumin oder der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) gespeichert, aber auch Plättchen-spezifische Proteine, wie der von-Willebrand-Faktor (vWF) oder der Plättchenfaktor 4 (PF4). Die Lysosomen beinhalten dagegen vor allem saure Hydrolasen [15, 43, 46, 99].
- Das Membransystem besteht zum einen aus dem sogenannten offenen kanalikulären System (*open canalicular system*, OCS). Dieses ist für die Freisetzung der sezernierten

Moleküle aus den Thrombozyten nach dem Aktivierungsprozess verantwortlich. Das OCS ist aus Kanälen aufgebaut, die mit der Zellmembran verbunden sind und weit ins Zellinnere reichen. Somit wird eine Oberflächenvergrößerung der Thrombozyten gewährleistet. Zum anderen beinhaltet das Membransystem das dichte tubuläre System (*dense tubular system*, DTS), das sich aus dem glatten ER der Megakaryozyten bildet und den Hauptspeicherort der Ca^{2+} -Ionen in Thrombozyten darstellt [43, 46].

1.3.2 Mechanismen der Thrombozytenaggregation und Aggregationshemmung

Die Bildung eines Plättchen-Aggregates im Rahmen der primären Hämostase läuft im Wesentlichen in drei Schritten ab: der Adhäsion, der Aktivierung und der Aggregation der Thrombozyten. Bei allen Schritten nehmen die Oberflächenrezeptoren der Thrombozyten eine bedeutende Funktion ein. Kommt es zu einer Verletzung von Gefäßen, ist der erste Schritt die Adhäsion von Thrombozyten am defekten Endothel. Dies geschieht durch Interaktion der thrombozytären Glykoproteinrezeptoren mit Bestandteilen der subendothelialen Matrix (Laminin, Fibronectin, Kollagen, vWF), die durch die Gefäßverletzung freigelegt werden. Wichtig für die Adhäsion ist initial vor allem der von-Willebrand-Faktor-Rezeptor (vWF-Rezeptor, GP Ib/IX/V), der einen Komplex aus den Glykoproteinen GP Iba, GP Ib β , GP IX und GP V darstellt, wobei die Bindestelle für den vWF dabei in der GP Ib Einheit liegt. Die Bindung von Kollagen-gebundenem vWF an den vWF-Rezeptor ermöglicht die Interaktion von Kollagen mit dem Kollagen-Rezeptor GP VI. Hierdurch wird eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst, die in der Aktivierung des Kollagen-Rezeptors GP Ia/IIa (Integrin α_2/β_1) sowie des Fibrinogen-Rezeptors GP IIb/IIIa (Integrin α_{IIb}/β_3) mündet. Die Interaktion von Kollagen mit dem Kollagen-Rezeptor GP Ia/IIa resultiert wiederum in einer stabilen Adhäsion der Thrombozyten am Endothel [24, 92, 94, 105].

Nach der Adhäsion der Thrombozyten erfolgt deren Aktivierung. Diese wird initial vermittelt über die Interaktion von Kollagen mit dem Kollagen-Rezeptoren GP VI. Dabei wird die Phospholipase C γ 2 (PLC γ 2) aktiviert, wodurch es zu einer Spaltung von PIP $_2$ in DAG und IP $_3$ kommt. Durch DAG wird daraufhin der Ca^{2+} -Einstrom über Ca^{2+} -Kanäle ins Zellinnere stimuliert, während durch IP $_3$ die Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern vermittelt wird. Als Folge dieses intrazellulären Ca^{2+} -Anstieges werden Mediatoren, wie beispielsweise ADP oder Thromboxan A $_2$ (TxA $_2$), aus den thrombozytären Granula sezerniert, die durch Bindung an ihre Rezeptoren weitere Thrombozyten aktivieren können [92, 94, 129]. Die

Aktivierung der Thrombozyten durch ADP kann dabei über die ADP-Rezeptoren – die purinergen Rezeptoren P2Y₁ (P2Y Purinozeptor 1) und P2Y₁₂ (P2Y Purinozeptor 12) – vermittelt werden, während die Aktivierung durch TxA₂ über den Thromboxan-Rezeptor (TxA₂-Rezeptor) abläuft. Bei diesen Rezeptoren handelt es sich jeweils um G-Proteingekoppelte-Rezeptoren (GPCR) [94].

An der Oberfläche der aktivierten Thrombozyten wird außerdem Thrombin, ein sehr potenter Thrombozyten-Aktivator, gebildet. Die Thrombin-Rezeptoren sind ebenfalls G-Proteingekoppelt und werden als Protease-aktivierte-Rezeptoren (PAR) bezeichnet. In humanen Thrombozyten werden vor allem der PAR1 und der PAR4 exprimiert, in murinen Thrombozyten hingegen der PAR3 und der PAR4 [27, 94].

Nach Bindung von ADP, TxA₂ und Thrombin an ihre Rezeptoren kommt es sowohl zur Aktivierung weiterer Thrombozyten als auch zur Aggregation der bereits aktivierten Thrombozyten. Bindet ADP an den P2Y₁₂-Rezeptor führt dies zu einer Hemmung der Adenylylzyklase und somit zu einer Verringerung der cAMP-Bildung, was in einer Förderung der Thrombozytenaggregation resultiert [62, 90, 94]. Bei Interaktion von ADP mit dem P2Y₁-Rezeptor, bei Stimulation der PAR durch Thrombin sowie durch Bindung von TxA₂ an den TxA₂-Rezeptor wird die PLC β aktiviert. In der Folge kommt es zur Spaltung von PIP₂ zu IP₃ und DAG. IP₃ wiederum führt zu einer IP₃R-vermittelten Ca²⁺-Freisetzung aus dem ER, wodurch die Sekretion weiterer Botenstoffe wie ADP, vWF, aber auch Fibrinogen induziert wird. DAG kann außerdem die Proteinkinase C aktivieren, was zusätzlich zu einer Aktivierung des Fibrinogen-Rezeptors führt. Weiterhin wird durch den erhöhten Ca²⁺-Spiegel die Myosin-Leichtketten-Kinase aktiviert, die die Myosin-Leichtkette phosphoryliert. Dies bewirkt eine Umlagerung des Zytoskeletts und damit den sogenannten *shape-change*, bei dem die Thrombozyten ihre Oberfläche verändern und es zur Ausstülpung von Pseudopodien kommt [27, 90, 94, 122]. Zum einen wird dadurch eine Vergrößerung der Oberfläche und damit eine Erhöhung der Interaktionsmöglichkeit mit anderen Thrombozyten ermöglicht, zum anderen die Freisetzung der sezernierten Stoffe durch Verschmelzung der Granula mit der Zellmembran. Das freigesetzte Fibrinogen kann letztlich als Brückenmolekül zwischen zwei aktivierten Fibrinogen-Rezeptoren fungieren und somit mehrere Thrombozyten miteinander verbinden. Dadurch entsteht eine Ansammlung aus Thrombozyten, was auch als Thrombozytenaggregation bezeichnet wird [8, 94, 105].

Die Erhöhung der intrazellulären cAMP- und cGMP-Spiegel ist der effektivste Mechanismus, die Funktion der Thrombozyten zu hemmen [112]. So kann beispielsweise durch Inkubation

von Thrombozyten mit NO-Donoren oder Prostacyclin die Ca^{2+} -Freisetzung und damit die Thrombozytenaggregation verhindert werden. Bei Stimulation mit NO wird die NO-GC aktiviert, was zur Bildung von cGMP führt. Prostacyclin stimuliert dagegen die Adenylylzyklase und somit die cAMP-Bildung. Erhöhte cAMP- und cGMP-Spiegel regulieren wiederum ihren jeweiligen Effektor – die Proteinkinase A (PKA) bzw. die PKG. Durch diese Kinasen kann eine Vielzahl an Substraten phosphoryliert werden, die an der Thrombozytenfunktion beteiligt sind [20, 78, 112]. So kommt es beispielsweise nach Phosphorylierung von IRAG1 durch die PKGI β zu einer Hemmung der Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern, was in einer verminderten Thrombozytenaggregation resultiert [2, 107, 109]. Auch die PKA- und PKG-abhängige Phosphorylierung des IP_3 -Rezeptors führt zu einer verminderten Ca^{2+} -Freisetzung und damit zu einer Einschränkung der Thrombozytenfunktion [20, 78].

1.3.3 Pathophysiologische Bedeutung der Thrombozyten

Störungen in der Thrombozytenfunktion (Thrombozytopathien) oder eine Verminderung der Thrombozytenzahl im Blut (Thrombozytopenien) können zu schwerwiegenden Blutungen führen. Man spricht dabei von hämorrhagischen Diathesen. Typische Symptome für hämorrhagische Diathesen sind punktförmige Einblutungen in Haut und Schleimhaut – sogenannte thrombozytopenische Purpura. Diese sind bedingt durch spontane Einblutungen aus den Kapillaren. Als Folge dieser erhöhten Blutungsneigung können beispielsweise Hämatome an Druckstellen, Menorrhagien mit dadurch bedingtem Eisenmangel oder Komplikationen durch Blutungen während und nach Operationen auftreten [15, 99].

Von einer Thrombozytopenie spricht man, wenn weniger als 50.000 Blutplättchen/ μl Blut vorhanden sind. Die Ursachen der Thrombozytopenie können dabei verschiedenen Ursprungs sein. Als Beispiele hierfür können ein Mangel an Thrombopoietin oder große Blutverluste genannt werden. Auch eine Knochenmarkschädigung, beispielsweise durch Therapie mit Zytostatika, ionisierende Strahlung oder bedingt durch Neoplasien, kann zu einer Verringerung der Thrombozytenzahl führen [15, 99].

Im Gegensatz zu den Thrombozytopenien ist bei den Thrombozytopathien die Anzahl der Thrombozyten im Blut im normalen Bereich. Hier liegt dagegen eine Störung der Thrombozytenfunktion vor, die verschiedene Phasen der Thrombozytenaggregation betreffen kann. Diese Störungen können sowohl angeboren sein als auch durch Therapie mit bestimmten

Medikamenten erworben werden. So kann unter anderem die Adhäsion der Thrombozyten gestört sein, wenn bestimmte Oberflächenrezeptoren unzureichend exprimiert werden. Weiterhin sind Defekte in der Granulasekretion möglich, wenn entweder deren Inhaltsstoffe fehlen oder die Freisetzung dieser Substanzen beeinträchtigt ist [15, 99].

Neben den hämorrhagischen Diathesen existieren Erkrankungen, bei denen es zu einer gesteigerten Bildung von Thromben kommt, was schwerwiegende kardiovaskuläre Risiken für den Patienten zur Folge haben kann. Die Thrombozyten spielen dabei eine entscheidende Rolle. An geschädigten Gefäßen können sich Thromben aus Fibrin und Thrombozyten bilden und atherosklerotische Plaques formen, die zu teilweisen oder ganzen Gefäßverschlüssen führen. Folglich kann es unter anderem zu Herzinfarkten oder Schlaganfällen kommen – den häufigsten Todesursachen der westlichen Welt [104]. Ein intaktes Endothel ist in der Lage über Regulationsmechanismen, beispielsweise durch Freisetzung von Prostacyclin oder NO, die Aktivität der Thrombozyten zu reduzieren und somit die Thrombusbildung zu regulieren. Untersuchungen zeigen jedoch, dass sich Thrombozyten nicht nur an ein defektes Endothel mit freiliegenden subendothelialen Oberflächen anlagern können. Liegen inflammatorische oder apoptotische Prozesse in Endothelzellen vor, werden proinflammatorische Stoffe sezerniert, welche die Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten fördern. Dies stimuliert wiederum die Freisetzung weiterer proinflammatorischer Substanzen aus den Thrombozyten, wodurch die inflammatorischen Prozesse am Gefäß weiter verstärkt werden. In der Folge kommt es zu einer gesteigerten Bildung von Thromben, was in atherosklerotischen Erkrankungen resultiert [13, 41, 42, 104].

1.4 Das Pankreas

1.4.1 Aufbau und Funktion des Pankreas

Das Pankreas, das auch als Bauchspeicheldrüse bezeichnet wird, ist mit einer Länge von etwa 14–23 cm und einem Gewicht von etwa 100 g das größte Drüsengewebe im menschlichen Körper [74]. Es befindet sich im oberen Abdomen auf Höhe des ersten bis zweiten Lendenwirbels, eingebettet zwischen Magen und den großen Bauchgefäßen *Aorta* und *Vena cava inferior*. Zudem besteht eine Verbindung mit dem Duodenum, in das der gebildete Verdauungssaft abgegeben wird. Anatomisch kann man das Pankreas in Pankreaskopf, Pankreaskörper und Pankreasschwanz unterteilen, wobei die Grenzen nicht immer eindeutig definiert werden können. Der Pankreaskopf ist dabei der dickste Teil, besitzt eine hakenförmige

Struktur und wird umgeben vom Duodenum. Der Pankreaskörper schließt sich an den Kopf an und zieht sich quer durch das Abdomen, bis er in den Pankreasschwanz übergeht. Dieser erstreckt sich wiederum bis zur Milz [4, 14, 74].

Der Hauptausführungsgang des Pankreas wird auch als Wirsung-Gang oder *Ductus pancreaticus* bezeichnet. Dieser hat einen Durchmesser von etwa 2 mm und durchzieht der Länge nach das gesamte Organ. Gemeinsam mit dem Gallengang mündet er schließlich an der Vater-Papille in das Duodenum. Funktionell lässt sich das Pankreas in zwei Bereiche einteilen: das exokrine und das endokrine Pankreas. Während das endokrine Pankreas für die Sekretion von Hormonen zuständig ist, werden aus dem exokrinen Pankreas die Verdauungsenzyme sezerniert und der Verdauungssaft gebildet [4].

Beim exokrinen Pankreas handelt es sich um eine rein seröse Drüse, die mit einem Anteil 95–98 % den größten Teil des Pankreasgewebes ausmacht. Das Pankreas-Parenchym ist dabei von einer dünnen Bindegewebskapsel umgeben. Von dieser gehen Septen aus, die das Gewebe in Läppchen von 1–3 mm Durchmesser unterteilen. Diese Läppchen bestehen wiederum aus mehreren hundert Azini, die zu Azinus-Zellkomplexen zusammengesetzt und über Schaltstücke mit dem Ausführungssystem verbunden sind. In den Azinus-Zellen findet die Produktion und Sekretion der proteolytischen Enzyme statt, die das Pankreassekret bilden. Diese Verdauungsenzyme werden in ihrer inaktiven Form in sekretorischen Granula – den Zymogengranula – gespeichert und auf Stimulation hin freigesetzt. Lokalisiert sind die Granula dabei am apikalen Pol der Zelle, der in das Lumen ragt. Die eigentliche Aktivierung der Enzyme erfolgt erst im Duodenum, um den Pankreas vor einem Selbstverdau zu schützen. Täglich werden dabei etwa 1,5–2 l Pankreassekret in das Duodenum sezerniert. Der enzymreiche, alkalische und dünnflüssige Verdauungssaft besteht vor allem aus Wasser, α -Amylase, Trypsin, Lipase sowie Ribo- und Desoxyribonukleasen. Ein weiterer wichtiger Bestandteil ist Hydrogencarbonat (HCO_3^-), das in den Epithelzellen der Schaltstücke und der intralobulären Ausführungsgänge gebildet und sezerniert wird. Dieses stellt den basischen pH-Wert (pH 8) des Sekretes und dadurch die Neutralisation des Magensaftes im Duodenum sicher. Der sezernierte Verdauungssaft ermöglicht die Spaltung von Nukleinsäuren, Proteinen, Fetten und Kohlenhydraten und somit die Verdauung von Nahrungsbestandteilen im Duodenum [4, 14, 74, 77].

Mit einem Anteil von etwa 2 % der Gesamtmasse macht das endokrine Pankreas nur einen kleinen Teil des Organs aus und wird aus den Pankreas-Inseln, auch Langerhans-Inseln genannt, gebildet. Das humane Pankreas besitzt mehr als eine Million Inseln, die im exokrinen Gewebe verstreut vorliegen. Man unterscheidet hier zwischen verschiedenen Zelltypen, die

verschiedene Hormone (in Klammern genannt) produzieren: den α -Zellen (Glukagon), den β -Zellen (Insulin), den δ -Zellen (Somatostatin), den PP-Zellen (Pankreatisches Polypeptid) und den ε -Zellen (Ghrelin). Den größten Teil machen dabei die β -Zellen aus, welche das zur Regulation des Blutzuckers lebensnotwendige Insulin produzieren und dieses bei einem Anstieg des Blutzuckerspiegels in die Blutbahn freisetzen [77].

1.4.2 Sekretion von Verdauungsenzymen aus dem exokrinen Pankreas

Die wichtigsten hormonellen Regulatoren der Freisetzung von Verdauungsenzymen und HCO_3^- sind Cholecystokin (CCK) und Sekretin. Bei Aufnahme von Lipiden, Peptiden und Aminosäuren durch die Nahrung wird vor allem die CCK-Freisetzung stimuliert, was zur Proteinsekretion aus den Azini führt. HCl, Gallensalze und Fettsäuren fördern dagegen die Freisetzung von Sekretin – den wichtigsten Stimulus für die Sekretion von Flüssigkeit und HCO_3^- [96]. Auch das vegetative Nervensystem reguliert die Freisetzung: Acetylcholin (Ach) führt nach Aktivierung des Parasympathikus zu einer Sekretion von Verdauungsenzymen und HCO_3^- [22, 77].

Im unstimulierten Zustand werden konstitutiv Verdauungsenzyme in niedriger Rate sezerniert. Bei Stimulation erhöht sich die Sekretion um das 5–10-fache. Allerdings wird auch unter längerer Stimulation nicht der Gesamtinhalt an Enzymen aus den Granula abgegeben. Die Abgabe ist dabei auf ca. 10–20 % pro Stunde begrenzt. Sowohl durch Bindung von CCK an den CCK_A -Rezeptor als auch durch Stimulation des M_3 -Muskarinrezeptors durch Ach, kommt es zur Aktivierung der PLC, was in der Bildung von IP_3 und DAG resultiert. IP_3 stimuliert wiederum die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER und DAG aktiviert die PKC. Bei Stimulation im physiologischen Bereich kommt es dadurch zu Ca^{2+} -Oszillationen, was zu einer rhythmischen Aktivierung der Calmodulin-abhängigen Proteinkinase führt und somit die Enzym-Sekretion aus den Granula der Azinus-Zellen frequenzabhängig anregt. Die Freisetzung der Enzyme erfolgt dabei durch Exozytose in das Lumen der Azini. Käme es bei diesem Prozess zu einer dauerhaften Ca^{2+} -Freisetzung, würde die Enzym-Sekretion letztlich gehemmt werden, da die Architektur des Zytoskeletts zerstört würde [22, 52, 96, 103]. Über das Ausführungssystem werden diese Enzyme schließlich als Verdauungssaft zusammen mit Wasser und HCO_3^- in das Duodenum abgegeben. Um während dieses Prozesses einen Selbstverdau durch die Verdauungsenzyme zu vermeiden, besitzt das Pankreas einige Schutzmechanismen. Zum einen herrscht in den zymogenen Granula ein saurer pH, wodurch die Enzym-Aktivität gehemmt

wird. Weiterhin werden die Verdauungsenzyme als inaktive Vorstufen (Zymogene) in den Granula gespeichert. Eine Aktivierung erfolgt erst nachfolgend im Duodenum durch die Enteropeptidase, die Trypsinogen zu Trypsin aktiviert. Aktiviertes Trypsin kann wiederum die übrigen Zymogene aktivieren. Außerdem befinden sich in den Granula Trypsin-Inhibitoren, die bereits vorzeitig aktiviertes Trypsin hemmen sollen. Zuletzt können frühzeitig aktivierte Enzyme durch Nicht-Verdauungsproteasen erkannt und abgebaut werden [4, 96].

1.4.3 Pathophysiologische Bedeutung des exokrinen Pankreas

Eine lebensbedrohliche Erkrankung, die das exokrine Pankreas betrifft, ist die akute Pankreatitis. Im Zuge dieser kommt es zu einer Schädigung der Azini und damit zur vorzeitigen Aktivierung der Verdauungsenzyme. Die Folge davon ist eine enzymatische Selbstzerstörung des Pankreasgewebes. Bei Übergang ins Blut können die Enzyme dabei auch andere Organe, wie Lunge oder Niere schädigen. Zudem können Blutgefäße angedaut und Entzündungsmediatoren freigesetzt werden, wodurch es zu einem erhöhten Austritt von Flüssigkeiten aus dem Gefäßsystem kommt und somit die Gefahr eines hypovolämischen Schocks besteht. Charakteristische Symptome sind dabei starke Schmerzen im Oberbauch sowie Übelkeit, Erbrechen und Meteorismus. Im Serum können zudem die Lipase und die α -Amylase erhöht sein [4, 77]. Mögliche Auslöser der akuten Pankreatitis sind beispielsweise eine zu fettreiche Nahrung in Kombination mit chronischem Alkoholabusus. In den meisten Fällen liegt jedoch eine Behinderung des Abflusses des Verdauungssaftes über den Hauptausführungsgang vor, beispielsweise durch einen Gallenstein [15].

Neben der akuten Pankreatitis existiert eine chronische Form dieser Erkrankung, deren häufigste Ursache langjähriger Alkoholabusus ist. Die Azini werden dabei direkt durch den Alkohol und seine Abbauprodukte geschädigt. Weiterhin kommt es zu einer Veränderung der Zusammensetzung des Verdauungssaftes und damit zu einer Proteinpräzipitation in den Gangepithelien [15]. Die chronische Pankreatitis kann letztlich in einer Pankreasinsuffizienz enden, durch die Verdauungsenzyme nicht mehr ausreichend sezerniert und dadurch Nahrungsbestandteile nicht mehr ausreichend verdaut werden können. Dies hat eine starke Gewichtsabnahme der Patienten zur Folge. Dieses Verdauungsdefizit tritt allerdings erst bei einem Verlust von 80–90 % des Pankreasgewebes auf. Da zunächst vor allem die Verdauung der Lipide durch die Lipase eingeschränkt ist, kommt es initial häufig zu Fettstühlen [96].

Als weitere bedeutende Erkrankung des exokrinen Pankreas ist die zystische Fibrose zu nennen, die auch als Mukoviszidose bezeichnet wird. Es handelt sich dabei um eine Erbkrankheit, durch die es zu Defekten des CFTR-Kanals (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) kommt. Dieser stellt einen Chloridkanal dar, der auch den Transport anderer Ionen, wie HCO_3^- reguliert. Der CFTR-Kanal wird in der Plasmamembran Muzin bildender Epithelien von beispielsweise Pankreas und Lunge exprimiert. Bei Funktionsverlust gelangt weniger Cl^- und damit auch weniger Wasser in das Drüsenlumen. Dadurch kann Cl^- in den nachfolgenden Ausführungsgängen nicht ausreichend durch Transporter gegen HCO_3^- ausgetauscht werden, womit auch die HCO_3^- -Sekretion eingeschränkt ist. Die Folge ist zum einen eine verringerte Neutralisation der Magensäure, zum anderen bleiben die Pankreas-Enzyme, vor allem die Lipase, inaktiviert, was zu einer Verdauungsstörung und Fettstühlen führt. Weiterhin fehlt dem Pankreassekret Wasser, womit dieses sehr zähflüssig wird und die Ausführungsgänge verstopft. Folglich kommt es zu einer chronischen Entzündung des Pankreas, einer Atrophie der Azini sowie zu fibrotischen Vernarbungen des Pankreasgewebes [4, 77].

1.5 Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte unter anderem die Lokalisation von IRAG2 in Thrombozyten sowie im exokrinen Pankreas. Aufgrund der Homologie zwischen IRAG2 und IRAG1 sollte daraufhin untersucht werden, ob IRAG2 in diesen Geweben und Zellen mit den IP_3 -Rezeptoren interagiert und ob dieses – ebenso wie IRAG1 – über die PKGI phosphoryliert wird.

Mit Hilfe von IRAG2-KO Tieren sollte außerdem die physiologische Funktion von IRAG2 in Thrombozyten und im exokrinen Pankreas aufgeklärt werden. Dabei wurde in Thrombozyten der Einfluss von IRAG2 auf die Ca^{2+} -Freisetzung, die Thrombozytenaggregation sowie die NO/cGMP-abhängige Hemmung der Thrombozytenfunktion analysiert.

Das Ziel der Untersuchung des Pankreas war die Aufklärung der Rolle von IRAG2 bei der Ca^{2+} -Freisetzung sowie dessen Bedeutung für exokrine pankreatische Funktionen, wie der Amylase-Sekretion.

2 Materialien

2.1 Geräte

Alle verwendeten Geräte, die nicht zur Standardlaborausrüstung gehören, sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt (s. Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1: Verwendete Geräte

| Gerät | Bezeichnung | Hersteller/Lieferant |
|--|--|--|
| Aggregometer | Chrono-Log Aggregometer Modell 490 | Probe & Go Labordiagnostika GmbH |
| Detektionssystem (Western Blot) | ChemiDoc™ MP Imaging System | Bio-Rad Laboratories, Inc. |
| Elektrodenplatten (Western Blot) | Semi-Dry-Blotter MAXI | Carl Roth® GmbH |
| Elektrophoresekammer (Genotypisierung) | Casting System Compact Biometra | Biometra GmbH |
| Elektrophoresekammer (SDS-PAGE) | Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell | Bio-Rad Laboratories, Inc. |
| Gewebe-Homogenisator | Ultra-Turrax® | IKA®-Werke GmbH & Co. KG |
| Inkubator | CO-150 | New Brunswick Scientific Co., Inc. |
| Kamera-System | CoolSnap HQ CCD Kamera | Roper Scientific/ Visitron Systems |
| Kryotom | Leica CM3050S (AG Prof. Neumann, Neurobiologie) | Leica Biosystems |
| Mikroskope | Zeiss Primo Star | Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH |
| | Axio Observer.Z1 | Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH |
| | Axiovert S100 (AG Prof. Kunzelmann, Physiologie) | Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH |
| Mikrotiterplatten-Photometer | Tecan Sunrise Remote™ | Tecan Deutschland GmbH |
| | FLUOstar® Omega (AG Prof. Göpferich, Pharm. Technologie) | BMG Labtech GmbH |
| PCR Thermocycler | Biometra T1 Thermocycler | Biometra GmbH |
| Photometer | Eppendorf BioPhotometer® plus | Eppendorf AG |
| | Shimadzu™ Uvmini-1240 Model | Shimadzu Europa GmbH |
| Präparierbesteck | | Fine Science Tools GmbH |
| Polychromator-System | high-speed polychromator system | VisiChrome |

| | | |
|--------------------------------------|------------------------------------|--|
| Reinstwasser- Aufbereitungsanlage | arium® basic | Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG |
| Rotationsmikrotom | Microm HM355S | ThermoFisher Scientific |
| Schüttler | IKA® KS 260 Basic | IKA®-Werke GmbH & Co. KG |
| | IKA® HS 260 Basic | IKA®-Werke GmbH & Co. KG |
| | Sarstedt M 2000 | Sarstedt AG & Co. KG |
| Spiegelreflexkamera | EOS 1200D | Canon Inc. |
| Strom-/Spannungsquelle | Biometra PS 305 T | Biometra GmbH |
| | PowerPac™ 200 | Bio-Rad Laboratories, Inc. |
| Ultraschall-Homogenisator | Sonopuls UW 2070 | BANDELIN electronic GmbH & Co. KG |
| UV-Transluminator | Biometra TI 1 | Biometra GmbH, DE |
| Zentrifugen | Centrifuge 5415D | Eppendorf AG |
| | Centrifuge 5417R | Eppendorf AG |
| | Kühlzentrifuge, Mikro 220R | Hettich Zentrifugen |
| | Heraeus Multifuge 1 L-R | Heraeus |
| | Zentrifuge mit Vortexer, CM-70M | neoLab Migge GmbH |

2.2 Software

Tabelle 2.2: Verwendete Software

| Software | Hersteller |
|---------------------------------------|--|
| Aggro/Link Version 5.1 | Chrono-log Corporation |
| Axio Vision Release 4.8 | Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH |
| BioDocAnalyze 2.67.5.0 | Biometra GmbH |
| GraphPad Prism 5.01 | GraphPad Software, Inc. |
| Image Lab 6.1.0 | Bio-Rad Laboratories, Inc. |
| Magellan 5 | Tecan Deutschland GmbH |
| MARS 2.4.1 | BMG Labtech GmbH |
| MetaFluor 6.2r6 | Universal Imaging |
| MetaMorph 7.7 | Molecular Devices GmbH |
| Microsoft Office | Microsoft Corporation |
| Omega 3.00 R2 (Firmware Version 1.41) | BMG Labtech GmbH |

2.3 Antikörper

Die für Western Blot (WB) (s. 3.4.5), (Co)-Immunpräzipitation (s. 3.4.3) und Immunhistochemie (IHC) (s. 3.9.4) verwendeten primären Antikörper sind in Tabelle 2.3 gelistet. Die sekundären Antikörper sind in Tabelle 2.4 aufgeführt.

Tabelle 2.3: Verwendete Primärantikörper

| Antikörper | Spezies | Verwendung | Verdünnung | Blockier-Lösung | Hersteller |
|-------------------------------------|-----------|------------|------------|------------------|---|
| Anti-Amylase | Maus | WB | 1:1000 | 5 % Milch | SantaCruz-Biotechnology (#sc-46657) |
| | | IHC | 1:200 | 10 % Horse-Serum | |
| Anti- β -Galactosidase | Huhn | WB | 1:1000 | 5 % Milch | Abcam (#ab9361) |
| Anti-GAPDH | Kaninchen | WB | 1:1000 | 5 % Milch | Cell Signaling Technology (#2118) |
| Anti-IRAG1 (91) | Kaninchen | WB | 1:200 | 5 % Milch | AG Schlossmann |
| Anti-IRAG2 (=Anti-LRMP C-terminal) | Kaninchen | WB | 1:1000 | 5 % Milch | Sigma-Aldrich® (#SAB1306900) |
| Anti-IP ₃ R1 | Kaninchen | WB | 1:1000 | 5 % Milch | Novusbio (#NBP1-21398) |
| Anti-IP ₃ R2 | Ziege | WB | 1:200 | 3 % BSA | SantaCruz-Biotechnology (#sc-7278) |
| Anti-IP ₃ R3 | Maus | WB | 1:100 | 5 % Milch | BD Transduction Laboratories™ (#610313) |
| Anti-PKGI β (104-5) | Kaninchen | WB | 1:200 | 5 % Milch | AG Schlossmann |
| Anti-Phospho-(Ser/Thr) PKA Substrat | Kaninchen | WB | 1:1000 | 5 % Milch | Cell Signaling Technology (#9621) |

Tabelle 2.4: Verwendete Sekundärantikörper

| Antikörper | Spezies | Verwendung | Verdünnung | Hersteller |
|---------------------------------|---------|------------|------------|-----------------------------------|
| Anti-Ziege (HRP-gekoppelt) | Esel | WB | 1:10000 | Dianova GmbH (#705-035-003) |
| Anti-Huhn (HRP-gekoppelt) | Ziege | WB | 1:5000 | Dianova GmbH (#DAB87304) |
| Anti-Maus (HRP-gekoppelt) | Ziege | WB | 1:10000 | Sigma-Aldrich® (#A4416) |
| Anti-Kaninchen (HRP-gekoppelt) | Ziege | WB | 1:10000 | Dianova GmbH (#111-035-003) |
| Anti-Maus (Alexa 647-gekoppelt) | Esel | IHC | 1:200 | ThermoFisher Scientific (#162542) |

2.4 Allgemeines Verbrauchsmaterial und versuchsspezifische Materialien

2.4.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten gängigen Verbrauchsmaterialien oder Standardlaborchemikalien wurden, sofern nicht gesondert aufgeführt, von folgenden Firmen bezogen:

- AppliChem GmbH
- Carl Roth® GmbH & Co. KG
- Fluka Chemie AG
- Gerbu Biotechnik GmbH
- Merck KgaA
- Sarstedt AG & Co. KG
- Sigma Aldrich® Chemie GmbH
- ThermoFisher Scientific
- VWR International

2.4.2 Genotypisierung

Die für die Genotypisierung (s. 3.2) verwendeten Substanzen und Materialien sind in Tabelle 2.5 aufgeführt, während die verwendeten Primer in Tabelle 2.6 gelistet sind.

Tabelle 2.5: Verwendete Substanzen und Materialien für die Genotypisierung

| Produkt | Hersteller/Lieferant |
|---|-------------------------|
| PCR Reaktionspuffer | Sigma-Aldrich® |
| Biozym LE Agarose | Biozym Scientific GmbH |
| dNTP Set 100 mM | ThermoFisher Scientific |
| GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Größenstandard) | ThermoFisher Scientific |
| MIDORI Green Advance | NIPPON Genetics EUROPE |
| ROTI® Load DNA (Gelladepuffer) | Carl Roth® GmbH |
| Taq DNA Polymerase | Sigma-Aldrich® |
| Titriplex® III (EDTA) | Merck KgaA |
| Trizma®-Base (Tris) | Sigma-Aldrich® |

Tabelle 2.6: Verwendete Primer für die Genotypisierung

| Primer | Sequenz |
|-------------------------|--------------------------------|
| Primer LRMP Wt+Ko | 5'-AGTTTAGGCTAGTATGGGC-3' |
| Primer Jaw1 forcritical | 5'-CAGAACCACAGAAAACGGAGG-3' |
| Primer Jaw1 reverse | 5'-TTATTATAGTCAACTCTCCATTTC-3' |
| Primer Jaw1 forward | 5'-GTTGTTAACTTGTTTATTGCAGCT-3' |

2.4.3 Organentnahmen und proteinbiochemische Methoden

Tabelle 2.7: Verwendete Substanzen und Materialien für die Organentnahme

| Produkt | Hersteller/Lieferant |
|--|--|
| Acrylamid-Lösung 40 % (AA) | Sigma-Aldrich® |
| Ammoniumperoxodisulfat (APS) | VWR Life Science |
| Benzamidin | Nacalai Tesque, Inc. |
| Bio-Rad DC Protein Assay (Lowry) | Bio Rad Laboratories, Inc. |
| biostep® Glasplatte | biostep® GmbH |
| biostep® Glasplatte mit 0,75 mm Spacer | biostep® GmbH |
| Bovines Serumalbumin (BSA) | Gerbu Biotechnik GmbH |
| Clarity™ Western ECL Substrate | Bio Rad Laboratories, Inc. |
| Leupeptin | Carl Roth® GmbH |
| Magermilchpulver | J.M. Gabler-Saliter Milchwerk GmbH & Co.KG |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) ultrapure | AppliChem GmbH |
| Nonaethylene glycol monododecyl ether (Lubrol) | Sigma-Aldrich® |
| N,N'-Methylenbisacrylamid (BisAA) | Fluka Chemie GmbH |
| PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder | ThermoFisher Scientific |
| PageRuler™ Unstained Protein Ladder | ThermoFisher Scientific |
| Paraformaldehyd (PFA) | Sigma-Aldrich® |
| Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) | Sigma-Aldrich® |
| PhosSTOP™ | Roche Diagnostics GmbH |
| Ponceau S | Sigma-Aldrich® |
| Protein A Sepharose® 4, Fast Flow aus <i>Staphylococcus aureus</i> | Sigma-Aldrich® |
| Transfermembran ROTI® PVDF 0.45 | Carl Roth® GmbH |
| Whatman™ Chromatographie Papier | GE Healthcare Life Sciences |

2.4.4 Analyse von Thrombozyten

Materialien, die zur Isolation von Thrombozyten (s. 3.5.1), zur Messung der Ca²⁺-Freisetzung in Thrombozyten (s. 3.5.5), zur Thrombozytenaggregation (s. 3.5.4) sowie für die *in vitro* und *ex vivo* Phosphorylierung (s. 3.5.2 und 3.5.3) verwendet wurden, sind in Tabelle 2.8 aufgelistet.

Tabelle 2.8: Verwendete Substanzen und Materialien für die Analyse von Thrombozyten

| Produkt | Hersteller/Lieferant |
|--|------------------------------------|
| 5 ml Polypropylen Röhrchen | Greiner Bio One International GmbH |
| 8-Br-cGMP | BIOLOG Life Science Institute |
| 8-pCPT-cGMP | BIOLOG Life Science Institute |
| Alsever's Lösung | Sigma-Aldrich® |
| BD Plastipak™ 3 ml Luer-Lock Spritzen | BD Bioesciences |
| Corning™ 96-Well weiße Polystyrol-Mikrotiterplatte | ThermoFisher Scientific |
| Distanzstücke Aggregometer (Gummi) | Probe & Go Labordiagnostika GmbH |
| Fura-2 Acetoxymethylester (Fura-2-AM) | Biomol GmbH |
| Glasküvetten Aggregometer (450 µl) | Probe & Go Labordiagnostika GmbH |
| Kollagen [1 mg/ml] | Probe & Go Labordiagnostika GmbH |
| Neolus Kanüle 0,5 × 6mm 25G | Terumo® Deutschland GmbH |
| Nitroprussid-Natrium (SNP) | Merck KgaA |
| PhosSTOP™ | Roche Diagnostics GmbH |
| Rührstäbchen für den Einmalgebrauch (silikonisiert) für Glasküvetten | Probe & Go Labordiagnostika GmbH |
| Thrombin human [10E] | Probe & Go Labordiagnostika GmbH |
| Zählkammer Neubauer Improved Brightline | LO-Laboroptik |

2.4.5 Blutabnahme aus dem retrobulbären Plexus und Bestimmung der Amylase-Aktivität

Tabelle 2.9: Verwendete Substanzen und Materialien für die Gewinnung von Blut aus dem retrobulbären Plexus sowie zur Bestimmung der Amylase-Aktivität

| Produkt | Hersteller/Lieferant |
|---|----------------------|
| Amylase Assay Kit (#ab102523) | Abcam |
| Heparinisierte Microvetten® CB 300LH | Sarstedt AG & Co. KG |
| Mikrohämatokrit-Kapillare (heparinisiert) | BRAND GMBH + CO KG |

2.4.6 Analyse von pankreatischen Azini

Die zur Isolation von Azini (s. 3.8.1), zur Bestimmung der Amylase-Sekretion (s. 3.8.2) und für die Ca²⁺-Freisetzung in Azini (s. 3.8.3) verwendeten Materialien sind in Tabelle 2.10 gelistet.

Tabelle 2.10: Verwendete Substanzen und Materialien zur Analyse pankreatischer Azini

| Produkt | Hersteller/Lieferant |
|---|-------------------------------------|
| BD Microlance™ 3 (27G, 0,4 × 19 mm) Kanülen | BD Biosciences |
| Bovines Serumalbumin (BSA) | Gerbu Biotechnik GmbH |
| Braun Injekt® 5 ml Luer Solo Spritzen | B. Braun SE |
| Carbamoylcholinchlorid (Carbachol) | Sigma-Aldrich® |
| Corning® Matrigel® Basement Membrane Matrix | Corning®, Inc. |
| Corning® Nylon Filter 100 µm (Zellsieb) | Corning®, Inc. |
| Deckgläschen rund 18 mm Borosilikatglas | VWR International |
| Fura-2 Acetoxymethylester (Fura-2-AM) | Biomol GmbH |
| Kollagenase Typ II | Worthington Biochemical Corporation |
| Korasilon-Paste mittelviskos | Kurt Obermeier GmbH & Co. KG |
| L-Glutamin 200 mM | Merck KgaA |
| Nicht essentielle Aminosäuren-Lösung (MEM) 100× | Sigma-Aldrich® |
| Phadebas® Amylase Test | Phadebas® AB |
| Pluronic® F 127 | Sigma-Aldrich® |
| Rundfilterpapier 595 19 mm | Schleicher & Schuell GmbH |
| Trypsin-Inhibitor (soybean) | SantaCruz-Biotechnology |

2.4.7 Histologie

Tabelle 2.11: Verwendete Substanzen und Materialien für histologische Untersuchungen

| Produkt | Hersteller/Lieferant |
|---|----------------------------|
| 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid (X-Gal) | GERBU Biotechnik GmbH |
| Bovines Serumalbumin (BSA) | Gerbu Biotechnik GmbH |
| Dako Glycergel® Mounting Medium | Agilent Technologies |
| Deckgläser rechteckig (Glas), 24 × 50 mm | VWR International |
| DePeX Mounting Medium | SERVA Electrophoresis GmbH |
| Einbettformen Macro | Carl Roth® GmbH |
| Einbettkassetten Macrosette™ | Carl Roth® GmbH |
| Embedding Ring (Einbettring) | Simport® Scientific Inc. |
| Eosin Y | Sigma-Aldrich® |
| Färbetrog | VWR International |
| Färbezylinder | VWR International |
| Formaldehyd-Lösung 37 % | Merck KgaA |
| Gibco™ Horse Serum hitzeinaktiviert | ThermoFisher Scientific |
| Hämatoxylin Lösung | Carl Roth® GmbH |
| High Profile Microtome Blades (Klingen Kryotom) | Leica Biosystems |
| ImmEdge™ Hydrophobic Barrier Pen | Vector Laboratories |
| Kernechtrot-Aluminiumsulfat-Lösung 0,1 % | Merck KgaA |
| Microm SEC35™ (Klingen Mikrotom) | ThermoFisher Scientific |

| | |
|---|----------------------------|
| Objektträger Polylysine [®] | ThermoFisher Scientific |
| Objektträger Superfrost Plus [®] | ThermoFisher Scientific |
| Paraplast X-TRA [®] (Paraffin) | Sigma-Aldrich [®] |
| PBS Tablette | Sigma-Aldrich [®] |
| Tissue-Tek [®] O.C.T. Compound | A. Hartenstein GmbH |

3 Methoden

3.1 Tierhaltung

3.1.1 Haltung von Mäusen

Alle für diese Arbeit verwendeten Tiere wurden in den Zentralen Tierlaboratorien (ZTL) der Universität Regensburg gemäß den Richtlinien der *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA) in der konventionellen Haltung am Standort Vorklinikum gezüchtet und gehalten. Die Zucht und Haltung der Tiere wurde durch die zuständige Überwachungsbehörde (Regierung von Unterfranken) genehmigt (DMS 2532-2-326) und erfolgte unter Einhaltung aller tierschutzrechtlicher Vorgaben gemäß des Tierschutzgesetzes. In den Haltungsräumen erfolgte ein Lichtprogramm von 12 Stunden hell und 12 Stunden dunkel im Wechsel. Die Temperatur lag bei $21\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von $50\% \pm 10\%$ sowie einer Luftwechselrate von $> 8\text{ AC/h}$. Gehalten wurden die Tiere in Macrolon Käfigen Typ II und Typ III, wobei die Typ II-Käfige mit maximal fünf und die Typ III-Käfige mit maximal acht Tieren besetzt waren. Den Tieren standen über den gesamten Haltungszeitraum Futter und Wasser *ad libitum* zur Verfügung.

3.1.2 Zucht von *Irag2*-defizienten Mäusen

Die Zucht *Irag2*-defizienter Mäuse erfolgte in Anlehnung an *Chang et al.* [23]. In der vorliegenden Arbeit wurde mit zwei verschiedenen IRAG2-Knockout (KO) Mauslinien gearbeitet, die mittels Cre/loxP und Flp/FRT System generiert wurden [30, 84, 91]. Im Ursprungsvektor für beide Mauslinien wird das Exon 8 des murinen *Irag2*-Gens von zwei loxP-Sequenzen flankiert. Diese dienen als Erkennungsstellen für die *cyclization recombination* (Cre)-Rekombinase [84, 91]. Zudem ist eine loxP-Neomycin-Resistenzkassette und das *lacZ*-Gen, das zusammen mit der Neomycin-Resistenzkassette von einer FRT-Sequenz flankiert ist, enthalten (s. Abbildung 3-1). Die FRT-Sequenzen dienen dabei als Erkennungssequenzen für die Flippase (Flp)-Rekombinase [30, 84], während die *lacZ*-Sequenz für eine β -Galactosidase kodiert, die unter Kontrolle des *Irag2*-Promotors exprimiert wird. Der Ursprungsvektor wurde von der Firma EUCOMM generiert (Klon-ID: EPD0371_2_G01 und B04) und daraus JM8A1.N3 ES-Zellen hergestellt. Durch die Firma Polygene (Rümlang, Schweiz) wurden die ES-Zellen, die diesen Vektor enthielten, in C57Bl/6 Blastozyten injiziert und schließlich in

Empfängermäuse transferiert. Die daraus resultierende heterozygote, „geflochte“ Maus wurde in den Tierlaboratorien der Universität Regensburg zu einer homozygoten Maus weitergezüchtet. Alle weiteren Zuchtschritte, die in den jeweiligen IRAG2-Knockout und Wildtyp (WT)-Varianten resultierten, erfolgten ebenso in den Tierlaboratorien der Universität Regensburg.

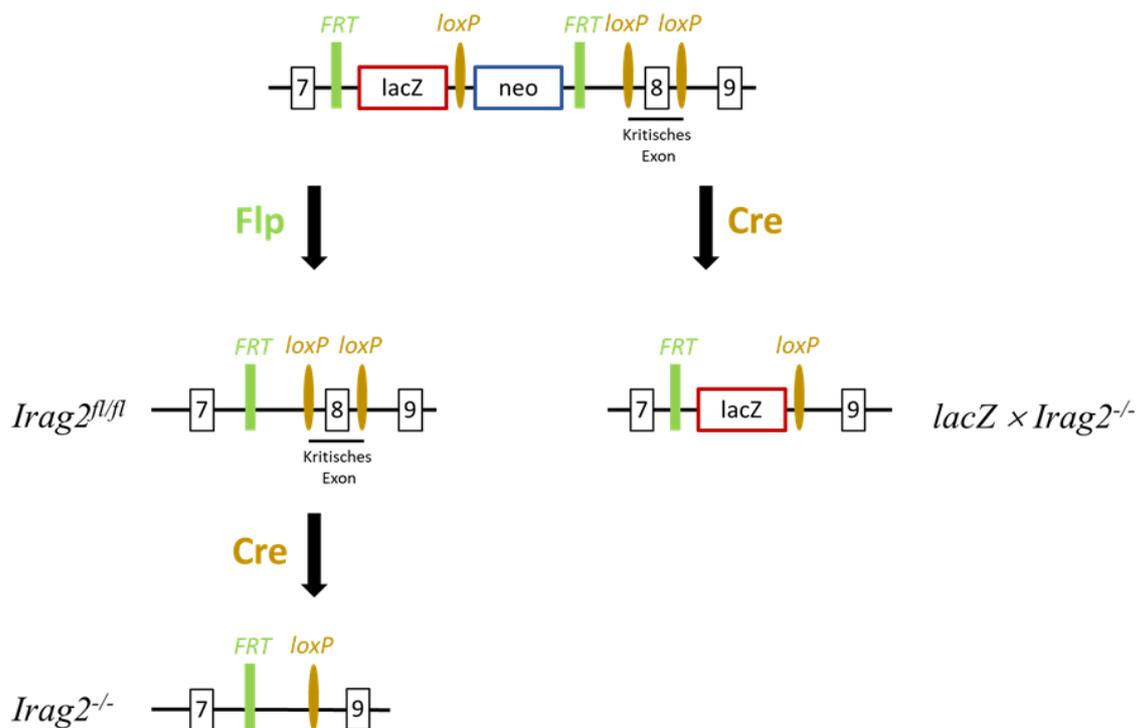


Abbildung 3-1: Generierung der beiden IRAG2-Knockout Mauslinien

Cre: *cyclization recombination* (Cre-Rekombinase)-Maus; Flp: Flippase-Rekombinase (Flp-Rekombinase)-Maus; loxP: Erkennungsstelle für die Cre-Rekombinase; FRT: Erkennungsstelle für die Flp-Rekombinase; neo: Neomycin-Resistenzkassette; lacZ: *LacZ*-Gen, das für die β -Galactosidase kodiert; kritisches Exon 8: Exon, welches das *Irag2*-Gen enthält. Die weitere Beschreibung erfolgt im Text.

Kreuzt man nun die Maus, die den ursprünglichen Vektor enthält, mit einer CMV-Cre-Maus, die die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Cytomegalovirus (CMV)-Promotors ubiquitär exprimiert [113], wird sowohl die Neomycin-Resistenzkassette als auch das kritische Exon 8 deletiert, jedoch nicht das *lacZ*-Gen. Eine Deletion des markierten Exon 8 führt dabei zu einer Frameshift-Mutation, wodurch ein funktionsloses IRAG2 entsteht. Diese Verpaarung resultiert somit in einer *lacZ × IRAG2-KO* Maus (Genotyp: *lacZ × Irag2^{-/-}*), bei der unter Kontrolle des *Irag2*-Promotors eine β -Galactosidase exprimiert wird. Verpaart man die Ursprungsm Maus jedoch zunächst mit einer Flp-Maus, die ubiquitär die Flp-Rekombinase exprimiert, so erhält man die *IRAG2^{fl/fl}* Maus, da sowohl das *lacZ*-Gen als auch die Neomycin-Resistenzkassette

deletiert werden. Diese Maus wurde für den weiteren Verlauf der Arbeit als „gefloxte“ Wildtyp-Maus angesehen. Wird die IRAG2^{fl/fl} Maus nachfolgend mit einer CMV-Cre-Maus verpaart, so entsteht die IRAG2-KO Maus (Genotyp: *Irag2*^{-/-}). Diese Maus enthält kein *lacZ*-Gen mehr und exprimiert damit keine β -Galactosidase (s. Abbildung 3-1).

Für die Zuchten wurden jeweils zwei heterozygote Weibchen mit einem heterozygoten Männchen in einem Macrolon Typ III-Käfig verpaart. Die Nachkommen wurden ab einem Alter von 21 Tagen von den Elterntieren abgesetzt, nach Geschlechtern getrennt und mittels Ohrlochung gekennzeichnet. Die Genotypisierung der Tiere erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ausgehend von den gewonnenen Ohrbiopsien (s. 3.2). Für die Versuche wurden sowohl männliche als auch weibliche IRAG2-Knockout Tiere (IRAG2-KO und *lacZ* × IRAG2-KO, Genotypen: *Irag2*^{-/-} und *lacZ* × *Irag2*^{-/-}) oder IRAG2-Wildtyp Tiere (IRAG2-WT, Genotypen: *Irag2*^{fl/fl} und *Irag2*^{+/+}) ab einem Mindestalter von 10 Wochen verwendet. Die Verwaltung, Dokumentation und Austragung aller Tiere erfolgte dabei über die Software TiBUR. Die interne Bezeichnung der *lacZ* × IRAG2-KO Mauslinie in TiBUR lautete „Jaw1-KO (alt)“ und die der IRAG2-KO Mauslinie „Jaw1-KO (neu)“.

3.1.3 Bestimmung der Mausgewichte

Männliche sowie weibliche Nachkommen der IRAG2-KO Mauslinie (Genotyp KO: *Irag2*^{-/-}, Genotyp WT: *Irag2*^{fl/fl}) erhielten ab einem Alter von 10 Tagen nach der Geburt einen nummerierten Ohrclip, der zur Identifizierung der Tiere diente. Ab diesem Tag wurden die Mäuse alle zwei bis drei Tagen gewogen und das Gewicht der IRAG2-WT und IRAG2-KO Tiere bis zum Absetzalter sowie 10-15 Tage darüber hinaus bestimmt. Die Genotypisierung der entsprechenden Tiere erfolgte nach dem Absetzen aus dem Elternkäfig (s. 3.2).

3.2 Genotypisierung der Versuchstiere

Die Bestimmung des Genotyps der Versuchstiere erfolgte mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*; PCR) anhand der Ohrlochbiopsien. Diese Biopsien wurden bei der Ohrlochmarkierung der Tiere nach dem Absetzen (s. 3.1.2) gewonnen. Aus dem gewonnenen Material musste zunächst die Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*; DNA) isoliert und mittels PCR amplifiziert werden. Anschließend wurde die DNA elektrophoretisch in einem Agarose-Gel aufgetrennt.

3.2.1 Gewinnung genomischer DNA aus Biopsien

Die Isolation der DNA aus den Biopsien erfolgte im alkalischen Milieu unter Verwendung von Natronlauge. Dabei wurden 25 µl 1× Lysepuffer zu dem aus der Ohrlochung gewonnenen Material gegeben, das sich in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß befand. Der Reaktionsansatz wurde für eine Stunde bei 95 °C lysiert und durch Zugabe von 25 µl 1× Tris-Puffer pH 5,5 neutralisiert. Nach anschließender Zentrifugation bei 15000 × g zur Abtrennung von nicht lysierten Gewebeteilen wurde der Überstand, der die DNA enthält, in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

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 | |
| Einstellen auf pH 5,5 | | |

Tris-Puffer pH 5,5 1×: 1:10 verdünnen

3.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion ist es möglich, ausgewählte DNA-Abschnitte zu vervielfältigen und somit die Existenz bestimmter Gene im Genom einer Probe nachzuweisen [89]. Durch zwei Primer kann dabei ein DNA-Abschnitt eingegrenzt und mit Hilfe einer Polymerase der komplementäre Strang dazu gebildet werden. Die PCR läuft in mehreren Schritten ab. Zunächst muss die doppelsträngige DNA auf 94 °C erhitzt werden, sodass die Wasserstoffbrücken zwischen den Basenpaaren gespalten werden und die DNA einzelsträngig vorliegt. Hier wird im ersten Zyklus oft länger erhitzt als in den darauf folgenden Zyklen, um sicherzustellen, dass sich sowohl die Primer als auch die DNA-Doppelstränge vollständig voneinander trennen und nur noch Einzelstränge vorliegen. Dieser Vorgang wird auch als Initialisierung bezeichnet. Im nächsten Schritt findet das sogenannte *Annealing* statt, bei dem die beiden Primer an die jeweiligen Sequenzen der DNA hybridisieren. Der Forward-Primer hybridisiert dabei an das 3'-Ende des DNA-Abschnitts auf dem codierenden Strang, während der Reverse-Primer an die entsprechende Sequenz des komplementären Strangs bindet. Nachfolgend schließt sich die Elongation an, bei der mit Hilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase, ausgehend von den Primern und unter Verbrauch von Desoxyribonukleotiden

(dNTPs), die komplementären DNA-Stränge gebildet werden. Die notwendigen Temperaturen für die einzelnen Schritte hängen von den verwendeten Primern sowie der verwendeten DNA-Polymerase ab. Dieser gesamte Zyklus wird so lange wiederholt, bis der zu untersuchende DNA-Abschnitt ausreichend amplifiziert ist und somit nachgewiesen werden kann.

Zur Durchführung der PCR wurde zunächst ein Mastermix hergestellt, der gemäß folgendem Schema pipettiert wurde:

Mastermix für die Genotypisierung der lacZ × IRAG2-KO Mauslinie (Jaw1 KO (alt))

| Substanz | Volumen [µl] |
|------------------------------|--------------|
| H ₂ O (PCR-grade) | 18,8 |
| 10× PCR Puffer | 2,5 |
| dNTP-Mix | 0,5 |
| Primer Jaw1 forward | 0,3 |
| Primer Jaw1 forcritical | 0,3 |
| Primer Jaw1 reverse | 0,3 |
| Taq DNA-Polymerase 5 U/µl | 0,3 |

Mastermix für die Genotypisierung der IRAG2-KO Mauslinie (Jaw1 KO (neu))

| Substanz | Volumen [µl] |
|------------------------------|--------------|
| H ₂ O (PCR-grade) | 18,8 |
| 10× PCR Puffer | 2,5 |
| dNTP-Mix | 0,5 |
| Primer LRMP Wt+Ko | 0,3 |
| Primer Jaw1 forcritical | 0,3 |
| Primer Jaw1 reverse | 0,3 |
| Taq DNA-Polymerase 5 U/µl | 0,3 |

dNTP-Mix

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

Aliquotieren, Lagerung bei -20 °C

H₂O (PCR-grade)

| | |
|--------------------|---------------------|
| ddH ₂ O | 1. Autoklavieren |
| | 2. Sterilfiltrieren |

Zu dem jeweiligen Mastermix wurden in einem 0,2 ml Reaktionsgefäß 2 µl der isolierten DNA hinzugefügt (s. 3.2.1). Um Verunreinigungen auszuschließen, wurde eine Negativkontrolle durchgeführt, bei der statt der DNA 2 µl H₂O (PCR-grade) zu dem Mastermix gegeben wurden. Als Positivkontrollen wurde für die lacZ × IRAG2-KO Mauslinie die DNA einer *Irag2*^{+/+}, einer *lacZ* × *Irag2*^{-/-} sowie einer *lacZ* × *Irag2*^{+/-} Maus verwendet. Für die IRAG2-KO Mauslinie dienten die DNA einer *Irag2*^{fl/fl}, einer *Irag2*^{fl/-} sowie einer *Irag2*^{-/-} Maus als Positivkontrollen.

Die Kontrollen wurden jeweils in einem separaten Reaktionsgefäß durchgeführt, wobei jeweils 2 µl der Kontroll-DNA zum Mastermix hinzugefügt wurden.

Die Ansätze wurden kurz gemischt, zentrifugiert und anschließend in den Thermocycler gestellt. Die PCR lief nach folgenden, auf die einzelnen Mauslinien angepassten, Amplifizierungs-Protokollen ab:

Amplifizierungsprotokoll der lacZ × IRAG2-KO Mauslinie (Jaw1-KO (alt))

| Phase | Temperatur [°C] | Dauer | Zyklen |
|--------------------|-----------------|-------|--------|
| 1. Aufheizen | 80 | Pause | |
| 2. Initialisierung | 95 | 3 min | |
| 3. Denaturierung | 95 | 30 s | 35× |
| 4. Annealing | 57 | 30 s | |
| 5. Elongation | 72 | 30 s | |
| 6. Elongation | 72 | 5 min | |
| 7. Lagerung | 4 | Pause | |

Amplifizierungsprotokoll der IRAG2-KO Mauslinie (Jaw1-KO (neu))

| Phase | Temperatur [°C] | Dauer | Zyklen |
|--------------------|-----------------|-------|--------|
| 1. Aufheizen | 80 | Pause | |
| 2. Initialisierung | 95 | 3 min | |
| 3. Denaturierung | 95 | 45 s | 35× |
| 4. Annealing | 58 | 45 s | |
| 5. Elongation | 72 | 60 s | |
| 6. Elongation | 72 | 5 min | |
| 7. Lagerung | 4 | Pause | |

Im Anschluss an die PCR wurden die Proben bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die in der PCR amplifizierte DNA-Abschnitte wurden zur Identifikation der Genotypen mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte dabei in einem 2%igem Agarose-Gel, an dem ein elektrisches Feld angelegt wurde. Aufgrund der negativen Ladung der Phosphatgruppen, die Bestandteil der DNA sind, können die PCR-Produkte zum Minuspol

wandern. Große Produkte wandern dabei langsamer als kleinere Produkte, wodurch eine Auftrennung anhand der Größe der PCR-Produkte möglich ist. Durch Zugabe von MIDORI Green, einem Fluoreszenzfarbstoff, der in die DNA interkaliert, konnten die PCR-Produkte unter UV-Licht detektiert werden. Um die Größe der erhaltenen Produkte zu bestimmen, wurde zusätzlich ein Größenstandard auf dem Gel aufgetragen.

Zur Herstellung der Agarose-Gele wurde der Ansatz in einem Erlenmeyerkolben eingewogen und in der Mikrowelle so lange erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Nachdem der Ansatz auf etwa 60 °C abgekühlt war, wurden 5 µl MIDORI Green zugegeben und gemischt. Die noch flüssige Agarose wurde anschließend zum Auspolymerisieren in einen Gelschlitten gegossen.

Zu den PCR-Proben und den Kontrollen (s. 3.2.2) wurden 5 µl des 3× Gelladepuffers gegeben und jeweils 14 µl aus diesen Ansätzen oder des Größenstandards in jeweils eine Geltasche pipettiert. Anschließend wurde das beladene Gel mit 1× TAE-Puffer überschichtet und für 35 min eine Spannung von 150 V angelegt. Nach Abschluss der Elektrophorese erfolgte die Auswertung des Gels unter UV-Licht mittels UV-Transluminator und der BioDocAnalyse Software.

Agarosegel 2 %

| Substanz | Menge | [c] |
|-----------------------------------|--------|-----|
| Agarose | 3 g | 2 % |
| 1× TAE-Puffer | 150 ml | |
| In der Mikrowelle erhitzen | | |

Gelladepuffer 3×

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

TAE-Puffer 50×

| Substanz | Menge | [c] |
|---|------------|-------|
| Tris | 242 g | 2 M |
| Essigsäure (c ≥ 99,8 %) | 57,1 ml | 5,7 % |
| EDTA 0,5 M pH 8,0 | 100 ml | 50 mM |
| ddH ₂ O | ad 1000 ml | |
| Einstellen mit Essigsäure auf pH 8,0 | | |

TAE-Puffer 1×: 1:50 verdünnen

3.3 Organentnahme

Zur Untersuchung der Funktion von IRAG2 im Pankreas wurden männliche sowie weibliche IRAG2-WT, IRAG2-KO und lacZ × IRAG2-KO Tiere ab einem Alter von 10 Wochen mittels zervikaler Dislokation getötet. Nach der Eröffnung des Abdomens wurden die Pankreata der Tiere entnommen, mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und für die entsprechenden Versuche vorbereitet. Zur Vorbereitung auf histologische Untersuchungen erfolgte nach der Organentnahme eine Fixierung für 24 h bei 4 °C in 1000 µl 3 % Paraformaldehyd (PFA)-Lösung und eine anschließende Lagerung in 10 ml 70 % Methanol bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung (s. 3.9). Für proteinbiochemische Methoden wurden die Organe in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Nutzung bei -80 °C gelagert (s. 3.4). Um pankreatische Azini zu isolieren, wurden die entnommenen Pankreata unter Verwendung von Kollagenase Typ II enzymatisch verdaut (s. 3.8.1).

Zur Isolation muriner Thrombozyten und zur Gewinnung von Blut aus dem retrobulbären Plexus wurden die Tiere mittels Inhalation von Kohlenstoffdioxid getötet. Sofort nachdem der Tod eingetreten war, erfolgte entweder eine Blutabnahme durch Punktion des retrobulbären Plexus (s. 3.6) oder zur Isolation der Thrombozyten eine Punktion des Herzens (s. 3.5.1).

PBS 10×

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

Einstellen auf pH 7,4

PBS 1×: 1:10 verdünnen

PFA-Lösung 3 %

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

Einstellen auf pH 7,4

3.4 Allgemeine proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Proteinisolierung aus Geweben/Thrombozyten/Azini

Um Proteine aus murinem Gewebe zu isolieren, wurden in das 2 ml Reaktionsgefäß, in welchem sich das Pankreas befindet (s. 3.3), 600 µl 2 % Lubrol-Lysepuffer hinzugefügt. Der verwendete Lysepuffer enthielt dabei sowohl Protease- als auch Phosphatase-Inhibitoren. Mittels Ultra-Turrax® wurden die Pankreata anschließend in den 2 ml Reaktionsgefäßen auf Eis homogenisiert. Für die Proteinisolierung aus Thrombozyten oder Azini wurden diese nach der Isolation (Thrombozyten: s. 3.5.1, Azini: s. 3.8.1) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 150 µl Lysepuffer versetzt und nachfolgend mit Hilfe eines Ultraschall-Homogenisators auf Eis lysiert. Die Zell- und Gewebe-Lysate wurden anschließend für 15 min mit $18000 \times g$ bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert und die Überstände in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde vor der Lagerung der Lysate bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ein Aliquot entnommen und die Proteinbestimmung nach Lowry durchgeführt (s. 3.4.2).

2 % Lubrolpuffer (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 | |
| Einstellen auf pH 8,0 Lagerung bei 4 °C | | |

2 % Lubrolpuffer (Lysepuffer)

| Substanz | Menge | [c] |
|--|---------|-----------|
| Benzamidin 100 mM | 50 µl | 1 mM |
| Leupeptin 1 mg/ml | 2,5 µl | 0,5 µg/ml |
| PhosSTOP 20× | 250 µl | 1× |
| PMSF 200 mM | 7,5 µl | 300 µM |
| Lubrolpuffer 2 % (Stamm- lösung) | ad 5 ml | |

Benzamidin (100 mM)

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

Leupeptin (1 mg/ml)

| Substanz | Menge | [c] |
|---|---------|---------|
| Leupeptin ·0,5H ₂ SO ₄ | 1 mg | 1 mg/ml |
| 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 | |

PhosSTOP 20×

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

3.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry

Um die Proteinkonzentration der Lysate (s. 3.4.1) zu bestimmen, wurde die Proteinbestimmung nach Lowry durchgeführt [75]. Die Gesamtreaktion beruht dabei auf zwei Schritten. Zunächst kommt es im ersten Schritt zur Bildung eines blau-violetten Komplexes zwischen den Peptidbindungen der Proteine und Cu²⁺-Ionen im alkalischen Milieu. Diese Reaktion wird als Biuretreaktion bezeichnet. Im nächsten Schritt werden die Cu²⁺-Ionen zu Cu⁺-Ionen reduziert, welche wiederum das gelbe Folin-Ciocalteau-Reagenz (Molybdän(VI)- und Wolfram(VI)-Heteropolysäuren) zu Molybdänblau reduzieren. Dieser Schritt führt zu einer Intensivierung der Blaufärbung. Zur Quantifizierung der Proteinmenge wird diese Blaufärbung photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595 \text{ nm}$ vermessen. Anhand einer Standardgeraden aus verschiedenen Konzentrationen bovinem Serumalbumin (BSA) ist es anschließend möglich, die Proteinkonzentrationen der jeweiligen Proben zu bestimmen. Die Durchführung der Proteinbestimmung erfolgte nach Anleitung des DC™ Protein Assay Kits I.

Zunächst wurden die BSA-Standards (125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml, 2000 µg/ml) und die Verdünnungen der Lysate hergestellt:

Probenverdünnungen Proteinbestimmung nach Lowry

| Lysate | Verdünnung |
|--------------|-------------|
| Thrombozyten | 1:10 – 1:20 |
| Azini | 1:10 – 1:30 |
| Pankreas | 1:30 – 1:50 |

Je 10 µl der Standards oder der verdünnten Proben sowie 10 µl ddH₂O, das bei der Vermessung am Photometer als Nullabgleich dient, wurden jeweils in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt. Von Reagenz A' wurden in jedes Reaktionsgefäß 50 µl hinzugegeben und dieses gut gemischt. Anschließend wurden zu allen Reaktionsgefäßen 400 µl Reagenz B zugefügt und nochmals gut durchmischt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei Raumtemperatur (RT)

erfolgte zunächst die Vermessung der Standards in aufsteigender Konzentration und nachfolgend die der Proben bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595$ nm gegen den Nullabgleich. Aus den gemessenen Werten der Standards wurde eine Standardgerade erstellt, bei der die Konzentration des Standards gegen die jeweilige Extinktion aufgetragen wurde. Anhand dieser Standardgeraden konnte die unbekannte Proteinkonzentration der verdünnten Probe berechnet werden.

Reagenz A'

| Substanz | Menge |
|-----------|------------|
| Reagenz A | 1 ml |
| Reagenz S | 20 μ l |

3.4.3 (Co)-Immunpräzipitation

Durch eine Immunpräzipitation ist es möglich Proteine anzureichern. Weiterhin können mit Hilfe der Co-Immunpräzipitation Protein-Protein-Wechselwirkungen analysiert werden und so Interaktionspartner von Proteinen identifiziert werden. Für das Verfahren der (Co)-Immunpräzipitation wird das Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion genutzt. Das zu analysierende Protein (Antigen) wird dabei, zusammen mit seinen Interaktionspartnern, über einen spezifischen Antikörper (AK) an eine stationäre Phase gebunden und anschließend von dieser eluiert. Als stationäre Phase können hier Sepharose-Beads verwendet werden, die mit Protein A beschichtet sind. Protein A wird aus der Zellwand von *Staphylococcus aureus* gewonnen und besitzt die Fähigkeit, Antikörper verschiedener Säugetierarten, vor allem der Klasse IgG zu binden.

Für die Analyse der Interaktionspartner von IRAG2 in Thrombozyten und Pankreas wurden 1000 μ g Thrombozyten-Lysat oder 1500 μ g Pankreas-Lysat verwendet. Die Ansätze wurden jeweils mit 2 μ l IRAG2-Antikörper (IRAG2-AK) versetzt und mit (Co)-Immunpräzipitationspuffer ((Co)-IP-Puffer) ad 500 μ l aufgefüllt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 90 min auf Eis. Für die Co-Immunpräzipitation von IRAG1 aus Thrombozyten wurden die Ansätze stattdessen mit 2 μ l IRAG1-Antikörper (IRAG1-AK) versetzt.

Die Immunpräzipitation von phosphoryliertem IRAG2 nach *in vitro* oder *ex vivo* Phosphorylierung von Thrombozyten erfolgte analog. Bei der *in vitro* Phosphorylierung (s. 3.5.2) wurden die phosphorylierten Lysate mit 300 μ l (Co)-IP-Puffer sowie mit 2 μ l IRAG2-AK versetzt. Bei der *ex vivo* Phosphorylierung (s. 3.5.3) wurden die erhaltenen Lysate mit

350 μ l (Co)-IP-Puffer und 2 μ l IRAG2-AK versetzt. Die Inkubation der Ansätze erfolgte ebenso für 90 min auf Eis.

Als Kontrollen der (Co)-Immunpräzipitation wurden folgende Ansätze pipettiert, die analog zu den zu untersuchenden Proben inkubiert wurden:

Kontroll-Ansätze der (Co)-Immunpräzipitation

| Bestandteil | Antikörper-Kontrolle | Lysat-Kontrolle | Beads-Kontrolle | Puffer-Kontrolle |
|----------------|----------------------|-----------------|-----------------|------------------|
| Lysat | - | + | - | - |
| Antikörper | + | - | - | - |
| (Co)-IP-Puffer | + | + | + | + |
| Beads | + | + | + | - |

Die Vorbereitung der Beads erfolgte während der Probeninkubation. Pro Ansatz wurden 15 μ l der Protein-A-Sepharose-Beads in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben, je dreimal mit 500 μ l Waschpuffer gewaschen und nachfolgend für 20 min bei 4 °C unter langsamer Rotation auf dem Überkopfschüttler mit 3 % BSA-Waschpuffer blockiert. Anschließend wurden die Beads nochmals dreimal mit je 500 μ l Waschpuffer gewaschen. Für das Waschen und das Blockieren der Beads erfolgte eine Zentrifugation für 60 s mit $105 \times g$ bei 4 °C.

Nach der 90-minütigen Inkubation der Ansätze wurden diese für 10 min mit $18000 \times g$ bei 4 °C zentrifugiert, die Überstände auf die Beads gegeben und diese über Nacht bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben für 60 s mit $105 \times g$ bei 4 °C zentrifugiert und die Überstände verworfen. Die Beads wurden erneut dreimal mit je 500 μ l Waschpuffer gewaschen und anschließend die gebundenen Proteine eluiert. Die Elution erfolgte durch Zugabe von 25 μ l $2 \times$ Laemmli-Puffer und dreiminütigem Erhitzen bei 94 °C. Nach Zentrifugation der Beads bei $960 \times g$ für 5 min, wurde der erhaltene Überstand mittels SDS-Page (s. 3.4.4) analysiert.

Waschpuffer

| Substanz | Menge | [c] |
|--------------------|------------|--------|
| Tris | 6,057 g | 50 mM |
| EGTA | 5,705 g | 15 mM |
| NaCl | 5,844 g | 100 mM |
| Triton X-100 | 1 ml | 0,1 % |
| ddH ₂ O | ad 1000 ml | |

Einstellen auf pH 7,5

*(Co)-Immunpräzitationspuffer
(Co)-IP-Puffer)*

| Substanz | Menge | [c] |
|----------------------|---------|---------|
| Benzamidin 100 mM | 100 µl | 2,5 mM |
| Leupeptin 1 mg/ml | 4 µl | 1 µg/ml |
| PMSF 200 mM | 12 µl | 0,6 mM |
| PhosSTOP 20× | 160 µl | 0,8× |
| DTT 100 mM | 40 µl | 1 mM |
| Waschpuffer | ad 4 ml | |

Herstellung Benzamidin 100 mM, Leupeptin 1 mg/ml, PMSF 200 mM, PhosSTOP 20×: s. 3.4.1

3 % BSA-Waschpuffer (Blockier-Lösung)

| Substanz | Menge | [c] |
|-------------|--------|-----|
| BSA | 150 mg | 3 % |
| Waschpuffer | 5 ml | |

DTT (100 mM)

| Substanz | Menge | [c] |
|--------------------------------------|----------|--------|
| DTT | 15,43 mg | 100 mM |
| ddH ₂ O (autoklaviert) | 1 ml | |

Laemmli-Puffer 2×

| Substanz | Menge |
|---------------------------|--------|
| Harnstoff | 28,8 g |
| SDS | 1,5 g |
| DTT | 1,8 g |
| Tris-Lösung 1 M pH 8,0 | 1,5 ml |
| Glycerol 50 % | 6,0 ml |
| Bromphenol- blau | 6 mg |
| ddH ₂ O | 27 ml |

3.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit dem von Ulrich Laemmli entwickelten Verfahren der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist es möglich, Proteine anhand ihrer Größe im elektrischen Feld aufzutrennen [72]. Dabei werden zur Auftrennung der Proteine Polyacrylamidgele verwendet, die aus zwei Schichten bestehen und durch Vernetzung aus

Acrylamid (AA) und Bisacrylamid (BisAA) unter Zugabe des Radikalstarters Ammoniumperoxodisulfat (APS) entstehen. Das Sammelgel dient dabei dem Sammeln und der Aufkonzentrierung der Proben. Im Trenngel, welches sich unter dem Sammelgel befindet, ist die Porengröße enger und es findet die eigentliche Auftrennung der Proteine statt. Durch die Änderung des Vernetzungsgrades von Acrylamid und Bisacrylamid lassen sich hier die Trenneigenschaften beeinflussen. Die Gele enthalten zudem SDS, das dazu dient, die Eigenladung der Proteine zu maskieren und somit eine negative Ladung der Proteine zu erzeugen. Dadurch bewegen sich die Proteine im elektrischen Feld Richtung Pluspol (Anode). Kleineren Proteinen ist es dabei möglich, weiter in Richtung Anode zu laufen, da diese die Poren des Polyacrylamidgels leichter durchdringen können als größere Proteine. Somit erfolgt die Auftrennung anhand der Größe der Proteine, unabhängig von deren Eigenladung. Dem Trenngel wird zusätzlich Trichlorethanol hinzugefügt. Wird das Gel am Ende der Elektrophorese mit UV-Licht bestrahlt, werden die Indolreste der Aminosäure Tryptophan, die in den Proteinen enthalten ist, durch den Trichlorethanol halogeniert. Dies ermöglicht später, nach dem erfolgtem Western Blot, eine Aufnahme der gesamten Menge an Protein einer Probe (Totalprotein) und dient somit der Quantifizierung aller in der Spur aufgetrennten Proteine. Das zu untersuchende Protein kann somit auf das Totalprotein der jeweiligen Spur normiert werden. Mit diesem Verfahren wird die Verwendung eines Housekeeper-Proteins umgangen, welches möglichen Schwankungen unterliegen könnte [70, 71].

Probenvorbereitung

Die zu untersuchenden Proben (s. 3.4.1) wurden mit ddH₂O und 6× Laemmli-Puffer so eingestellt, dass die Proteinmenge pro Auftragung – abhängig von Gewebe/Zelltyp und untersuchtem Protein – zwischen 50–70 µg betrug und der 6× Laemmli als 1× Laemmli vorlag. Das Probenvolumen betrug pro Geltasche 12 µl. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 95 °C denaturiert. Das im Laemmli-Puffer enthaltene Dithiothreitol (DTT) dient zur Denaturierung und Spaltung der Disulfidbrücken der Proteine. Zudem enthält der Laemmli-Puffer Bromphenolblau, wodurch die Visualisierung der Lauffront während der Gelelektrophorese ermöglicht wird. Des Weiteren ist Glycerol enthalten, welches die Auftragung der Proben erleichtert und diese besser in die Geltaschen absinken lässt.

Laemmli-Puffer 6×

| Substanz | Menge |
|---------------------------|--------|
| 4× Tris-SDS-Puffer pH 6,8 | 7,0 ml |
| Glycerin | 3,6 ml |
| SDS | 1,0 g |
| DTT | 0,93 g |
| Bromphenolblau | 1,2 g |

Tris-SDS-Puffer pH 6,8 4×

| Substanz | Menge |
|--------------------------------------|----------|
| Tris | 3,02 g |
| SDS | 0,2 g |
| ddH ₂ O | ad 50 ml |
| Einstellen mit HCl auf pH 6,8 | |

Gießen der Gele

Für das Gießen der Gele wurden zwei Glasplatten in eine spezielle Gießvorrichtung eingespannt, sodass zwischen den beiden Platten ein Spalt blieb, in dem anschließend die Gele gegossen werden konnten. Zunächst wurde das 11,5 % Trenngel hergestellt, zügig nach der Herstellung bis ca. 2 cm unter den Rand der Gießvorrichtung gegossen und anschließend mit 100 % Isopropanol überschichtet. Der Isopropanol dient dabei der Bildung einer glatten Oberfläche des Gels und schirmt dieses vor Luftsauerstoff ab. Nachdem das Trenngel auspolymerisiert ist, wurde das 5 % Sammelgel hergestellt. Der Isopropanol wurde abgekippt, das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und bis zum oberen Rand der Gießvorrichtung aufgefüllt. Direkt nach dem Gießen wurden die Gel-Kämme, die die Geltaschen bildeten, in das noch flüssige Sammelgel eingesetzt.

Trenngel 11,5 % (Ansatz für 4 Gele)

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

Sammelgel 5 % (Ansatz für 4 Gele)

| Substanz | Menge |
|-------------------------|--------|
| 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 |

Tris-Puffer (1,8 M) Trenngel

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

Tris-Puffer (0,6 M) Sammelgel

| Substanz | Menge | [c] |
|------------------------------|------------|-------|
| Tris | 60 g | 0,6 M |
| SDS 10 % | 40 ml | 0,4 % |
| ddH ₂ O | ad 1000 ml | |
| Einstellen auf pH 6,8 | | |

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

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

Durchführung der Gelelektrophorese

Die Gele wurden, nachdem sie aus der Gießvorrichtung entnommen und die Kämme vorsichtig entfernt wurden, in die Elektrophoresekammer eingespannt und der Bereich zwischen den Gelen sowie die Kammer mit 1× Running Buffer aufgefüllt. In die Geltaschen wurden anschließend entweder die Proben oder der Proteinstandard eingebracht. Nach Verschluss der Kammer mit einem Deckel, der mit der Spannungsquelle verbunden war, wurde die Elektrophorese gestartet, über deren gesamte Dauer eine Spannung von 120 V anlag. Die Laufzeit war dabei abhängig von den zu untersuchenden Proteinen. Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die Gele für 5 min mit UV-Licht im ChemiDoc™ MP Imaging System aktiviert.

Running-Buffer 10×

| 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 | |
| Einstellen auf pH 8,3 | | |

Running Buffer 1×: 1:10 verdünnen

3.4.5 Western Blot

Mit Hilfe des Western Blots können die aufgetrennten Proteine im Anschluss an die SDS-PAGE aus dem Gel direkt auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen werden. Diese Membran kann anschließend mit Antikörpern inkubiert werden, wodurch es möglich ist, bestimmte Proteine zu identifizieren. Zur Übertragung der Proteine wird das sogenannte Semi-Dry Verfahren angewandt. Bei diesem Verfahren wird das Gel, von Filterpapieren umgeben, zwischen zwei Elektroden positioniert und ein konstanter Strom angelegt. Der Proteintransfer erfolgt dabei horizontal aus dem Gel auf die PVDF-Membran – von der Kathode in Richtung Anode. Das bei der Gelelektrophorese aufgetrennte Proteinmuster bleibt bei der Übertragung erhalten [69]. Im Anschluss an den Transfer wird die Membran entweder mit 5 % Milchpulverlösung oder 3 % BSA-Lösung blockiert, um unspezifische Bindungen des bei der anschließenden Immundetektion verwendeten Antikörpers zu verhindern.

Durchführung Western Blot

Zunächst wurden die Filterpapiere in die jeweiligen Puffer eingelegt (s. Abbildung 3-2) und die PVDF-Membran aktiviert. Zur Aktivierung wurde die Membran für 20 s in 100 % Methanol (MeOH) eingelegt und anschließend kurz in demineralisiertes Wasser getaucht. Die Anodenplatte der Blotting-Apparatur wurde mit demineralisiertem Wasser benetzt und die Filterpapiere, die Membran und das Gel in folgender Reihenfolge aufeinandergelegt (s. Abbildung 3-2):

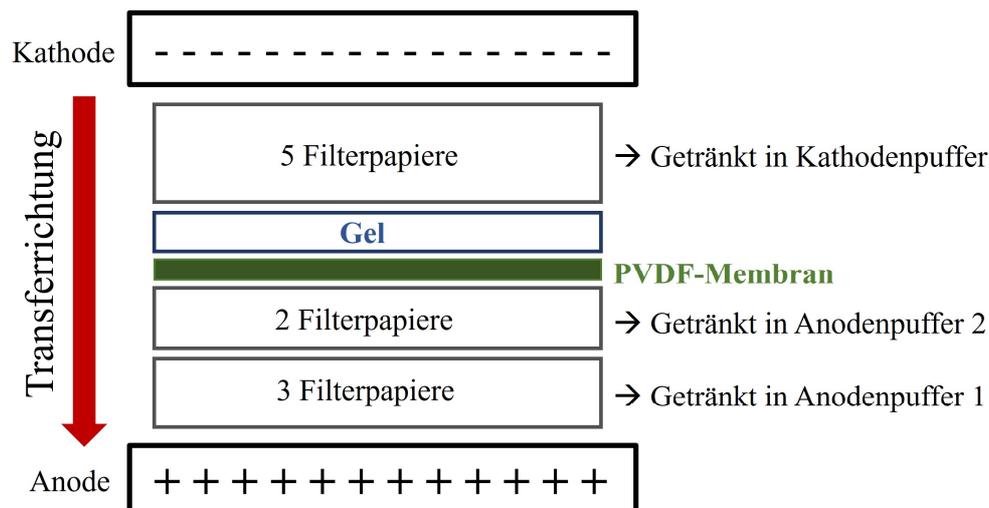


Abbildung 3-2: Proteintransfer mittels Semi-Dry Verfahren

Schematischer Aufbau des Western Blots mittels Semi-Dry Verfahren. PVDF: Polyvinylidenfluorid. Die weitere Beschreibung erfolgt im Text.

Die Kathodenplatte wurde ebenfalls mit etwas demineralisiertem Wasser benetzt und auf die Filterpapiere gelegt. Anschließend wurden die beiden Elektroden mit der Stromquelle verbunden und pro Gel, das sich in der Blotting-Apparatur befand, eine Stromstärke von 60 mA angelegt. Die Gesamtstromstärke, die angelegt werden musste, berechnete sich somit folgendermaßen:

$$I_{ges} = 60 \text{ mA} \times n$$

I_{ges} steht dabei für die Gesamtstromstärke in [mA] und n für die Anzahl der Gele, die sich in der Blotting-Apparatur befinden.

Nach dem Blot wurde die PVDF-Membran aus der Blotting-Apparatur entnommen und mittels ChemiDoc™ MP Imaging System das Totalprotein aufgenommen, welches später der Quantifizierung der zu untersuchenden Proteine diente.

Anodenpuffer 1

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

Anodenpuffer 2

| Substanz | Menge | [c] |
|-------------------------------|------------|-------|
| Tris | 3,6 g | 30 mM |
| MeOH 100 % | 200 ml | 20 % |
| ddH ₂ O | ad 1000 ml | |
| Einstellen auf pH 10,4 | | |

Kathodenpuffer

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

Ponceau S-Färbung

Zur Identifizierung und Markierung der Banden des Proteinstandards wurde die Membran, nach Aufnahme des Totalproteins, in Ponceau S-Lösung inkubiert. So konnte die Membran zugeschnitten werden, um verschiedene Proteine auf den verschiedenen Membranstreifen analysieren zu können. Bei Ponceau S handelt es sich um einen Azofarbstoff, welcher an die

positiv geladenen Aminogruppen der Proteine bindet und diese dadurch auf der PVDF-Membran sichtbar macht. Im Anschluss an das Zuschneiden wurden die Membranstreifen so lange unter demineralisiertem Wasser ausgewaschen, bis die Färbung verschwunden war.

Ponceau S-Lösung 0,2 % (m/V)

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

Blockieren der Membran und Immundetektion

Direkt im Anschluss an die Ponceau S-Färbung wurden die Membranen – je nach verwendetem Primärantikörper – für 2 h in 5 % Milchpulver-1× TBST oder in 3 % BSA-1× TBST bei RT auf dem Schüttler blockiert (s. Tabelle 2.3), um unspezifische Bindungsstellen auf der PVDF-Membran zu blockieren. Danach wurden die Membranstücke dreimal je 5 min bei RT mit 1× TBST gewaschen, anschließend in die entsprechenden Primärantikörper (verdünnt in Primärantikörper-Verdünnungslösung) gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert (s. Tabelle 2.3). Der Primärantikörper bindet dabei spezifisch an das auf der Membran befindliche Protein. Am folgenden Tag wurden die Membranstreifen – je nach vorheriger Blockier-Lösung – dreimal für je 5 min bei RT mit 1 % Milchpulver-1× TBST oder 1 % BSA-1× TBST gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgte eine zweistündige Inkubation mit dem gegen den Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörper (s. Tabelle 2.4) bei RT auf dem Schüttler. An diesen ist zudem das Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt. Die Verdünnung der Sekundärantikörper erfolgte entweder in 1 % Milchpulver-1× TBST oder in 1 % BSA-1× TBST, je nach zuvor verwendeter Blockier-Lösung. Nach der Inkubation im Sekundärantikörper wurden die Membranen nochmals dreimal je 5 min mit 1× TBST gewaschen, um den überschüssigen Sekundärantikörper zu entfernen. Die Detektion erfolgte mittels Chemolumineszenz, da die HRP in der Lage ist das Substrat Luminol in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid zu oxidieren. Dadurch kommt es zur Chemolumineszenz, die detektiert werden kann. Hierzu wurden die Membranabschnitte auf eine Kopierfolie gelegt, mit Clarity™ Western ECL Substrat benetzt, mit einer weiteren Folie bedeckt und für 4 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend erfolgte die Detektion mit dem ChemiDoc™ MP Imaging System und der Software Image Lab™.

5 % Milchpulver-1 × TBST (Blockieren)

| Substanz | Menge | [c] |
|-------------|-----------|-----|
| Milchpulver | 25,0 g | 5 % |
| TBST 1 × | ad 500 ml | |

1 % Milchpulver-1 × TBST (Waschen)

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

3 % BSA-1 × TBST (Blockieren)

| Substanz | Menge | [c] |
|----------|-----------|-----|
| BSA | 3,0 g | 5 % |
| TBST 1 × | ad 100 ml | |

1 % BSA-1 × TBST (Waschen)

| Substanz | Menge | [c] |
|----------|-----------|-----|
| BSA | 3,0 g | 1 % |
| TBST 1 × | ad 300 ml | |

Primärantikörper-Verdünnungslösung

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

TBS 10 ×

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

Einstellen auf pH 7,6

TBST 1 ×

| Substanz | Menge | [c] |
|-----------------------|------------|--------|
| TBS 10 × | 100 ml | 1 × |
| Tween [®] 20 | 500 µl | 0,05 % |
| ddH ₂ O | ad 1000 ml | |

Strippen der Membran

Zur Detektion von weiteren Proteinen, die sich ebenfalls auf einem bereits untersuchten Membranstück befinden, mussten sämtliche vorherigen Antikörper von der Membran entfernt werden. Dazu wurde die PVDF-Membran zweimal je 5 min in 1 × TBST gewaschen und anschließend für 20 min bei RT in der Stripping-Lösung auf dem Schüttler inkubiert. Die Membranen wurden nachfolgend für je zweimal 5 min in 1 × TBST gewaschen. Im Anschluss erfolgte eine erneute Inkubation in der Blockier-Lösung, die dem nun verwendeten Antikörper entsprach, und die Immundetektion.

Stripping-Lösung

| Substanz | Volumen |
|--------------------|-----------|
| NaOH 1 M | 20 ml |
| DTT 100 mM | 64,82 µl |
| SDS 10 % | 64,82 µl |
| ddH ₂ O | ad 500 ml |

3.5 Analyse von Thrombozyten

3.5.1 Isolation muriner Thrombozyten

Die Isolation muriner Thrombozyten erfolgte durch kardiale Punktion des Herzens. Dazu wurden 200 µl Alsever's Lösung in einer 3 ml Spritze mit Einmal-Kanülen (0,5 × 16 mm, 25G) vorgelegt. Die Alsever's Lösung dient dazu, das Calcium in den Blutproben zu komplexieren und so eine vorzeitige Thrombozytenaggregation sowie Gerinnung des Blutes zu verhindern. Die Mäuse wurden zunächst mittels Inhalation von Kohlenstoffdioxid getötet. Unmittelbar nachdem der Tod eingetreten war, wurde das Fell über dem Thorax aufgeschnitten, sodass dieser frei lag. Das Herz wurde punktiert, indem der Thorax mit der Kanüle zwischen der zweiten und dritten Rippe durchstoßen wurde. Anschließend wurde das Blut durch langsames und vorsichtiges Aufziehen der Spritze entnommen. Beim Herausziehen der Spritze sollte der Aspirationszug dabei so klein wie möglich sein, um eine unerwünschte vorzeitige Aggregation der Thrombozyten zu vermeiden. Der Inhalt der Spritze wurde durch vorsichtiges Schwenken gemischt und in ein 5 ml Polypropylenröhrchen, in dem sich bereits 500 µl Puffer B befanden, überführt. Anschließend wurde das Röhrchen mit 70 × g für 15 min bei RT zentrifugiert. Die Bremse der Zentrifuge war dabei bei allen Zentrifugationsschritten ausgeschaltet, um eine vorzeitige Aggregation der Thrombozyten durch zu starkes Bremsen zu vermeiden. Der Überstand, der das plättchenreiche Plasma (PRP) und somit die Thrombozyten enthält, wurde mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Dieser Überstand wurde erneut für 5 min mit 600 × g bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Thrombozytenpellet mit einer abgeschnittenen 1 ml Pipettenspitze in 500 µl HEPES-Puffer resuspendiert. Um die Thrombozyten für die Ca²⁺-Messung (s. 3.5.5), die Thrombozyten-Aggregation (s. 3.5.4) oder die *ex vivo* Phosphorylierung (s. 3.5.3) auf die gewünschte Konzentration einzustellen, wurde ein Aliquot der Thrombozytensuspension

entnommen, 1:30 mit HEPES-Puffer verdünnt und daraus die Thrombozytenzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Für die Herstellung von Thrombozyten-Lysaten für die SDS-PAGE und Western Blot Analyse (s. 3.4.4 und 3.4.5) oder die *in vitro* Phosphorylierung (s. 3.5.2) wurde das erhaltene Thrombozytenpellet direkt, wie unter 3.4.1 beschrieben, mit 150 µl 2 %-Lubrolpuffer (Lysepuffer) lysiert und die Proteinkonzentration nach Lowry bestimmt (s. 3.4.2).

Puffer B

| Substanz | Menge | [c] |
|--------------------------------------|------------|---------|
| HEPES | 2,383 g | 20 mM |
| NaCl | 4,032 g | 138 mM |
| KCl 1 M | 1450 µl | 2,9 mM |
| MgCl ₂ 1 M | 500 µl | 1 mM |
| NaH ₂ PO ₄ 1 M | 180 µl | 0,36 mM |
| ddH ₂ O | ad 1000 ml | |

Einstellen auf pH 6,2

HEPES Puffer

| Substanz | Menge | [c] |
|--------------------------------------|------------|---------|
| HEPES | 2,383 g | 20 mM |
| NaCl | 4,032 g | 138 mM |
| KCl 1 M | 1450 µl | 2,9 mM |
| MgCl ₂ 1 M | 500 µl | 1 mM |
| NaH ₂ PO ₄ 1 M | 180 µl | 0,36 mM |
| ddH ₂ O | ad 1000 ml | |

Einstellen auf pH 7,4

KCl 1 M

| Substanz | Menge | [c] |
|--------------------|----------|-----|
| KCl | 3,728 g | 1 M |
| ddH ₂ O | ad 50 ml | |

MgCl₂ 1 M

| Substanz | Menge | [c] |
|--------------------------------------|----------|-----|
| MgCl ₂ ·6H ₂ O | 10,165 g | 1 M |
| ddH ₂ O | ad 50 ml | |

NaH₂PO₄ 1 M

| Substanz | Menge | [c] |
|--|----------|-----|
| NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O | 6,8995 g | 1 M |
| ddH ₂ O | ad 50 ml | |

3.5.2 *In vitro* Phosphorylierung muriner Thrombozyten-Lysate

Die PKG katalysiert nach Aktivierung durch cGMP die Übertragung der γ -Phosphatgruppe von ATP auf verschiedene Substratproteine. Diese Phosphorylierung kann mit Hilfe von Phospho-Antikörpern detektiert werden. Um die *in vitro* Phosphorylierung von IRAG2 in Thrombozyten zu analysieren, wurden Thrombozyten-Lysate (s. 3.4.1) von IRAG2-WT und IRAG2-KO Tieren mit dem cGMP-Analogon 8-Br-cGMP inkubiert. Dazu wurden 500 µg Protein

(Thrombozyten-Lysat) verwendet und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 100 μ M 8-Br-cGMP für 20 min bei 37 °C gemäß folgendem Ansatz stimuliert:

Stimulationsansatz in vitro Phosphorylierung von Thrombozyten

| Substanz | Menge | [c] |
|--|----------------|-------------|
| Protein (Thrombozyten-Lysat) | X μ l | 500 μ g |
| MES 5 \times | 40 μ l | 1 \times |
| PhosSTOP 10 \times | 20 μ l | 1 \times |
| ATP 10 mM | 20 μ l | 1 mM |
| 8-Br-cGMP 1 mM | 20 μ l | 100 μ M |
| ddH ₂ O (mit Proteaseinhibitoren) | ad 200 μ l | |
| Inkubation für 20 min bei 37 °C danach direkt auf Eis | | |

Als Kontrolle wurde in einem Ansatz ddH₂O anstelle von 8-Br-cGMP hinzugefügt. Dieser Ansatz diente als unstimulierte Kontrolle und wurde sowohl für IRAG2-WT als auch für IRAG2-KO Thrombozyten-Lysate verwendet. Im Anschluss an die Stimulation wurden die Proben auf Eis gestellt und direkt eine Immunpräzipitation durchgeführt, um eine IRAG2-spezifische Phosphorylierung zu untersuchen. Dazu wurden zu den stimulierten Proben sowie unstimulierten Kontroll-Proben je 300 μ l (Co)-IP-Puffer und 2 μ l IRAG2-AK gegeben und die Immunpräzipitation, wie unter Abschnitt 3.4.3 beschrieben, durchgeführt. Die Analyse der Phosphorylierung erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot (s. 3.4.4 und 3.4.5). Zur Detektion der IRAG2-Phosphorylierung wurde ein Phospho-(Ser/Thr) PKA Substrat-Antikörper verwendet. Dieser detektiert PKA-, PKC- und PKG-vermittelte Phosphorylierungen an Serin- und Threonin-Resten von Proteinen. Es ist somit möglich nach cGMP-Stimulation und anschließender Immunpräzipitation von IRAG2, eine PKG-abhängige Phosphorylierung von IRAG2 zu untersuchen.

MES-Puffer 5×

| Substanz | Menge | [c] |
|----------------------|-----------|--------|
| MES | 488,00 mg | 250 mM |
| EGTA | 7,61 mg | 2 mM |
| Mg(Oac) ₂ | 7,12 mg | 5 mM |
| NaCl | 29,22 mg | 50 mM |
| ddH ₂ O | ad 10 ml | |

Einstellen auf pH 6,9

PhosSTOP 10×

| Substanz | Menge | [c] |
|-----------------------------------|--------|-----|
| PhosSTOP 20× | 500 µl | 10× |
| ddH ₂ O (autoklaviert) | 500 µl | |

Herstellung PhosSTOP 20×: s. 3.4.1

ddH₂O mit Proteaseinhibitoren

| Substanz | Menge | [c] |
|-----------------------------------|------------|-----------|
| Benzamidin 100 mM | 10 µl | 1 mM |
| Leupeptin 1 mg/ml | 0,5 µl | 0,5 µg/ml |
| PhosSTOP 20× | 50 µl | 1× |
| PMSF 200 mM | 1,5 µl | 300 µM |
| ddH ₂ O (autoklaviert) | ad 1000 µl | |

Herstellung Benzamidin 100 mM, Leupeptin 1 mg/ml, PMSF 200 mM, PhosSTOP 20×: s. 3.4.1

ATP 10 mM

| Substanz | Menge | [c] |
|-----------------------------------|------------|-------|
| ATP | 10,144 mg | 10 mM |
| ddH ₂ O (autoklaviert) | ad 2000 µl | |

3.5.3 *Ex vivo* Phosphorylierung intakter muriner Thrombozyten

Neben der *in vitro* Phosphorylierung in bereits lysierten Thrombozyten können Proteine auch *ex vivo* in intakten Thrombozyten phosphoryliert werden. Dazu wurden die Thrombozyten, wie unter 3.5.1 beschrieben, isoliert und mittels Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Mit HEPES-Puffer pH 7,4 (s. 3.5.1) wurden diese anschließend auf eine Zellzahl von $3,5 \times 10^8$ Thrombozyten/ml eingestellt. Pro Ansatz wurden 500 µl der eingestellten Thrombozytensuspension verwendet – was $1,75 \times 10^8$ Thrombozyten entspricht – und mit 100 µM des cGMP-Analogons 8-pCPT-cGMP für 20 min bei 37 °C gemäß folgendem Ansatz stimuliert:

Stimulationsansatz ex vivo Phosphorylierung von Thrombozyten

| Substanz | Menge | [c] |
|--|--------|---------------------------------|
| Thrombozytensuspension $3,5 \times 10^8$ Thrombozyten/ml | 500 µl | $1,75 \times 10^8$ Thrombozyten |
| 8-pCPT-cGMP 10 mM | 5 µl | 100 µM |

20 min Stimulation bei 37 °C

Für die unstimulierten Kontrollen wurden die Ansätze anstelle von 8-pCPT-cGMP mit der entsprechenden Menge ddH₂O ebenfalls für 20 min bei 37 °C inkubiert.

Nach der Stimulation wurden die Ansätze für 5 min mit 2000 × g bei 4 °C zentrifugiert und das erhaltene Thrombozytenpellet in 150 µl 2 % Lubrolpuffer (Lysepuffer) (s. 3.4.1) mit dem Ultraschall-Homogenisator auf Eis lysiert. Im nächsten Schritt wurde das Lysat für 20 min mit 18000 × g bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Abschließend wurde phosphoryliertes IRAG2 mittels Immunpräzipitation ausgefällt. Dazu wurden zu allen stimulierten und unstimulierten lysierten Proben 350 µl (Co)-IP-Puffer (s. 3.4.3) sowie 2 µl IRAG2-AK zugegeben und die Immunpräzipitation wurde, wie in 3.4.3 beschrieben, durchgeführt. Die anschließende Detektion der *ex vivo* Phosphorylierung von immunpräzipitiertem IRAG2 erfolgte nach SDS-PAGE (s. 3.4.4) und Western Blot (s. 3.4.5) mittels Phospho-(Ser/Thr) PKA Substrat-Antikörper analog zur Analyse der *in vitro* Phosphorylierung von IRAG2 in Thrombozyten (s. 3.5.2).

3.5.4 Messung der Thrombozytenaggregation mittels Aggregometer

Die Messung der Thrombozytenaggregation ist eine effektive Methode zur Bestimmung der Thrombozytenfunktion. Mit Hilfe des Zwei-Kanal-Aggregometers von Chronolog (Modell 490) kann optisch, durch Bestimmung der Lichttransmission einer Thrombozytensuspension, die Messung der Thrombozytenaggregation erfolgen. Bei diesem Typ von Aggregometer ist es dabei möglich, zwei Proben parallel zu vermessen. Für die Bestimmung der Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit einem Agonisten wurde in Kanal 1 IRAG2-WT und in Kanal 2 IRAG2-KO vermessen. Um die NO/cGMP-abhängige Aggregationshemmung zu bestimmen, wurden in Kanal 1 IRAG2-WT oder IRAG2-KO Thrombozyten ohne Hemmstoff (Kontrolle) vermessen, während in Kanal 2 IRAG2-WT oder IRAG2-KO Thrombozyten mit Hemmstoff vermessen wurden. Die Messungen erfolgten mit einer Zellzahl von 1×10^8 Thrombozyten/ml. Durch die Verwendung von Distanzstücken war es dabei möglich, nur 250 µl Probenvolumen einzusetzen anstelle von 500 µl. Die 250 µl der Thrombozytensuspension wurden in spezielle Glasküvetten pipettiert und vor Beginn der Messung für 5 min bei 37 °C äquilibriert. Um den Einfluss eines Inhibitors auf die Thrombozytenaggregation zu untersuchen, wurde dieser zu der Thrombozytensuspension in die Küvette hinzugefügt, gefolgt von der Inkubation des Reaktionsansatzes. Die Inkubationszeit war dabei abhängig vom verwendeten Inhibitor (s. Tabelle 3.1). Für die Kontrollen ohne

Hemmstoff wurde die gleiche Menge des jeweiligen Lösungsmittels, in dem der Hemmstoff gelöst war, zugefügt. Nach Ende der Inkubationszeit erfolgte die Messung. Dazu wurden die Glasküvetten in einer Öffnung zwischen einer Lichtquelle und einer Photozelle platziert, sodass der Verlauf der Aggregation detektiert werden konnte. In den Küvetten befand sich außerdem ein Rührstäbchen, das die Thrombozyten während der Messung mit einer Geschwindigkeit von 1200 rpm in Bewegung hielt und zur Nachahmung der physiologischen Scherbedingungen diente. Zudem wurde ein Referenzröhrchen, das 250 µl HEPES-Puffer pH 7,4 (s. 3.5.1) enthielt, in einer speziell dafür vorgesehenen Öffnung platziert. Während der Messung wurde dabei die Lichttransmission der Thrombozytensuspension gegen die Lichttransmission der Referenz gemessen. Da die Referenzlösung keine Thrombozyten enthält, ist diese klar und besitzt dementsprechend eine Lichtdurchlässigkeit von 100 %. Die Lichtdurchlässigkeit der Thrombozytensuspension ist aufgrund der Trübung durch die Thrombozyten eher gering. Nachdem Abgleichen der Lichttransmission der Thrombozytensuspension auf 0 % gegen das Referenzröhrchen, konnte die Aggregation der Thrombozyten durch Zugabe eines Agonisten gestartet werden (s. Tabelle 3.1). Die durch die Thrombozyten trübe Suspension besaß anfangs nur eine geringe Lichttransmission (0 %). Wurde die Aggregation durch Zugabe eines Agonisten gestartet, kam es zunächst zum sogenannten „*shape change*“, bei dem die Thrombozyten ihre Oberfläche vergrößern und somit die Lichttransmission zunächst noch weiter abnimmt. Anschließend lagern sich die Thrombozyten zu immer größer werdenden Aggregaten zusammen, wodurch die Lösung klarer wird und die Lichtdurchlässigkeit zunimmt. Diese Veränderung der Lichttransmission kann photometrisch bestimmt und in Form einer Kurve dargestellt werden (Skalierung der y-Achse: 0 %-100 %). So kann die Zunahme der Lichttransmission als ein Maß für die Aggregabilität der Thrombozyten angenommen werden. Die Auswertung der Thrombozytenaggregation erfolgte mit Hilfe der Aggro/Link Software. Dabei wurde die maximale Steigung der Aggregationskurve („*slope*“) berechnet, was die Aggregationsgeschwindigkeit der Thrombozyten widerspiegelt und somit als Maß zur Bestimmung der Aggregationsrate [%/min] dient. Bei Verwendung von Hemmstoffen wurde die maximale (max.) Aggregationsrate [%] nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{max. Aggregationsrate [\%]} = \frac{\text{Aggregationsrate} \left[\frac{\%}{\text{min}} \right] \text{ mit Hemmstoff}}{\text{Aggregationsrate} \left[\frac{\%}{\text{min}} \right] \text{ ohne Hemmstoff}} \times 100 \%$$

Die Aggregationsrate der Kontrollen (ohne Hemmstoff) wurde als maximal (100 %) festgelegt und daraus die Aggregationsrate mit Hemmstoff als Prozent der Aggregationsrate ohne Hemmstoff berechnet. Je höher die maximale Aggregationsrate [%] war, desto schwächer war somit die Aggregationshemmung.

Tabelle 3.1: Konzentrationen und Inkubationszeiten von Agonisten und Hemmstoffen der Thrombozytenaggregation

| Agonist + [Lösemittel] | [c] | Hemmstoff + [Lösemittel] | [c] | Inkubationszeit |
|---|------------|--|--------|-----------------|
| Thrombin [gelöst in 0,9 % NaCl] | 0,024 U/ml | 8-pCPT-cGMP [gelöst in ddH ₂ O] | 150 µM | 10 min |
| | 0,05 U/ml | | 200 µM | 10 min |
| | 0,1 U/ml | Nitroprussid- Natrium (SNP) [gelöst in ddH ₂ O] | 2,5 µM | 2 min |
| Kollagen [verdünnt in ddH ₂ O] | 5 µg/ml | | | |

3.5.5 Messung der Ca²⁺-Freisetzung in Thrombozyten

Die Untersuchung der Ca²⁺-Freisetzung in Zellen kann mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen erfolgen, die Ca²⁺-Ionen komplexieren. Eine häufig dafür verwendete Substanz ist Fura-2 Acetoxymethylester (Fura-2-AM), welches 1985 von *Grynkiewicz et al.* entwickelt wurde [48]. Fura-2-AM ist durch seine Bindung an den Acetoxymethylester sehr gut membrangängig und wird in der Zelle durch Esterasen in das Ca²⁺-sensitive, wirksame Fura-2 gespalten (s. Abbildung 3-3). Dieses lässt sich bei den Wellenlängen 340 nm und 380 nm anregen, wobei Ca²⁺-gesättigtes Fura-2 bei 340 nm und Ca²⁺-freies Fura-2 bei 380 nm angeregt wird. Wird Calcium in der Zelle freigesetzt, nimmt die Menge an Ca²⁺-gebundenen Fura-2 und somit die Fluoreszenz bei 340 nm zu. Gleichzeitig nimmt die Menge an Ca²⁺-freiem Fura-2 ab und somit kommt es auch zu einer Abnahme der Fluoreszenz bei 380 nm. Die freigesetzte Ca²⁺-Menge wird schließlich anhand des Verhältnisses (Ratio) 340 nm/380 nm bestimmt.

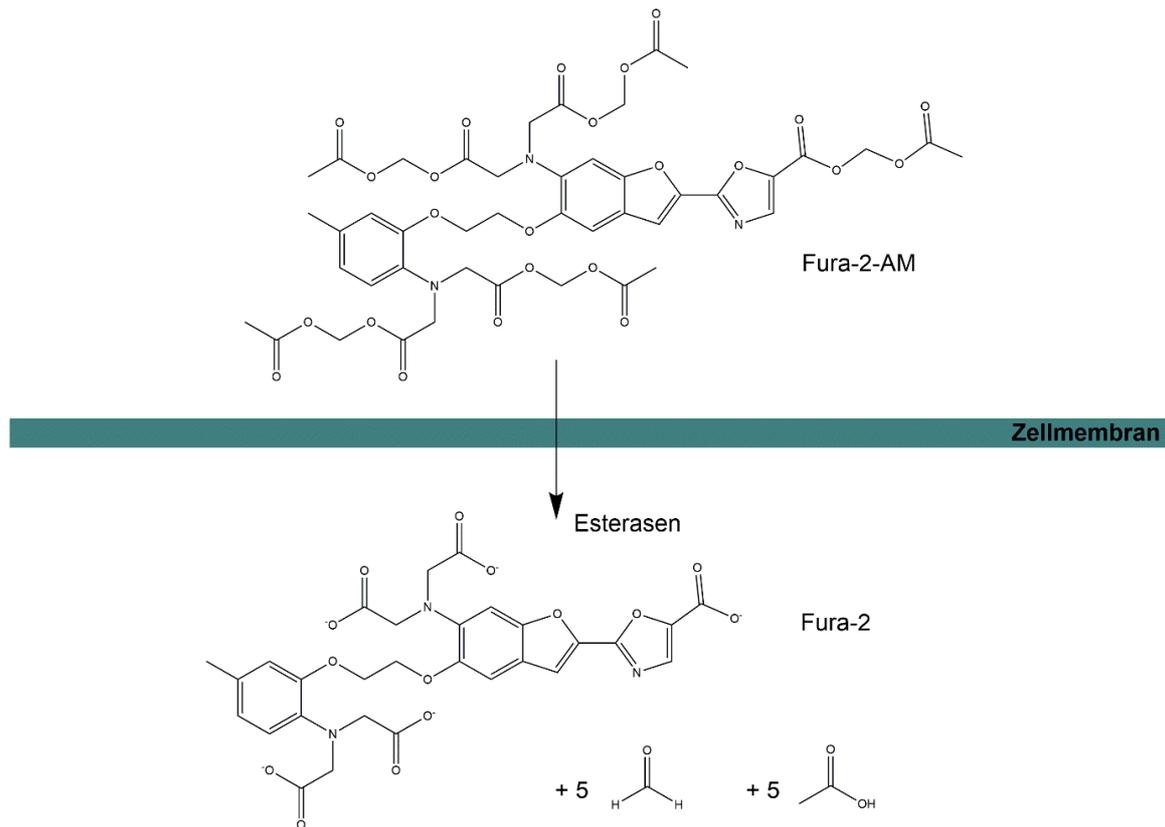


Abbildung 3-3: Beladung von Zellen mit Fura-2-AM

Fura-2 Acetoxymethylester (Fura-2-AM) ist aufgrund seiner Lipophilie gut membrangängig und wird in der Zelle durch Esterasen in das wirksame Fura-2 gespalten, das in der Lage ist, Calcium zu komplexieren. Weitere Erläuterungen befinden sich im Text.

Zur Messung der Ca^{2+} -Freisetzung in Thrombozyten wurden die isolierten Thrombozyten mit HEPES-Puffer pH 7,4 (s. 3.5.1) in einem 5 ml Polypropylenröhrchen auf eine Zellzahl von 1×10^8 Thrombozyten/ml eingestellt. Anschließend erfolgte die Zugabe der entsprechenden Menge Fura-2-AM, sodass die Konzentration des Fura-2-AM $1 \mu\text{M}$ betrug. Die Thrombozyten wurden dann für 45 min im Dunkeln bei RT und unter leichtem Schütteln auf dem Kreisschüttler inkubiert. Nach Ende der Beladungszeit wurden die Thrombozyten für 10 min mit $600 \times g$ bei RT zentrifugiert, um das Beladungsmedium zu entfernen. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Behandlung der beladenen Thrombozyten möglichst lichtgeschützt erfolgte. Das Thrombozytenpellet wurde nun vorsichtig wieder in der entsprechenden Menge HEPES-Puffer pH 7,4 (s. 3.5.1) resuspendiert, sodass die Konzentration wieder bei 1×10^8 Thrombozyten/ml lag. Die Thrombozytensuspension wurde anschließend in eine 20 ml Braunglasflasche überführt und die Ca^{2+} -Freisetzung am FLUOstar® Omega Plattenleser (Lehrstuhl Pharmazeutische Technologie, Universität Regensburg) gemessen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der MARS Analysesoftware sowie Microsoft Excel.

Für die Messung wurden 10 µl einer Thrombin-Lösung (s. Tabelle 3.2) zehnfach überkonzentriert in jeweils eine Vertiefung einer 96-Lochplatte vorgelegt. Über das Pumpsystem des FLUOstar® Omega Plattenlesers wurden in jede der Vertiefungen 90 µl Thrombozytensuspension zu pipettiert, sodass die Konzentration der Thrombin-Lösung wieder einfach vorlag. Nach Zugabe der Thrombozytensuspension, erfolgte eine Messung über 30 s, bei der alle 1,5 s die Fluoreszenz bei 340 nm und 380 nm gemessen wurde. Daraus konnte anschließend das Ratio aus 340 nm/380 nm berechnet und eine Freisetzungskurve erstellt werden, aus der die maximale Freisetzung bestimmt wurde. Für jede Konzentration erfolgte dabei eine Dreifachbestimmung. Neben der Stimulation mit Thrombin-Lösungen, wurde zudem der Leerwert und somit die basale Ca²⁺-Menge bestimmt, indem nur das Lösemittel der Thrombin-Lösung vorgelegt wurde. Ebenso wurden, in jeweils separaten Vertiefungen, die minimalen und maximalen Werte der Ca²⁺-Mengen in der Zelle bestimmt, um später die erhaltenen Ratios mit Hilfe der Formel nach *Grynkiewicz et al.* in die entsprechenden Ca²⁺-Konzentration [nM] umzurechnen [48]. Für die Bestimmung der maximalen Werte (Max-Proben) wurde eine 1 % Triton X-100 Lösung verwendet, wodurch das gesamte Calcium in der Zelle freigesetzt wurde. Um die minimalen Werte (Min-Proben) zu bestimmen, wurde eine 1 % Triton X-100/Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA) Lösung verwendet, die durch das enthaltene EGTA das gesamte freigesetzte Calcium komplexiert. Die Umrechnung der erhaltenen Ratios in die entsprechenden Ca²⁺-Konzentrationen erfolgte nach der folgenden Formel:

$$Ca^{2+}[nM] = k_d \times \left(\frac{F_{min,380}}{F_{max,380}} \right) \times \left(\frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \right)$$

- k_d: Dissoziationskonstante Fura-2-AM (= 224 nM)
- F_{min,380}: Fluoreszenz der Min-Proben bei 380 nm
- F_{max,380}: Fluoreszenz der Max-Proben bei 380 nm
- R: gemessenes Fluoreszenzratio 340/380
- R_{max}: Fluoreszenzratio bei maximaler Ca²⁺-Konzentration (maximales Fluoreszenzratio der Max-Proben)
- R_{min}: Fluoreszenzratio bei minimaler Ca²⁺-Konzentration (minimales Fluoreszenzratio der Min-Proben)

Tabelle 3.2: Verwendete Konzentrationen der Thrombin-Lösungen für die Ca^{2+} -Messung in Thrombozyten

| Agonist + [Lösungsmittel] | [c] | 10× überkonzentriert |
|---------------------------------------|------------|-------------------------|
| Thrombin [gelöst in 0,9 % NaCl] | 0,024 U/ml | 0,24 U/ml |
| | 0,05 U/ml | 0,5 U/ml |
| | 0,1 U/ml | 1 U/ml |

Min-Proben

| Substanz | Menge | [c] |
|---------------------|-------|-------|
| EGTA 90 mM/NaOH | 2 ml | 45 mM |
| Triton X-100 2 % | 2 ml | 1 % |

EGTA 90 mM/NaOH

| Substanz | Menge | [c] |
|------------|---------|-------|
| EGTA | 68,5 mg | 90 mM |
| NaOH 0,1 M | ad 2 ml | |

Max-Proben

| Substanz | Menge | [c] |
|--------------|------------------|-----|
| Triton X-100 | 50 μl | 1 % |
| PBS | ad 5 ml | |

2 % Triton X-100

| Substanz | Menge | [c] |
|--------------|------------------|-----|
| Triton X-100 | 40 μl | 2 % |
| PBS | ad 2 ml | |

3.6 Blutabnahme aus dem retrobulbären Plexus

Die Blutabnahme aus dem retrobulbären Plexus erfolgte direkt nach Eintritt des Todes durch Inhalation von Kohlenstoffdioxid. Dazu wurde mit Hilfe einer heparinisierten Hämatokritkapillare der retrobulbäre Plexus am Auge verletzt und das austretende Blut in heparinisierte Microvetten[®] aufgenommen. Diese wurden für 8 min mit $2000 \times g$ bei RT zentrifugiert und das Plasma (Überstand) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

3.7 Bestimmung der Amylase-Aktivität im Plasma und in Pankreas-Lysaten

Die Bestimmung der Amylase-Aktivität im Plasma (s. 3.6) und in Pankreas-Lysaten (s. 3.4.1) erfolgte mit Hilfe eines kolorimetrischen Amylase-Assay Kits (Abcam) nach Angaben des Herstellers.

Das Testprinzip beruht darauf, dass durch die α -Amylase das Substrat Ethyliden-4-nitrophenyl- α -D-maltoheptaosid (Ethyliden-pNP-G7) in kleinere Spaltprodukte wie p-Nitrophenol umgesetzt wird, welches bei 405 nm am Mikrotiterplatten-Photometer Tecan Sunrise Remote™ photometrisch bestimmt werden kann.

Zunächst erfolgte die Herstellung der Standardverdünnungen aus p-Nitrophenol (0 nmol/Loch, 4 nmol/Loch, 8 nmol/Loch, 12 nmol/Loch, 16 nmol/Loch, 20 nmol/Loch) durch Verdünnung der Stammlösung (2 nM) mit dem Assay-Puffer sowie die Herstellung des Reaktionsgemisches. Für das Reaktionsgemisch wurden Assay-Puffer und Substratmix im Verhältnis 1:1 gemischt. Pro Reaktion wurden davon 100 μ l benötigt.

Von den Proben und Standards wurden je 50 μ l in die Vertiefungen einer 96-Lochplatte pipettiert. Die Plasma-Proben (s. 3.6) wurden dabei unverdünnt eingesetzt. Für die Bestimmung der Amylase-Aktivität in Pankreas-Lysaten (s. 3.4.1) wurden die Lysate 1:100 vorverdünnt und die Amylase-Aktivität später auf die Proteinkonzentration der Lysate (s. 3.4.2) normiert. Anschließend wurden zu allen Proben und Standards 100 μ l des Reaktionsgemisches pipettiert und sofort bei $\lambda = 405$ nm kinetisch am Mikrotiterplatten-Photometer über einen Zeitraum von 30 min vermessen, wobei alle 30 s eine Messung erfolgte. Die Messung erfolgte dabei mit Hilfe der Magellan 5 Software.

Für die Berechnung wurde anhand der Standards und der gemessenen Extinktionen eine Standardgerade erstellt und daraus die Menge an gebildetem p-Nitrophenol innerhalb zweier Zeitpunkte t_1 und t_2 bestimmt:

$$\Delta A_{405nm} = A_2 - A_1$$

A1: Extinktion zum Zeitpunkt t_1

A2: Extinktion zum Zeitpunkt t_2

Aus dem Wert für $\Delta A_{405\text{nm}}$ wurde durch Einsetzen in die Geradengleichung die gebildete Menge an p-Nitrophenol im Zeitraum t_1 bis t_2 berechnet. Anschließend erfolgte die Berechnung der entsprechenden Amylase-Aktivität nach der folgenden Formel:

$$\text{Amylase - Aktivität} \left[\frac{\text{mU}}{\text{ml}} \right] = \left(\frac{B}{\Delta t \times V} \right) \times D$$

B: Menge an gebildetem p-Nitrophenol [nmol]

ΔT : Reaktionszeit ($t_2 - t_1$)

V: eingesetztes Probenvolumen in ml

D: Verdünnungsfaktor der Probe

Bei den Pankreas-Proben wurde die Amylase-Aktivität auf die Proteinkonzentration der Lysate [mU/mg] normiert.

3.8 Analyse isolierter pankreatischer Azini

3.8.1 Isolation pankreatischer Azini

Zur Untersuchung der Amylase-Sekretion und der Ca^{2+} -Freisetzung wurden pankreatische Azini isoliert. Dies erfolgte durch enzymatischen Verdau der entnommenen Pankreata (s. 3.3) mit Hilfe von Kollagenase Typ II nach einer von J. A. Williams beschriebenen Methode [140]. Nach der Entnahme der Pankreata (s. 3.3) wurden diese kurz in PBS gewaschen (Zusammensetzung s. Kapitel 3.3) und dabei von Blutgefäßen, Fettgewebe sowie Lymphknoten befreit. Das gewaschene Pankreas wurde kurz auf einem Rundfilterpapier abgedrückt, um lose Blutgefäße zu entfernen und anschließend direkt in eine 60 mm sterile Petrischale, die mit 5 ml Verdauungsmedium (Medium D) gefüllt war, überführt. Das Medium D wurde dabei unmittelbar vor Gebrauch auf 37 °C erwärmt und nochmals für 15 s mit Carbogen (Gemisch aus 95 % O_2 und 5 % CO_2) begast. Mit einer 5 ml Spritze wurde das Medium D aufgesaugt, über eine Nadel (0,4 × 19 mm, 27G) in das Pankreas-Parenchym injiziert und in der Petrischale aufgefangen. Dieser gesamte Vorgang erfolgte über 10 min. Das Pankreas wurde anschließend mit einer Schere in 3-4 Teile zerkleinert und zusammen mit dem Medium D, das nochmals für 15 s mit Carbogen begast wurde, in einen 25 ml Erlenmeyerkolben überführt. Der mit Parafilm-Verschlußfolie abgedichtete Erlenmeyerkolben inkubierte anschließend für 10 min auf dem

Wasserbad mit 120 rpm bei 37 °C. Nach der Inkubation wurde das Medium D gegen 5 ml frisches, Carbogen-begastes Medium D ausgetauscht. Der Kolben wurde wieder verschlossen und das Pankreas auf dem Wasserbad für weitere 45 min mit 120 rpm bei 37 °C verdaut. Kurz vor Ende des Verdaus erfolgte die Begasung des Mediums C und des Mediums R für 15 s mit Carbogen. Das Pankreas wurde nach dem Verdau in einer 10 ml serologischen Pipette sechsmal auf- und abgezogen, sodass das Gewebe in kleine Teile zerfiel. Anschließend wurden die Gewebestücke nochmals sechsmal in der 5 ml Pipettenspitze einer 5 ml-Einkanalpipette auf- und abgezogen, um das Gewebe noch weiter zu zerkleinern. Das Pankreas sollte dabei schon so gut zerkleinert sein, dass die Stücke durch die Öffnung der Pipettenspitze aufgezogen werden konnten. Bei diesem Vorgang musste vorsichtig pipettiert werden, da die Azini durch zu schnelles Auf- und Abpipettieren zerstört werden. Die Pankreassuspension wurde durch ein 100 µm Nylon-Zellsieb in ein 50 ml konisches Zentrifugenröhrchen filtriert, wobei die Azini den Filter passieren konnten und ins Filtrat gelangten. Sehr große Azini, unverdaute Stücke sowie Pankreas-Inseln, Ausführungsgänge und Blutgefäße blieben jedoch im Filter hängen. Der Filter wurde abschließend mit 10 ml Medium R gespült, wobei das Filtrat im selben konischen Zentrifugenröhrchen aufgefangen wurde, in dem sich die Azini befanden. Für alle nachfolgenden Schritte wurde das verwendete Medium C kurz vor Gebrauch für 15 s mit Carbogen begast. In jeweils vier 15 ml konische Zentrifugenröhrchen wurden je 5 ml Medium C vorgelegt und die filtrierten Azini auf diese vier Röhrchen verteilt. Dazu wurde die Zellsuspension vorsichtig mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze auf das Medium C pipettiert, sodass es zu keiner Vermischung der beiden Phasen kam. Anschließend wurde 10 min gewartet, bis sich die Azini aus der oberen Schicht über das Medium C auf den Boden des Röhrchens abgesetzt hatten. Der Überstand aus den Röhrchen (überschüssiges Medium) wurde abgenommen und die Zellen wieder in 5 ml frischem Medium C aufgenommen. Danach wurde die Azini-Suspensionen aus je zwei Röhrchen in einem Röhrchen vereint, sodass sich die Azini – aus ursprünglich vier Röhrchen – nun in zwei Röhrchen befanden. Die Azini setzten sich in diesen beiden Röhrchen wieder für etwa 10 min ab, das Medium wurde abgenommen, gefolgt von einer Resuspension der Zellen in 5 ml frischem Medium C. Die Azini-Suspension aus den letzten beiden Röhrchen wurden wieder in einem Röhrchen vereint, sodass alle Azini – aus den ursprünglich vier Röhrchen – nun in einem vereint waren. Nachdem sich die Zellen in diesem Röhrchen abgesetzt hatten, wurde das Medium entfernt. Im Fall einer anschließenden Ca²⁺-Messung, wurden die Azini in 2 ml Ringer-Lösung (s. 3.8.3) aufgenommen und anschließend wie in Kapitel 3.8.3 beschrieben in Matrigel[®] eingebettet. Erfolgte eine Untersuchung der Amylase-Sekretion, wurden die Azini in 25 ml frisch begastem Medium I aufgenommen, in

einen 125 ml Erlenmeyerkolben überführt und der Kolben mit Verschlussfolie abgedichtet. Die Azini „ruhten“ anschließend im Kolben für 30 min auf dem Wasserbad bei 37 °C und 60 rpm, bis die Stimulation der Amylase-Sekretion erfolgte (s. 3.8.2).

Grundmedium für die Isolation von Azinus-Zellen

| Substanz | Menge | [c] |
|------------------------------------|-----------|--------|
| HEPES | 1,908 g | 20 mM |
| NaCl | 2,2 g | 95 mM |
| KCl | 0,14 g | 4,7 mM |
| MgCl ₂ | 0,0488 g | 0,6 mM |
| CaCl ₂ | 0,0764 g | 1,3 mM |
| Glucose | 0,7928 g | 10 mM |
| Nicht-essentielle Aminosäuren 100× | 4 ml | 1× |
| L-Glutamin 200 mM | 4 ml | 2 mM |
| ddH ₂ O (autoklaviert) | ad 400 ml | |

20 min Begasung mit Carbogen
Zugabe von Trypsin-Inhibitor 0,04 g [0,1 mg/ml]
Einstellen auf pH 7,4

Medium D (Verdauungsmedium)

| Menge | Substanz | [c] |
|-------|--------------------|-----------|
| | Kollagenase Typ II | 0,0066 g |
| | | 100 U/ml |
| | BSA | 0,05 g |
| | | 2,5 mg/ml |
| | Grund-medium | ad 20 ml |

Medium R (Waschmedium)

| Menge | Substanz | [c] |
|-------|--------------|----------|
| | BSA | 0,2 g |
| | | 10 mg/ml |
| | Grund-medium | ad 20 ml |

Medium C (Absetzmedium)

| Menge | Substanz | [c] |
|-------|--------------|-----------|
| | BSA | 4 g |
| | | 40 mg/ml |
| | Grund-medium | ad 100 ml |

Medium I (Inkubationsmedium)

| Menge | Substanz | [c] |
|-------|--------------|-----------|
| | BSA | 0,2 g |
| | | 1 mg/ml |
| | Grund-medium | ad 200 ml |

Vor Gebrauch wurden alle verwendeten Medien auf 37 °C erwärmt.

3.8.2 Amylase-Sekretions-Assay

In den isolierten pankreatischen Azini (s. 3.8.1) wurde unter Verwendung von Carbachol die Amylase-Sekretion stimuliert. Diese isolierten Azinus-Zellkomplexe weisen unterschiedliche Größen auf und enthalten daher unterschiedliche Mengen an Amylase. In größeren Zellkomplexen kann somit auch eine größere Menge an Amylase freigesetzt werden. Aus diesem Grund ist es nicht möglich, die Zellen auf eine Zellzahl einzustellen, um anschließend die Amylase-Freisetzung zu vergleichen. Deshalb erfolgte die Berechnung der freigesetzten Amylase hier prozentual des Totalinhaltes an Amylase in den Azini. Dafür wurden 1 ml Aliquote der Azini-Suspension stimuliert und die sezernierte Menge an Amylase als Prozentsatz der Totalmenge an Amylase in diesem 1 ml Aliquot berechnet.

Für die Stimulation der Amylase-Sekretion wurden die isolierten Azini, nachdem sie nach der Isolation für 30 min auf dem Wasserbad geruht haben, in ein 50 ml konisches Zentrifugenröhrchen überführt. Nachdem sich die Zellen für 10 min abgesetzt haben, wurde das überständige Medium entfernt und die Azini wurden in 15 ml frisch begastem Medium I (s. 3.8.1) aufgenommen.

Stimulation der Amylase-Sekretion

Während sich die Azini absetzten, wurde eine 6-Lochplatte mit den Stimulantien vorbereitet. Die Stimulation erfolgte dabei mit 1 μ M und 10 μ M Carbachol, wobei für jede Konzentration eine Doppelbestimmung durchgeführt wurde. Dafür wurden jeweils 10 μ l des Carbachols hundertfach überkonzentriert in die Vertiefungen der 6-Lochplatte vorgelegt und diese dabei jeweils an den Rand des Bodens der Vertiefung pipettiert. Zudem wurde die basale Amylase-Sekretion bestimmt, indem anstelle des Stimulans 10 μ l ddH₂O vorgelegt wurden. Anschließend erfolgte die Zugabe der Azini-Suspension. Mit Hilfe einer Pipettenspitze mit großer Öffnung wurden jeweils 1 ml der Suspension entnommen und an den Rand der Vertiefung der 6-Lochplatte pipettiert, sodass es erst durch Schwenken der Platte zu einer Vermischung mit dem Carbachol kam. Beim Pipettieren musste darauf geachtet werden, dass langsam und vorsichtig pipettiert wurde, um ein vorzeitiges Freisetzen der Amylase aus den Azinus-Zellen zu vermeiden. Außerdem musste die Zellsuspension permanent vorsichtig geschwenkt werden, um eine gleiche Verteilung der Azini und dadurch eine gleichbleibende Konzentration der entnommenen 1 ml Aliquote zu gewährleisten. Nachdem alle Aliquote entnommen waren, wurde die 6-Lochplatte vorsichtig geschwenkt, um das Stimulans mit der Azini-Suspension zu vermischen. Anschließend wurde die Platte für 30 min bei 37 °C und

60 rpm auf dem Wasserbad eingespannt, sodass die Unterseite des Plattenbodens mit dem 37 °C warmen Wasser in Kontakt war.

Während der Inkubationszeit der stimulierten und unstimulierten Proben, wurden die sogenannten Total- und „Zero“-Werte bestimmt. Dazu wurde ein 1 ml Aliquot der Azini-Suspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und sofort mit $2300 \times g$ für 30 s bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde sofort abgenommen, in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gestellt. Dieser Überstand wird als sogenannter „Zero“-Wert bezeichnet und stellt die Amylase-Menge dar, die sich nach dem Zentrifugieren im Medium befindet. Dieser Wert wird anschließend bei der Berechnung von den sezernierten Proben abgezogen. Das bei dieser Zentrifugation erhaltene Zellpellet wurde mit 1 ml Medium I versetzt, mit dem Ultraschall-Homogenisator lysiert und so die gesamte Amylase aus den Zellen freigesetzt. Diese Proben stellten die Totalproben dar, bei denen der Gehalt an Amylase in 1 ml der Azini-Suspension bestimmt wurde. Die Totalproben mussten für die spätere Bestimmung der Amylase-Menge verdünnt werden. Dazu wurden 100 μ l der lysierten Totalproben in 900 μ l eiskaltes Medium I gegeben und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt. Bei den Total- und „Zero“-Proben erfolgte eine Dreifachbestimmung, aus denen anschließend der Mittelwert gebildet wurde.

Nach Ende der 30-minütigen Inkubation der mit Carbachol stimulierten sowie der unstimulierten Proben, wurden die Azini vorsichtig und mit abgeschnittener Pipettenspitze aus der 6-Lochplatte in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und direkt mit $2300 \times g$ für 30 s bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und auf Eis gestellt. Diese Überstände stellten die sezernierten Amylase-Mengen dar und wurden als sezernierte Proben bezeichnet.

Carbachol-Stammlösung 100 mM

| Substanz | Menge | [c] |
|--------------------|---------|--------|
| Carbachol | 0,018 g | 100 mM |
| ddH ₂ O | 1 ml | |

Carbachol-Lösung 1 mM

| Substanz | Menge | [c] |
|---------------------|-----------------|------|
| Carbachol 100 mM | 10 μ l | 1 mM |
| ddH ₂ O | ad 1000 μ l | |

Carbachol-Lösung 100 μ M

| Substanz | Menge | [c] |
|---------------------|-----------|-------------|
| Carbachol 100 mM | 5 μ l | 100 μ M |
| ddH ₂ O | ad 5 ml | |

Bestimmung der Amylase-Menge mittels Phadebas® Amylase Test

Zur quantitativen Bestimmung der α -Amylase-Aktivität und damit der Amylase-Menge in den Proben wurde der Phadebas® Amylase Test verwendet. Dieser beruht auf der Umsetzung eines blau gefärbten, wasserunlöslichen Stärkepolymers zu blauen, wasserlöslichen Fragmenten durch die α -Amylase. Die Intensität der Blaufärbung kann anschließend bei 620 nm photometrisch bestimmt werden.

Eine Test-Tablette wurde dazu in einem Erlenmeyerkolben in 14 ml ddH₂O unter ständigem Rühren suspendiert und stellte das Phadebas®-Reagenz dar. In einer 12-Lochplatte wurden jeweils 10 μ l der zu analysierenden Total-, „Zero“- und sezernierten Proben vorgelegt und mit 1 ml Phadebas®-Reagenz versetzt. Zudem wurde ein Nullwert, bei dem 10 μ l ddH₂O verwendet wurden, bestimmt. Bei der Entnahme des Phadebas®-Reagenz musste der Erlenmeyerkolben ständig geschwenkt werden, um eine gleichmäßige Verteilung des unlöslichen Stärkepolymers zu gewährleisten. Anschließend wurden die Proben für 20 min bei 37 °C auf dem Wasserbad mit 150 rpm inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 300 μ l 0,5 M NaOH gestoppt, die Proben in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, bei 5000 \times g für 5 min zentrifugiert und der Überstand bei 620 nm photometrisch gegen den Nullwert vermessen. Die Berechnung erfolgte, indem zunächst der „Zero“-Wert, der die Amylase-Menge des Mediums nach Zentrifugation der Proben darstellte, von den Extinktionen der sezernierten Proben abgezogen wurde:

$$A'_{sez} = A_{sez} - A_{zero}$$

A_{sez} stellt dabei die gemessene Extinktion der sezernierten Proben bei 620 nm dar. A_{zero} bezeichnet die Extinktion der „Zero“-Proben bei 620 nm.

Die anschließende Berechnung der Amylase-Sekretion erfolgte als Prozent des Totalinhaltes an Amylase nach der folgenden Formel:

$$\text{sezernierte Amylase [\%]} = \frac{A'_{sez}}{A_{Total}} \times 100 \%$$

A'_{sez} stellt dabei die Extinktion der sezernierten Proben dar, bei denen bereits der „Zero“-Wert abgezogen wurde. A_{Total} bezeichnet die Extinktion der Totalproben. Von den Doppelbestimmungen der sezernierten Proben und den Dreifachbestimmungen der Total- und „Zero“-Proben wurde jeweils der Mittelwert der Extinktionen verwendet.

3.8.3 Messung der Ca^{2+} -Freisetzung in isolierten pankreatischen Azini

Zur Messung der Ca^{2+} -Freisetzung wurden die isolierten Azini (s. 3.8.1) direkt nach der Isolation in 2 ml Ringer-Lösung aufgenommen und in Matrigel[®] eingebettet. Bei Matrigel[®] handelt es sich um eine extrazelluläre Matrix, die für *in vitro* Experimente in 2D, aber auch für 3D Zellkulturen geeignet ist. Durch Einbetten der Azini in die Matrix konnten diese auf einem Deckgläschen für die anschließende Messung aufgebracht werden. Das Matrigel[®] wurde zunächst langsam auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 50 μl des flüssigen Gels mit 30 μl der Azini-Suspension vorsichtig mit abgeschnittener Pipettenspitze gemischt, sodass die Azini dabei nicht zerstört wurden. 10 μl dieser Mischung wurden auf ein 18 mm Deckgläschen, das sich in der Vertiefung einer 12-Lochplatte befand, pipettiert. Die 12-Lochplatte wurde für 20 min im CO_2 -Inkubator (5 % CO_2) bei 37 °C inkubiert, wodurch das Matrigel[®] fest werden konnte. Nach dem Aushärten wurde je 1 ml Ringer-Lösung auf jedes Deckgläschen pipettiert und die Zellen ruhten für weitere 30 min bei 37 °C im CO_2 -Inkubator. Die Azini wurden anschließend mit 1 μM Fura-2-AM (s. 3.5.5) und zusätzlich 0,02 % Pluronic[®] (Poloxamer 407), welches die Membran der Azinus-Zellen für Fura-2-AM permeabler macht, beladen und für 1,5 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Ca^{2+} -Freisetzung nach Stimulation mit 1 μM und 10 μM Carbachol am Axiovert S100-Mikroskop (Lehrstuhl Physiologie II, Universität Regensburg) gemessen. Dazu wurde das Deckgläschen aus der Vertiefung der 12-Lochplatte genommen und mit Hilfe einer Klebepaste auf eine Kammer aufgeklebt, sodass sich die in Matrigel[®] eingebetteten Zellen in der Öffnung der Kammer befanden. Die Zellen wurden mit 500 μl Ringer-Lösung überschichtet und die Kammer am Mikroskop eingespannt. Die Kammer besitzt dabei sowohl einen Zulauf, über den das Carbachol oder die Ringer-Lösung durch einen Schlauch eingebracht werden kann sowie einen Ablauf, der an eine Pumpe angeschlossen ist und überschüssige Flüssigkeit in der Kammer wieder absaugt. Über dieses System können die Zellen permanent mit den jeweiligen Konzentrationen an Carbachol oder mit Ringer-Lösung gespült werden. Die Schläuche des Zulaufsystems werden dabei durch ein Wasserbad so temperiert, dass die Lösungen auf 37 °C erwärmt werden. Die Anregung von Fura-2 erfolgte bei 340 nm und 380 nm durch Verwendung eines high-speed Polychromator-Systems und die Aufnahme der Emission bei 510 nm mit Hilfe einer CoolSnap HQ CCD Kamera. Dabei erfolgte jede Sekunde eine Messung. Für die Messung und Auswertung wurde die Software MetaFluor verwendet.

Die Azini wurden bei der Messung zunächst für 2 min mit Ringer-Lösung äquilibriert, anschließend für 2 min mit 1 μM Carbachol stimuliert und wieder für 2 min mit Ringer-Lösung

gespült. Nachfolgend wurde nochmals mit 10 μM Carbachol stimuliert. Die Berechnung der Ratios erfolgte direkt durch das Programm MetaFluor. Die Ratios konnten nachfolgend in eine Excel-Datei konvertiert werden und daraus eine Freisetzungskurve erstellt werden. Für die Auswertung wurde das maximale Fluoreszenz-Ratio 340/380 nach Stimulation mit Carbachol sowie das basale Ratio unter Ringer-Perfusion bestimmt. Weiterhin konnte die *area under the curve* (AUC) der Freisetzungskurve über einen Zeitraum von 2 min – als Maß für die insgesamt freigesetzte Ca^{2+} -Menge – sowie die Steigung der Kurve – als Maß für die Geschwindigkeit der Ca^{2+} -Freisetzung – nach Stimulation mit Carbachol berechnet werden.

Carbachol-Stammlösung 100 mM

| Substanz | Menge | [c] |
|---------------|---------|--------|
| Carbachol | 0,018 g | 100 mM |
| Ringer-Lösung | 1 ml | |

Carbachol-Lösung 1 mM

| Substanz | Menge | [c] |
|-------------------------|------------------|------|
| Carbachol-Lösung 100 mM | 50 μl | 1 mM |
| Ringer-Lösung | ad 5 ml | |

Carbachol-Lösung 1 μM

| Substanz | Menge | [c] |
|-----------------------|-------------------|-----------------|
| Carbachol-Lösung 1 mM | 200 μl | 1 μM |
| Ringer-Lösung | ad 200 ml | |

Carbachol-Lösung 10 μM

| Substanz | Menge | [c] |
|-----------------------|-----------|------------------|
| Carbachol-Lösung 1 mM | 2 ml | 10 μM |
| Ringer-Lösung | ad 200 ml | |

Ringer-Lösung

| Substanz | Menge | [c] |
|--|------------|--------|
| NaCl | 8,474 g | 145 mM |
| KH_2PO_4 | 0,054 g | 0,4 mM |
| $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ | 0,365 g | 1,6 mM |
| Glucose | 0,901 g | 5 mM |
| $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0,203 g | 1 mM |
| Ca-Gluconat $\cdot \text{H}_2\text{O}$ | 0,583 g | 1,3 mM |
| ddH ₂ O | ad 1000 ml | |

Pluronic 10 % (m/V)

| Substanz | Menge | [c] |
|----------------------------|--------|------|
| Pluronic [®] F127 | 200 mg | 10 % |
| ddH ₂ O | 2 ml | |

Einstellen auf pH 7,4

3.9 Histologische Methoden

3.9.1 Herstellung histologischer Präparate (Paraffinschnitte)

Die Herstellung histologischer Präparate erfolgte in Anlehnung an *Schinner et al.* [108].

Entwässern und Einbetten der Gewebe

Die nach der Organentnahme in 3 % PFA fixierten und in 70 % Methanol (MeOH) gelagerten Pankreasstücke (s. 3.3) wurden in Einbettkassetten überführt und durch eine Methanolreihe in aufsteigender Konzentration (70 % MeOH, 75 % MeOH, 80 % MeOH, 85 % MeOH, 90 % MeOH, 95 % MeOH, zweimal 100 % MeOH) dehydriert. Dabei erfolgte eine jeweils 30-minütige Inkubation in den Methanol-Lösungen bei RT unter Schütteln. Anschließend wurden die Gewebe zweimal für je 30 min bei RT in 100 % Isopropanol eingelegt. Zum Abschluss der Entwässerung erfolgte eine Inkubation in 100 % Isopropanol für 30 min bei 60 °C. Um das Gewebe mit Paraffin zu durchsetzen, wurden die Pankreata zunächst für 30 min bei 60 °C in einer Mischung aus gleichen Teilen 100 % Isopropanol und flüssigem Paraffin gelagert. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation über Nacht in reinem flüssigem Paraffin bei 60 °C. Am nächsten Tag wurde dieses gewechselt, gefolgt von einer abschließenden 24-stündigen Inkubation bei 60 °C.

Nach der Durchsetzung mit Paraffin erfolgte die Einbettung des Gewebes. Hierfür wurden spezielle Schälchen auf einer Heizplatte erwärmt und die Vertiefung der Schälchen mit flüssigem Paraffin aufgefüllt. Auf diesen Schälchen wurde ein Einbettring positioniert, der die Form des Paraffinblocks bildet. Das Gewebe wurde aus den Einbettkassetten entnommen und auf den Schälchen in der Mitte der Einbettrings positioniert. Anschließend wurde das gesamte Gewebe in dem Einbettring mit flüssigem Paraffin komplett ausgegossen. Nachdem der Block erstarrt war, kühlte dieser für 1 h auf Eis weiter ab, bevor er anschließend bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung lagerte.

Anfertigen von Paraffinschnitten

Zum Anfertigen der Gewebeschnitte wurde der Paraffinblock zunächst für 1 h bei -20 °C gekühlt, damit der Block hart genug war, um ihn zu schneiden. Daraufhin wurde dieser in das Rotationsmikrotom eingespannt und 2,5 µm dicke Schnitte des Pankreas angefertigt. Die Schnitte wurden in ein auf 37 °C temperiertes Wasserbad überführt, um sie dort zu strecken. Danach konnten diese möglichst faltenfrei auf einen Polylysin-beschichteten Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank getrocknet werden.

Entparaffinierung und Rehydrierung der Gewebe

Für die anschließende Hämatoxylin-Eosin-Färbung (s. 3.9.5) oder für immunhistochemische Untersuchungen (s. 3.9.4) mussten die Gewebe entparaffiniert und rehydriert werden. Dazu wurden die Objektträger zweimal für 10 min in Xylol, dreimal 5 min in 100 % Isopropanol und zweimal 5 min in 100 % MeOH inkubiert. Abschließend wurden die Schnitte für 2 min in ddH₂O getaucht.

3.9.2 Herstellung histologischer Präparate (Kryoschnitte)*Kryoprotektion der Gewebe*

Die Kryoprotektion erfolgte gemäß der Anleitung nach *Straubinger et al.* [120]. Um eine Zerstörung des Gewebes durch das Einfrieren zu verhindern, musste eine Kryoprotektion durchgeführt werden, bei der den Geweben durch einen Saccharose-Gradienten Wasser entzogen wurde. Nach der Organentnahme (s. 3.3) erfolgte eine vierstündige Fixierung in 3 % PFA, gefolgt von dreimaligem Waschen mit PBS pH 7,4 für je 20 min in einem 15 ml konischem Zentrifugenröhrchen und nachfolgender Inkubation für 1 h in einer 5 % Saccharose-Lösung. Anschließend wurden die Gewebe über Nacht in eine 10 % Saccharose-Lösung überführt. Am nächsten Tag wurden die Gewebe in eine 20 % Saccharose-0,05 % NaN₃-Lösung gegeben, wo diese nochmals für 24 h inkubierten. Alle Schritte ab der Organentnahme fanden bei 4 °C und auf dem Schüttler statt. Damit war die Kryoprotektion abgeschlossen und die Gewebe konnten in Tissue-Tek[®] Medium eingebettet werden.

Natriumazid-Lösung 10 % (m/V)

| Substanz | Menge | [c] |
|--|----------|------|
| NaN ₃ | 1 g | 10 % |
| ddH ₂ O (autoklavieren) | ad 10 ml | |
| Lösung sterilfiltrieren Lagerung bei 4 °C | | |

PBS pH 7,4

| Substanz | Menge |
|--|------------|
| PBS | 1 Tablette |
| ddH ₂ O | 200 ml |
| Einstellen auf pH 7,4 Lösung sterilfiltrieren | |

Saccharose-Lösung 5 % (m/V)

| Substanz | Menge | [c] |
|------------------|----------|-----|
| D-(+)-Saccharose | 0,5 g | 5 % |
| PBS pH 7,4 | ad 10 ml | |

Lösung sterilfiltrieren

Saccharose-Lösung 10 % (m/V)

| Substanz | Menge | [c] |
|------------------|----------|------|
| D-(+)-Saccharose | 1,0 g | 10 % |
| PBS pH 7,4 | ad 10 ml | |

Lösung sterilfiltrieren

Saccharose-Lösung 20 % (m/V)

| Substanz | Menge | [c] |
|-----------------------|----------|--------|
| D-(+)-Saccharose | 2 g | 20 % |
| NaN ₃ 10 % | 50 µl | 0,05 % |
| PBS pH 7,4 | ad 10 ml | |

Lösung sterilfiltrieren

Einbetten der Gewebe in Tissue-Tek[®] Medium

Für das Einbetten der Gewebe wurden aus Alufolie kleine Formen hergestellt. Der Boden der Form wurde mit Tissue-Tek[®] Einbettmedium befüllt und dieses bei -70 °C angefroren. Anschließend wurde das Gewebe in dem Förmchen auf dem Medium platziert und mit Tissue-Tek[®] überschichtet, bis alles bedeckt war. Die Förmchen wurden zum Aushärten und bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

Herstellung der Kryoschnitte

Die Blöcke wurden zunächst 24 h vor dem Schneiden bei -20 °C aufgetaut. Zum Schneiden wurden diese im Kryotom mit Hilfe von Tissue-Tek[®] auf einer speziellen Platte angefroren und diese anschließend in die dafür vorgesehene Schneidevorrichtung eingespannt. Die Temperaturen, bei denen das Pankreas geschnitten werden konnte, wurden dabei so gewählt, dass die Kühltemperatur im Kryotom bei -20 °C und die Temperatur des Objektisches, auf dem das Gewebe eingespannt war, bei -15 °C lag. Die Anfertigung der Schnitte erfolgte mit einer Schnittdicke von 8 µm. Anschließend wurden die Kryoschnitte auf Superfrost Plus[®] Objektträger aufgebracht und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.9.3 X-Gal Färbung

Die X-Gal Färbung dient als Nachweis für die *lacZ*-Reporter-Expression. Das *lacZ*-Gen, das für eine β -Galactosidase kodiert, ist hierbei der Reporter für IRAG2 und wird unter Kontrolle des *Irag2*-Promotors exprimiert. Im IRAG2-Knockout wird somit in Organen oder Zellen, in denen eigentlich IRAG2 vorhanden ist, die β -Galactosidase exprimiert (s. 3.1.2). Diese β -Galactosidase kann in histologischen Präparaten dargestellt werden, indem sie das Substrat X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- β -D-Galactopyranosid) zu 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl und Galactose umsetzt. 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl wird wiederum durch Luftsauerstoff zum tiefblauen, unlöslichen 5,5'-Dibrom-4,4'-Dichlor-Indigo oxidiert (s. Abbildung 3-4) [16].

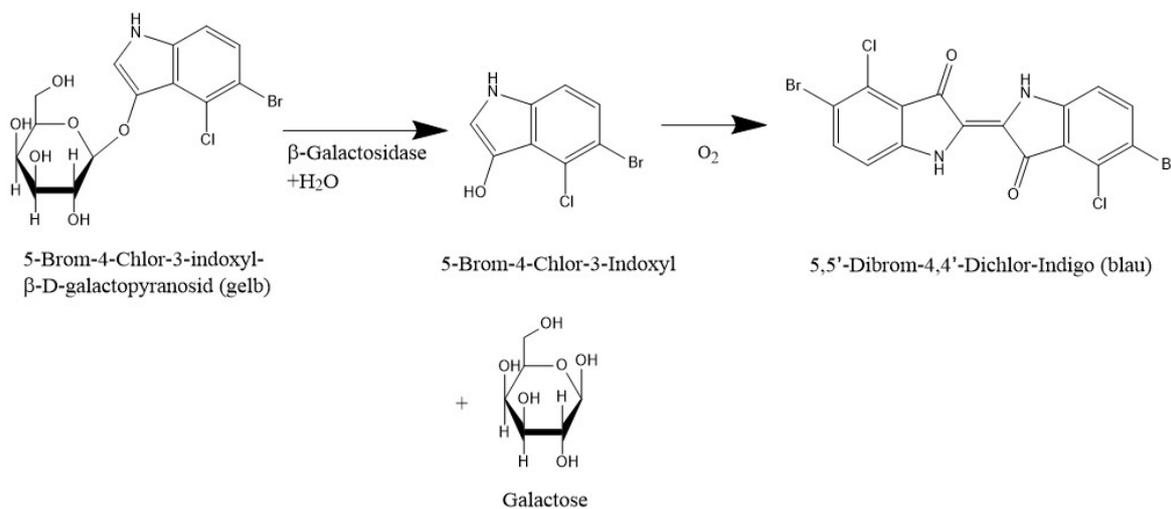


Abbildung 3-4: Prinzip der X-Gal Färbung

Eine weitere Erläuterung befindet sich im Text.

Die X-Gal Färbung wurde an Kryoschnitten (s. 3.9.2) in Anlehnung an die Publikationen von *Lukowski et al.*, *West et al.* und *Schelter et al.* durchgeführt [76, 106, 137]. Die Schnitte tauten 30 min vor der Färbung auf und wurden in einer Färbeküvette für 20 min in eiskaltem Aceton fixiert. Für den weiteren Ablauf der Färbung befanden sich die Objektträger in einer mit Wasser befüllten Feuchtkammer, die mit einem Deckel verschlossen werden konnte. Die Gewebeschnitte wurden mit einem Fettstift umrandet und mit 3 % Triton X-100-Lösung für 30 min bei RT permeabilisiert. Anschließend wurden die Schnitte dreimal 5 min mit PBS gewaschen und nachfolgend mit der X-Gal Gebrauchslösung für 20 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Pro Objektträger wurden, je nach Schnittgröße, 600 μ l der Gebrauchslösung verwendet. Am nächsten Tag wurden die Objektträger dreimal je 5 min mit PBS gewaschen

und in einer 10 % Formaldehyd-Lösung für 5 min bei RT nachfixiert. Vor der Gegenfärbung wurden die Schnitte jeweils zweimal 5 min mit PBS und zweimal 5 min ddH₂O gewaschen. Die Gegenfärbung der Schnitte erfolgte mit Kernechtrot-Lösung für 60 s. Diese dient dazu, dass die Strukturen des Gewebes besser erkennbar waren. Zum Abschluss wurden die Schnitte dreimal 5 min mit PBS gewaschen und anschließend mit Glycergel[®] und einem Deckgläschen eingebettet. Die Objektträger wurden bei 4 °C gelagert und am nächsten Tag am Mikroskop ausgewertet. Die Bildverarbeitung erfolgte mit Hilfe der Software AxioVision Rel. 4.8.

PBS pH 7,7

| Substanz | Menge |
|--|------------|
| PBS | 1 Tablette |
| ddH ₂ O (autoklaviert) | 200 ml |
| Einstellen auf pH 7,7 Lösung sterilfiltrieren | |

Formaldehyd-Lösung 10 %

| Substanz | Menge | [c] |
|-----------------------------|----------|------|
| Formaldehyd- Lösung 37 % | 2,5 ml | 10 % |
| PBS | ad 10 ml | |

X-Gal Stammlösung

| Substanz | Menge | [c] |
|----------|--------|----------|
| X-Gal | 6 mg | 40 mg/ml |
| DMSO | 150 µl | |

MgCl₂-Lösung 1 M

| Substanz | Menge | [c] |
|--------------------------------------|-------|-----|
| MgCl ₂ ·6H ₂ O | 2 g | 1 M |
| PBS | 10 ml | |

Triton X-100-Lösung 0,3 % (V/V)

| Substanz | Menge | [c] |
|--------------|--------|-------|
| Triton X-100 | 300 µl | 0,3 % |
| PBS | 100 ml | |

X-Gal Gebrauchslösung

| Substanz | Menge | [c] |
|----------------------|---------|----------|
| X-Gal Stammlösung | 150 µl | 1 Teil |
| Färbelösung | ad 6 ml | 39 Teile |

Lösung sterilfiltrieren*Färbelösung*

| Substanz | Menge | [c] |
|---|---------|------|
| K ₄ [Fe(CN) ₆] ·3H ₂ O | 13 mg | 5 mM |
| K ₃ [Fe(CN) ₆] | 9,9 mg | 5 mM |
| MgCl ₂ 1 M | 12 µl | 2 mM |
| PBS | ad 6 ml | |

3.9.4 Immunhistochemische Färbungen des Pankreas

Bei der Immunhistochemie können bestimmte Antigene in Geweben mit Hilfe von Antikörpern detektiert werden. Dadurch ist es möglich, die Expression und Lokalisation ausgewählter Proteine zu analysieren. Für die Immunfluoreszenz werden dabei Sekundärantikörper verwendet, an die ein Fluorophor gekoppelt ist. Die Fluoreszenz kann anschließend detektiert sowie deren Intensität quantifiziert werden.

Die immunhistochemischen Untersuchungen des Pankreas wurden an den entparaffinierten und rehydrierten Paraffinschnitten durchgeführt (s. 3.9.1). Um die, durch die Fixierung zerstörte, Immunreaktivität der Antigene des Gewebes teilweise wiederherzustellen, erfolgte zunächst eine Antigendemaskierung. Dazu wurden die Schnitte für 30 min in Tris/EDTA-Puffer gekocht, diese auf RT abgekühlt und in einer Färbeküvette für zweimal 5 min mit PBS (Zusammensetzung s. 3.3) gewaschen. Nachdem die Flüssigkeitsreste mittels Wasserstrahlpumpe abgesaugt und die Schnitte mit einem Fettstift umrandet wurden, erfolgte eine Blockierung der Gewebe mit 600 µl 10 % Horse-Serum (in 1 % BSA-PBS) für 2 h bei RT in einer Feuchtkammer. Nach dem Entfernen der Blockier-Lösung wurden 600 µl des in 1 % BSA-PBS verdünnten Primärantikörpers (s. Tabelle 2.3) auf die Gewebeschnitte verteilt und diese über Nacht in der Feuchtkammer bei 4 °C inkubiert. Um den überschüssigen Primärantikörper zu entfernen, wurden die Gewebe am nächsten Tag dreimal für 5 min mit 1 % BSA-PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine zweistündige Inkubation im Dunkeln bei RT mit dem Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist. Der Sekundärantikörper (s. Tabelle 2.4) wurde in 1 % BSA-PBS verdünnt, das zusätzlich mit 1 µg/ml DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) versetzt war. Bei DAPI handelt es sich dabei um einen Fluoreszenzfarbstoff, der im Zellkern in die DNA interkaliert und somit die Zellkerne unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar macht. Abschließend wurden die Schnitte nochmals für dreimal 5 min mit PBS gewaschen und kurz in ddH₂O eingetaucht. Nach Absaugen der überschüssigen Flüssigkeit mittels Wasserstrahlpumpe wurden die Gewebe mit Glycergel[®] und einem Deckgläschen eingebettet und bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

Nach dem Aushärten des Eindeckmediums konnten die Gewebeschnitte am Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden. Die Bildverarbeitung erfolgte mit Hilfe der Software AxioVision Rel. 4.8, während die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität mit der Software MetaMorph[®] durchgeführt wurde.

Tris/EDTA-Puffer

| Substanz | Menge | [c] |
|------------------------------|------------|--------|
| Tris | 1,2 g | 10 mM |
| EDTA | 0,372 g | 1,3 mM |
| ddH ₂ O | ad 1000 ml | |
| Einstellen auf pH 8,5 | | |

1 % BSA-PBS (m/V)

| Substanz | Menge | [c] |
|----------|---------|-----|
| BSA | 0,5 g | 1 % |
| PBS | ad 50ml | |

3.9.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung des Pankreas

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) dient der morphologischen Darstellung von Gewebestrukturen in einem histologischen Präparat. Durch Hämatoxylin können saure Strukturen blau und durch Eosin die basischen Strukturen rot gefärbt werden. Die HE-Färbung wurde an Paraffinschnitten durchgeführt, die zuvor entparaffiniert und rehydriert wurden (s. 3.9.1). Zunächst wurden die Schnitte für 20 s in Hämatoxylin-Lösung inkubiert, für 10 s in ddH₂O gewaschen und zweimal kurz in 0,1 % Ammoniumhydroxid-Lösung getaucht. Anschließend wurden die Objektträger wieder für zweimal 2 min in ddH₂O gewaschen und für 1,5 min in 0,1 % saurer Eosin Y-Lösung inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen der Schnitte für 2 min mit ddH₂O, erfolgte eine dreiminütige Inkubation in 80 % Ethanol. Abschließend mussten die Gewebe für das spätere Einbetten wieder dehydriert werden. Dazu wurden die Schnitte für 3 min in 100 % Ethanol und darauffolgend für 5 min in Xylol inkubiert. Nachdem das Xylol verdampft war, wurden die Gewebeschnitte mit DePeX eingebettet.

0,1 % Ammoniumhydroxid-Lösung (V/V)

| Substanz | Menge | [c] |
|----------------------|-----------|-------|
| NH ₃ 25 % | 2 ml | 0,1 % |
| ddH ₂ O | ad 500 ml | |

0,5 % Eosin Y-Lösung (m/V)

| Substanz | Menge | [c] |
|--------------------|-----------|-------|
| Eosin Y | 1 g | 0,5 % |
| ddH ₂ O | ad 200 ml | |

0,1 % saure Eosin Y-Lösung (V/V)

| Substanz | Menge | [c] |
|-------------------------|-----------|-------|
| Eosin Y-Lösung 0,5 % | 40 ml | 0,1 % |
| ddH ₂ O | ad 200 ml | |

Ansäuern mit 6 Tropfen Eisessig

3.10 Statistische Auswertung

Für alle Berechnungen wurden Microsoft Excel oder GraphPad Prism 5.01 verwendet. Statistische Auswertungen erfolgten dabei mittels GraphPad Prism 5.01. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert mit dem Standardfehler angegeben (SEM). Für die statistischen Berechnungen von Signifikanzen wurde zunächst der Shapiro-Wilk Test auf Normalverteilung durchgeführt. Normalverteilte Parameter wurden durch einen zweiseitigen ungepaarten Students t-Test analysiert. Für nicht normalverteilte Parameter wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney Test angewandt. Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt dargestellt: (*) ($p < 0,05$), (**) ($p < 0,01$) und (***) ($p < 0,001$).

4 Ergebnisse

4.1 Funktion von IRAG2 in Thrombozyten

4.1.1 Expression von IRAG2 in Thrombozyten

Aufgrund der Expression von IRAG1 in Thrombozyten stellte sich die Frage, ob auch dessen Homolog IRAG2 in murinen Thrombozyten lokalisiert ist [2]. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden lacZ × IRAG2-KO Mäuse verwendet, welche unter Kontrolle des *Irag2*-Promotors eine β -Galactosidase exprimieren. Diese wiederum kann als Reporter für die IRAG2-Expression genutzt werden (s. 3.1.2). Bei der Western Blot Analyse der Thrombozyten-Lysate war eine Expression der β -Galactosidase in Thrombozyten der lacZ × IRAG2-KO Mäuse zu erkennen, jedoch nicht in denen der IRAG2-WT Mäuse (s. Abbildung 4-1 A).

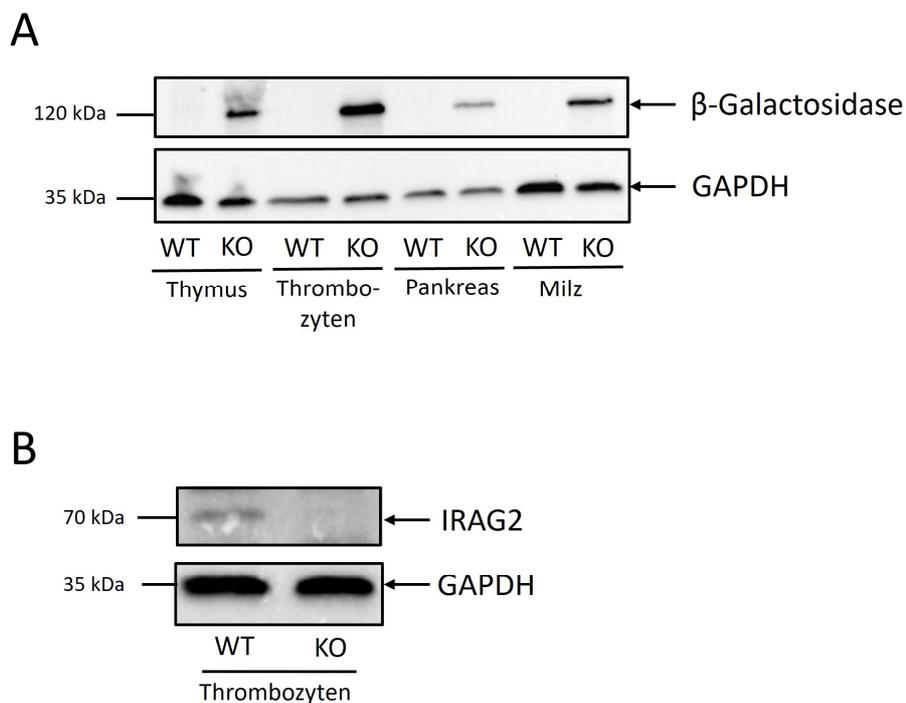


Abbildung 4-1: Expression von IRAG2 in Thrombozyten

A: Repräsentativer Western Blot der Expression der β -Galactosidase als Reporter für IRAG2 in Thrombozyten von IRAG2-WT (WT) und lacZ × IRAG2-KO (KO) Mäusen. **B:** Repräsentative Proteinexpression von IRAG2 in Thrombozyten von IRAG2-WT (WT) und IRAG2-KO (KO) Tieren. Als Ladungskontrolle wurde GAPDH verwendet (**A, B**).

IRAG2: Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor assoziiertes 2; GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

Als Kontrollen wurden Lysate von Thymus, Pankreas und Milz verwendet, bei denen ebenfalls eine β -Galactosidase-Expression in den jeweiligen Organen der lacZ × IRAG2-KO Tiere

beobachtet werden konnte. In den Organen der IRAG2-WT Tiere war hingegen keine β -Galactosidase detektierbar (s. Abbildung 4-1 A). Die Expression von IRAG2 wurde zudem direkt durch einen IRAG2-Antikörper mittels Western Blot überprüft. Dabei war eine Expression von IRAG2 in Thrombozyten der IRAG2-WT Mäuse zu sehen, jedoch nicht in denen der IRAG2-KO Mäuse (s. Abbildung 4-1 B).

Zusammenfassend war IRAG2 somit direkt über den IRAG2-Antikörper in IRAG2-WT Thrombozyten, als auch indirekt über die β -Galactosidase-Expression in lacZ \times IRAG2-KO Thrombozyten nachweisbar.

4.1.2 Analyse der Interaktionspartner von IRAG2 in Thrombozyten

Interaktionspartner von Proteinen können mit Hilfe der Co-Immunpräzipitation identifiziert werden. Da IRAG1 in Thrombozyten einen trimären Komplex mit dem IP₃R1 sowie der PKGI β bildet [2], wurden nun die Interaktionspartner von IRAG2 in Thrombozyten analysiert. Bei der Immunpräzipitation von IRAG2 mittels IRAG2-spezifischem Antikörper und anschließender Detektion der co-immunpräzipitierten Proteine kam es zu einer Anreicherung von IRAG2 im immunpräzipitierten IRAG2-WT, verglichen mit den Input-Proben des Wildtyps. Keine IRAG2-Bande war dagegen erkennbar in den Input-Proben oder in den mit IRAG2-spezifischem Antikörper präzipitierten Proben des IRAG2-KO. Zudem zeigte sich in IRAG2-WT Thrombozyten eine Fällung von IRAG2 zusammen mit allen IP₃-Rezeptor Subtypen (IP₃R1, IP₃R2 und IP₃R3). Der in den IRAG2-WT Proben co-immunpräzipitierte IP₃R2 verlief dabei jedoch etwas tiefer als in den Input Proben. In IRAG2-KO Thrombozyten wurde dagegen kein IRAG2 ausgefällt und somit waren keine Banden für IP₃R1, IP₃R2 und IP₃R3 detektierbar. Zudem wurde keine direkte Interaktion von IRAG2 mit der PKGI β oder IRAG1 festgestellt (s. Abbildung 4-2 A). Bei der Detektion der PKGI β war sowohl im immunpräzipitierten IRAG2-WT als auch im mit IRAG2-Antikörpern gefällten IRAG2-KO eine unspezifische Bande zu sehen, die unterhalb der Input Banden der PKGI β verlief. Diese Bande ist auf den bei der Fällung verwendeten IRAG2-Antikörper zurückzuführen, da diese auch bei der Antikörper-Kontrolle auftrat, bei der sich nur der Antikörper und kein Lysat im Ansatz befand. Bei Detektion mit den anderen verwendeten Antikörpern war hingegen keine unspezifische Bande detektierbar, die auf den IRAG2-Antikörper zurückzuführen ist (s. Abbildung 4-2 B).

Um auszuschließen, dass IRAG2 direkt mit IRAG1 interagiert und somit möglicherweise einen Makrokomples in Thrombozyten bildet, wurde zusätzlich eine Fällung von IRAG1 mit IRAG1-

spezifischem Antikörper durchgeführt und anschließend die Interaktionspartner von IRAG1 im Western Blot analysiert (s. Abbildung 4-2 C).

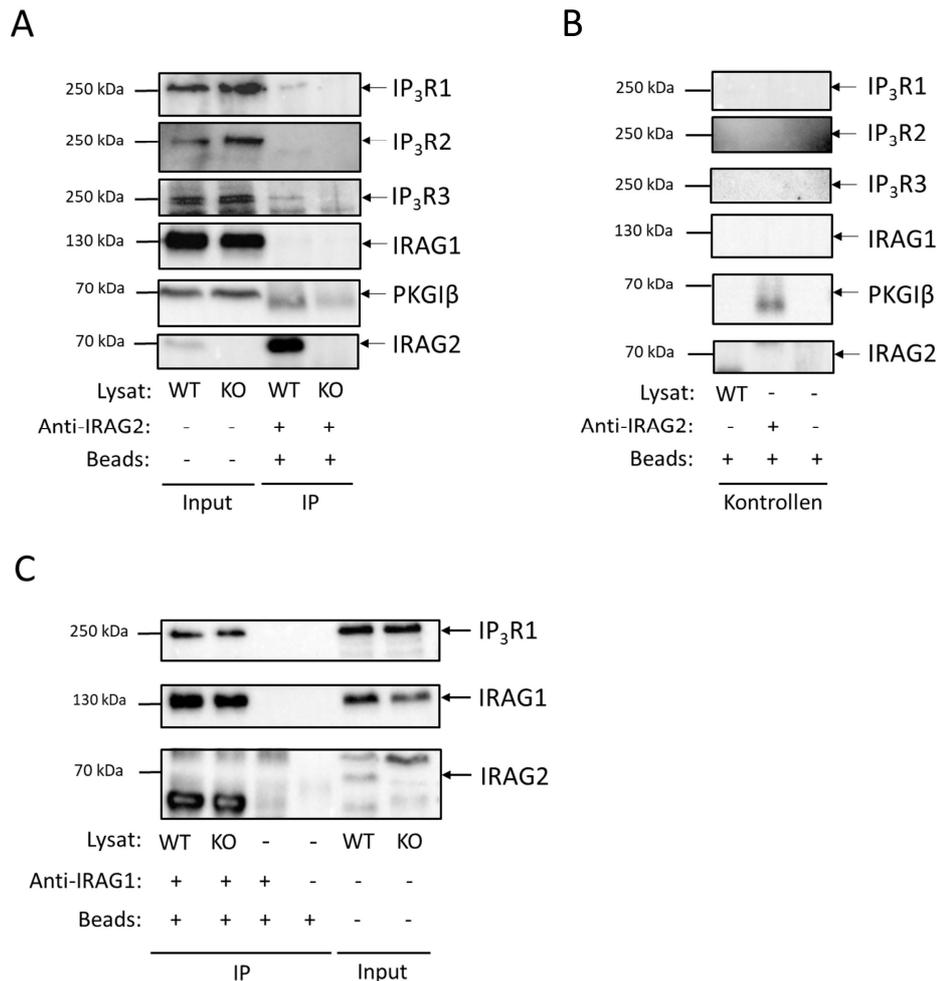


Abbildung 4-2: Interaktionspartner von IRAG2 in murinen Thrombozyten

A: Repräsentative Western Blot Analyse der co-immunpräzipitierten Interaktionspartner von IRAG2 nach Fällung von IRAG2 mittels IRAG2-spezifischem Antikörper (Anti-IRAG2). Für die Immunpräzipitation (IP) wurden 1000 µg Thrombozyten-Lysat von IRAG2-WT (WT) und IRAG2-KO (KO) Tieren verwendet. Als Input Proben wurden 70 µg ungefälltes Thrombozyten-Protein von IRAG2-WT (WT) und IRAG2-KO (KO) Tieren aufgetragen. **B:** Der Kontroll-Blot zeigt die Lysat-Kontrolle, die IRAG2-Antikörper-Kontrolle und die Beads-Kontrolle. **C:** Repräsentative Western Blot Analyse der co-immunpräzipitierten Interaktionspartner von IRAG1 nach Fällung von IRAG1 mittels IRAG1-spezifischem Antikörper (Anti-IRAG1). Weiterhin sind die IRAG1-Antikörper-Kontrolle und die Beads-Kontrolle aufgetragen. Für die Immunpräzipitation wurden 1000 µg Thrombozyten-Lysat von IRAG2-WT (WT) und IRAG2-KO (KO) Tieren verwendet. Als Input Proben wurden 70 µg ungefälltes Thrombozyten-Protein von IRAG2-WT (WT) und IRAG2-KO (KO) Tieren aufgetragen. Aufnahmen des Totalproteins sind in Kapitel 8.4 (s. Abbildung 8-1) zu finden.

IRAG1: Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor assoziiertes cGMP Kinase Substrat 1; IRAG2: Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor assoziiertes 2; PKGIβ: cGMP-abhängige Proteinkinase Iβ; IP₃R1: Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor Typ 1; IP₃R2: Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor Typ 2; IP₃R3: Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor Typ 3.

Die Fällung von IRAG1 ergab, wie zu erwarten, eine Interaktion von IRAG1 mit dem IP₃R1 sowohl in Thrombozyten von IRAG2-WT als auch von IRAG2-KO Mäusen. Es wurde jedoch weder im IRAG2-WT, noch im IRAG2-KO bei Fällung mit dem IRAG1-Antikörper eine

IRAG2 Bande detektiert (s. Abbildung 4-2 C). In murinen Thrombozyten findet somit eine Interaktion von IRAG2 mit allen IP₃-Rezeptor Subtypen statt, jedoch zeigt sich keine direkte Interaktion von IRAG2 mit der PKGI β oder mit IRAG1.

4.1.3 Expression von Proteinen des NO/cGMP/PKG-Signalweges in Thrombozyten

Da IRAG2 mit den verschiedenen IP₃-Rezeptor Subtypen interagiert (s. 4.1.2), wurde die Expression der IP₃-Rezeptor Subtypen 1, 2 und 3 sowie anderer Signalproteine des NO/cGMP/PKG-Signalweges in Thrombozyten-Lysaten von IRAG2-WT und IRAG2-KO Tieren mittels Western Blot analysiert. Dazu wurde die Intensität der Banden quantifiziert und auf das Totalprotein der jeweiligen Spur normiert. Die Expression von IP₃R1, IP₃R2 und IP₃R3 zeigte dabei keine Unterschiede zwischen Thrombozyten von IRAG2-WT und IRAG2-KO Mäusen (s. Abbildung 4-3 A, B, C, F).

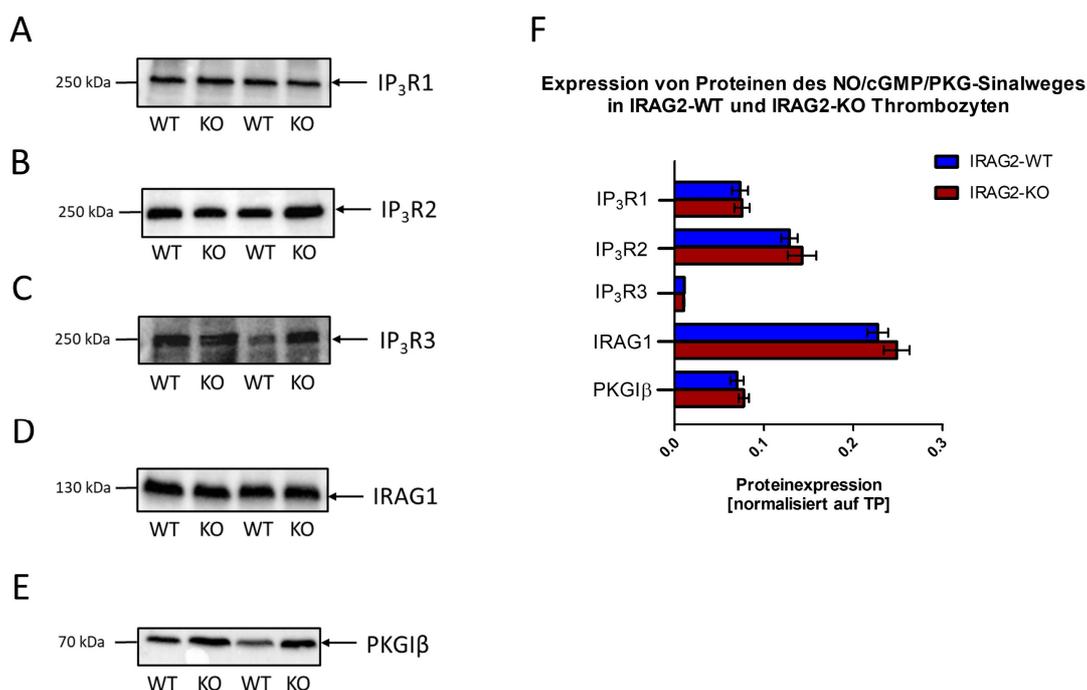


Abbildung 4-3: Expression von Signalproteinen des NO/cGMP/PKG-Signalweges

A-E: Repräsentative Proteinexpressionen von IP₃R1 (**A**), IP₃R2 (**B**), IP₃R3 (**C**), IRAG1 (**D**) und PKGI β (**E**) in Thrombozyten von IRAG2-WT (WT) und IRAG2-KO (KO) Mäusen. **F:** Statistische Auswertung der Expression von IP₃R1 (WT: n = 11; KO: n = 11), IP₃R2 (WT: n = 5; KO: n = 5), IP₃R3 (WT: n = 5; KO: n = 5), IRAG1 (WT: n = 11; KO: n = 11) und PKGI β (WT: n = 17; KO: n = 17). Die Intensität der einzelnen Banden (**A-F**) wurde normalisiert auf das Totalprotein (TP) der jeweiligen Spur. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM. Aufnahmen des Totalproteins sind in Kapitel 8.4 (s. Abbildung 8-2) zu finden.

IRAG1: Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor assoziiertes cGMP Kinase Substrat 1; PKGI β : cGMP-abhängige Proteinkinase β ; IP₃R1: Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor Typ 1; IP₃R2: Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor Typ 2; IP₃R3: Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor Typ 3.

Für IRAG1 und PKGI β waren ebenso keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Expressionsmenge bei beiden Genotypen zu beobachten (s. Abbildung 4-3 D, E, F).

Zusammenfassend sind also keine Expressionsunterschiede der analysierten Signalproteine des NO/cGMP/PKG-Signalweges zwischen IRAG2-WT und IRAG2-KO Thrombozyten erkennbar.

4.1.4 Phosphorylierung von IRAG2 in Thrombozyten

Es ist bekannt, dass IRAG1 nach Stimulation mit cGMP durch die PKGI β phosphoryliert wird [2]. Obwohl keine stabile Interaktion zwischen IRAG2 und der PKGI β festgestellt wurde (s. 4.1.2), ist es dennoch möglich, dass IRAG2 über diese Kinase phosphoryliert wird. Um dies zu untersuchen, wurden sowohl Thrombozyten-Lysate als auch intakte Thrombozyten von IRAG2-WT und IRAG2-KO Mäusen *in vitro* bzw. *ex vivo* mit cGMP-Analoga stimuliert.

Die Thrombozyten-Lysate beider Genotypen wurden für die *in vitro* Phosphorylierung zunächst mit 8-Br-cGMP inkubiert und IRAG2 anschließend durch eine Immunpräzipitation mittels IRAG2-Antikörper ausgefällt (s. 3.5.2). Nach der Fällung wurde die IRAG2-spezifische Phosphorylierung unter Verwendung eines Phospho-(Ser/Thr) PKA Substrat-Antikörpers im Western Blot detektiert. Dieser Antikörper ermöglicht es, PKA-, PKC- sowie PKG-abhängige Phosphorylierungen an Serin- und Threonin-Resten von Proteinen zu analysieren. Die *in vitro* Phosphorylierung von Thrombozyten-Lysaten zeigte dabei eine phosphorylierte IRAG2-Bande (Phospho-IRAG2, P-IRAG2) in den mit 8-Br-cGMP stimulierten IRAG2-WT Proben. In IRAG2-KO Proben war hingegen keine Phospho-IRAG2 Bande zu sehen (s. Abbildung 4-4 A).

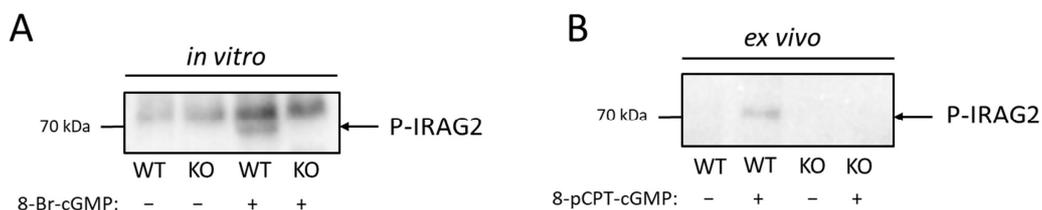


Abbildung 4-4: Phosphorylierung von IRAG2 in Thrombozyten

A: Repräsentativer Western Blot der *in vitro* Phosphorylierung von Thrombozyten-Lysaten der IRAG2-WT (WT) und IRAG2-KO (KO) Tiere nach Stimulation mit 8-Br-cGMP. **B:** Repräsentativer Western Blot der *ex vivo* Phosphorylierung von intakten Thrombozyten der IRAG2-WT und IRAG2-KO Tiere nach Stimulation mit 8-pCPT-cGMP. **A, B:** Phosphoryliertes IRAG2 (P-IRAG2) wurde nach erfolgter Immunpräzipitation mit dem Phospho-(Ser/Thr) PKA Substrat-Antikörper detektiert.

8-Br-cGMP: zyklisches 8-Bromo-Guanosin-3',5'-monophosphat; 8-pCPT-cGMP: zyklisches 8-(para-chlorophenylthio)-Guanosin-3',5'-monophosphat.

Die unstimulierten Kontroll-Proben von IRAG2-WT und IRAG2-KO Thrombozyten wiesen ebenfalls keine phosphorylierten IRAG2 Banden auf (s. Abbildung 4-4 A).

Für die *ex vivo* Phosphorylierung wurden die intakten Thrombozyten von IRAG2-WT und IRAG2-KO Tieren zunächst mit 8-pCPT-cGMP stimuliert und anschließend lysiert (s. 3.5.3). Nachfolgend erfolgte die Immunpräzipitation von IRAG2 mittels IRAG2-Antikörper und, wie bereits oben beschrieben, eine Western Blot Analyse mit dem Phospho-(Ser/Thr) PKA Substrat-Antikörper. In IRAG2-WT Proben, die mit 8-pCPT-cGMP inkubiert wurden, war eine phosphorylierte IRAG2-Bande detektierbar. Die stimulierten IRAG2-KO Proben sowie die unstimulierten IRAG2-WT und IRAG2-KO Thrombozyten zeigten dagegen keine Phospho-IRAG2 Banden (s. Abbildung 4-4 B).

Es lässt sich daher festhalten, dass IRAG2 in Thrombozyten sowohl *in vitro* in Lysaten als auch *ex vivo* in intakten Thrombozyten abhängig von cGMP phosphoryliert wird.

4.1.5 Einfluss von IRAG2 auf die Ca^{2+} -Freisetzung in Thrombozyten

IRAG1 bildet zusammen mit der PKGI β und dem IP₃R1 einen trimären Komplex und hemmt nach Phosphorylierung über die PKGI β die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER. IRAG1-KO Thrombozyten weisen daher nach Stimulation mit Agonisten, wie zum Beispiel Thrombin, eine höhere Ca^{2+} -Freisetzung auf, als IRAG1-WT Thrombozyten [1, 2, 109]. IRAG2 interagiert mit den drei verschiedenen IP₃-Rezeptor Subtypen, die für die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern von Bedeutung sind (s. 4.1.2). Aus diesem Grund wurde der Einfluss von IRAG2 auf die Ca^{2+} -Freisetzung in Thrombozyten analysiert. Die Untersuchung erfolgte mit Hilfe des Ca^{2+} -Chelators Fura-2-AM, der in Ca^{2+} -gebundener Form bei 340 nm und in Ca^{2+} -freier Form bei 380 nm angeregt werden kann. Nach der Beladung der Thrombozyten mit Fura-2-AM, wurde die Ca^{2+} -Freisetzung durch Zugabe von Thrombin in verschiedenen Konzentrationen (0,024 U/ml, 0,05 U/ml und 0,1 U/ml) stimuliert und über einen Zeitraum von 30 s gemessen. Zur Bestimmung des basalen Calciums wurde stattdessen 0,9 % NaCl verwendet. Dabei wurde das Ratio R (340/380) aus Ca^{2+} -gebundenem Fura-2 und Ca^{2+} -freiem Fura-2 ermittelt und dieses daraufhin in die entsprechende Ca^{2+} -Menge [nM] umgerechnet (s. 3.5.5). Das im Messzeitraum freigesetzte Calcium wurde anschließend auf die basalen Ca^{2+} -Mengen normiert und daraus die während des Messzeitraums maximal freigesetzten Ca^{2+} -Mengen bestimmt.

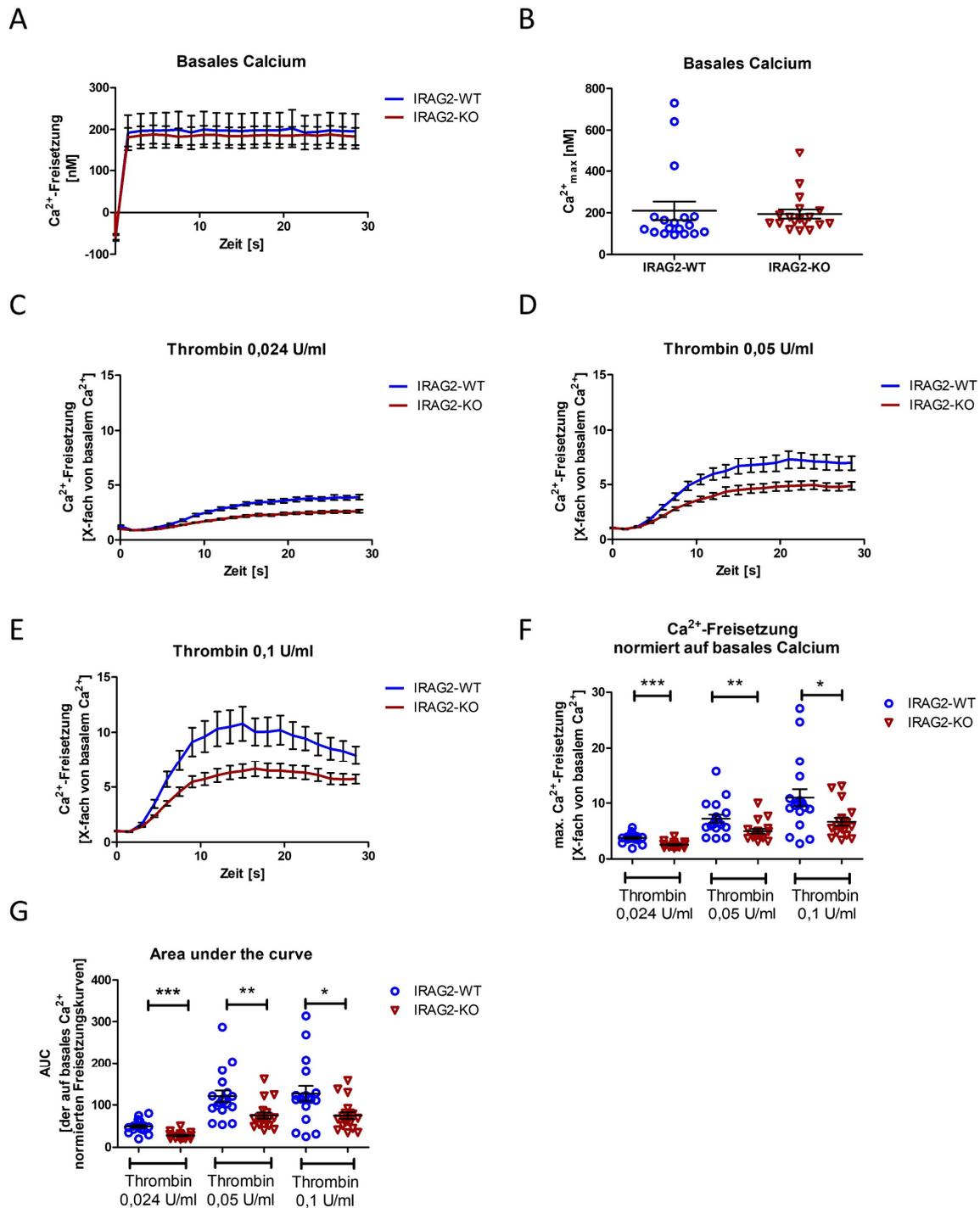


Abbildung 4-5: Ca²⁺-Freisetzung in Thrombozyten

A, B: Basale Calcium (Ca²⁺)-Freisetzung in Thrombozyten über einen Messzeitraum von 30 s (**A**) und Vergleich der Maximalwerte des basalen Calciums (Ca²⁺_{max}) von IRAG2-WT und IRAG2-KO Thrombozyten (**B**). **C-E:** Ca²⁺-Freisetzungskurven normiert auf basale Ca²⁺-Mengen über einen Messzeitraum von 30 s in Thrombozyten von IRAG2-WT und IRAG2-KO Mäusen nach Stimulation mit Thrombin 0,024 U/ml (**C**), 0,05 U/ml (**D**) und 0,1 U/ml (**E**). **F:** Maximal (max.) freigesetzte Ca²⁺-Mengen X-fach von basalem Calcium nach Stimulation mit 0,024 U/ml, 0,05 U/ml und 0,1 U/ml Thrombin. **G:** Vergleich der *area under the curve* (AUC) der Freisetzungskurven (**C, D, E**) beider Genotypen nach Stimulation mit Thrombin 0,024 U/ml, 0,05 U/ml und 0,1 U/ml. **B, F, G:** Die einzelnen Datenpunkte symbolisieren je eine Messung (IRAG2-WT: 18 Messungen; IRAG2-KO: 18 Messungen). Pro Maus (pro n-Zahl) wurden dabei insgesamt drei Messungen durchgeführt (IRAG2-WT: n = 6; IRAG2-KO: n = 6). Alle Graphen sind mit Mittelwert ± SEM dargestellt und statistisch signifikante Unterschiede sind angegeben als (*) ($p < 0,05$), (**) ($p < 0,01$) und (***) ($p < 0,001$).

Bei der Stimulation mit allen Thrombin-Konzentrationen, war die maximal freigesetzte Ca^{2+} -Menge X-fach des basalen Calciums in Thrombozyten von IRAG2-KO Tieren signifikant verringert im Vergleich zu IRAG2-WT Tieren (s. Abbildung 4-5 F).

Für die Freisetzungskurven (s. Abbildung 4-5 C, D, E) wurde zudem die *area under the curve* (AUC) über die Dauer der Messung berechnet, die 30 s betrug. Die AUC dient dabei als Maß für die im Messzeitraum insgesamt freigesetzte Ca^{2+} -Menge. Die AUC der auf basales Calcium normierten Freisetzungskurven der IRAG2-KO Thrombozyten war, bei Stimulation mit allen Thrombin-Konzentrationen (0,024 U/ml, 0,05 U/ml und 0,1 U/ml), signifikant geringer als die der IRAG2-WT Thrombozyten (s. Abbildung 4-5 G). Der Vergleich der basalen Ca^{2+} -Menge ergab hingegen keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen (s. Abbildung 4-5 A, B). Es lässt sich somit festhalten, dass in IRAG2-KO Thrombozyten nach Stimulation mit dem Agonisten Thrombin weniger Calcium freigesetzt wird als in Thrombozyten von IRAG2-WT Mäusen.

4.1.6 Einfluss von IRAG2 auf die Thrombozytenaggregation

IRAG1 hemmt die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER und damit auch die Thrombozytenaggregation. IRAG1-KO Thrombozyten weisen daher eine erhöhte Aggregabilität auf, verglichen mit den IRAG1-WT Thrombozyten [107, 109]. Da in IRAG2-KO Thrombozyten weniger Calcium freigesetzt wird als in IRAG2-WT Thrombozyten (s. 4.1.5), wurde die Auswirkung der verringerten Ca^{2+} -Freisetzung auf die Thrombozytenaggregation getestet. Dazu wurden Thrombozyten von IRAG2-WT und IRAG2-KO Tieren mit Thrombin in verschiedenen Konzentrationen (0,024 U/ml, 0,05 U/ml und 0,1 U/ml) sowie mit Kollagen (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) stimuliert. Die Steigung der erhaltenen Aggregationskurven wurde berechnet und spiegelte die Aggregationsgeschwindigkeit wider, die als Maß für die Aggregationsrate der Thrombozyten diente. IRAG2-KO Thrombozyten zeigten dabei eine signifikant verringerte Aggregabilität im Vergleich zu IRAG2-WT Thrombozyten, bei Stimulation mit den verschiedenen Konzentrationen von Thrombin (s. Abbildung 4-6 A-D). Dieser Effekt war auch bei der Stimulation der Thrombozytenaggregation mit 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kollagen in beiden Genotypen zu beobachten.

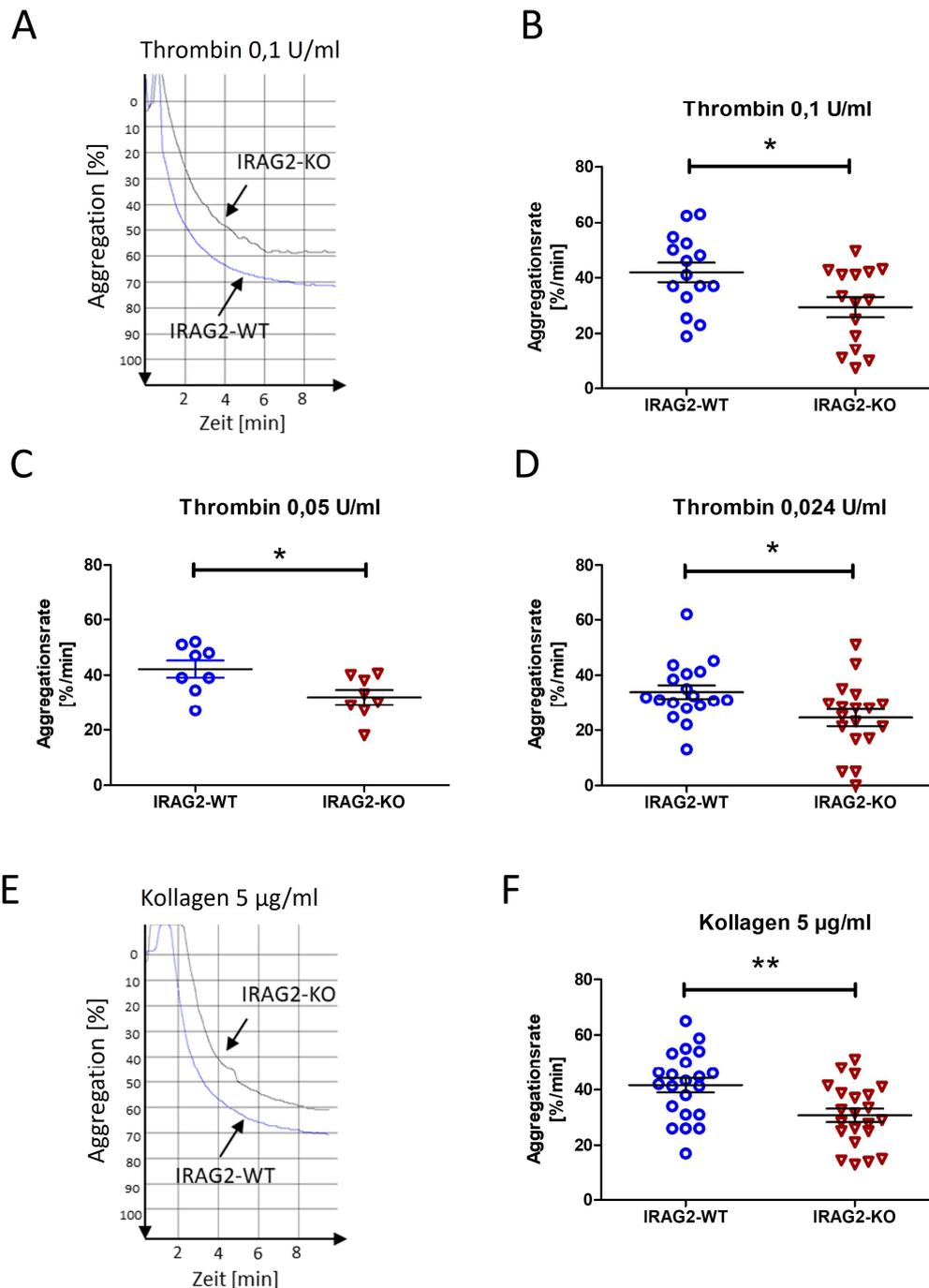


Abbildung 4-6: Einfluss von IRAG2 auf die Thrombozytenaggregation

A: Repräsentative Aggregationskurve von IRAG2-WT und IRAG2-KO Thrombozyten nach Stimulation mit Thrombin (0,1 U/ml). **B-D:** Aggregationsrate [%/min] der Thrombozyten nach Stimulation mit 0,1 U/ml Thrombin (IRAG2-WT: n = 15; IRAG2-KO: n = 15) (**B**), 0,05 U/ml Thrombin (IRAG2-WT: n = 8; IRAG2-KO: n = 8) (**C**) und 0,024 U/ml Thrombin (IRAG2-WT: n = 18; IRAG2-KO: n = 18) (**D**). **E:** Repräsentative Aggregationskurve von IRAG2-WT und IRAG2-KO Thrombozyten nach Stimulation mit 5 µg/ml Kollagen. **F:** Aggregationsrate [%/min] der Thrombozyten nach Stimulation mit 5 µg/ml Kollagen (IRAG2-WT: n = 22; IRAG2-KO: n = 22). Die einzelnen Datenpunkte symbolisieren je eine Maus. Alle Graphen sind mit Mittelwert ± SEM dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede sind angegeben als (*) ($p < 0,05$) und (**) ($p < 0,01$).

Thrombozyten von IRAG2-KO Tieren wiesen auch hier eine signifikant verringerte Aggregationsrate auf als Thrombozyten von IRAG2-WT Tieren (s. Abbildung 4-6 E, F).

Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass die Thrombozytenaggregation bei Stimulation mit Kollagen und Thrombin in IRAG2-KO Tieren verringert ist, verglichen mit dem IRAG2-WT, und IRAG2 somit die Thrombozytenaggregation fördert.

4.1.7 Einfluss von IRAG2 auf die NO/cGMP-abhängige Hemmung der Thrombozytenaggregation

Eine Inkubation von Wildtyp-Thrombozyten mit cGMP verursacht eine Hemmung der Ca^{2+} -Freisetzung durch Phosphorylierung von IRAG1. Daraus resultiert eine Hemmung der Thrombozytenaggregation [2, 107, 109]. In IRAG1-KO Thrombozyten ist daher keine oder nur eine sehr schwache NO/cGMP-abhängige Aggregationshemmung zu beobachten [2, 107]. Wie in Kapitel 4.1.4 beschrieben, wird IRAG2 in Thrombozyten sowohl *in vitro* als auch *ex vivo* nach Stimulation mit den cGMP-Analoga 8-Br-cGMP und 8-pCPT-cGMP phosphoryliert. Zudem ist die Aggregabilität der IRAG2-KO Thrombozyten, verglichen mit dem Wildtyp, signifikant verringert (s. 4.1.6). Im Folgenden wurde daher der Einfluss von IRAG2 auf die NO/cGMP-abhängige Aggregationshemmung untersucht. Dazu wurden Thrombozyten von IRAG2-WT und IRAG2-KO Tieren vor der Messung entweder für 2 min mit dem NO-Donor Nitroprussid-Natrium (SNP) oder für 10 min mit dem cGMP-Analogen 8-pCPT-cGMP vorinkubiert. Die Aggregation wurde anschließend durch Zugabe von Thrombin oder Kollagen gestartet. Mit Hilfe des Zwei-Kanal-Aggregometers war dabei eine parallele Vermessung von Thrombozyten mit und ohne Inhibitor möglich.

Zur Bestimmung der Aggregationsrate wurde, ebenso wie in Kapitel 4.1.6 beschrieben, zunächst die Steigung der Aggregationskurve berechnet, die ein Maß für die Aggregationsrate der Thrombozyten darstellt. Die Berechnung der Aggregationshemmung erfolgte anschließend als maximale (max.) Aggregationsrate in Prozent der Kontrolle, wobei IRAG2-WT und IRAG2-KO Thrombozyten, die nicht mit dem Hemmstoff vorinkubiert wurden, als Kontrollen dienten und als 100 % gesetzt wurden. Je höher somit die max. Aggregationsrate [%] nach Vorinkubation mit einem Inhibitor ist, desto schwächer ist die Aggregationshemmung.

Bei Vorinkubation der Thrombozyten mit 2,5 μ M SNP und anschließender Stimulation der Aggregation mit 0,024 U/ml Thrombin zeigte sich eine signifikant verringerte maximale Aggregationsrate in IRAG2-KO Thrombozyten, verglichen mit IRAG2-WT Thrombozyten (s.

Abbildung 4-7 A-C). Gleiches war bei Vorinkubation mit 150 μM 8-pCPT-cGMP und anschließender Stimulation mit 0,05 U/ml Thrombin zu beobachten. Auch hier war die maximale Aggregationsrate signifikant geringer im IRAG2-KO, verglichen mit dem IRAG2-WT (s. Abbildung 4-7 D-F).

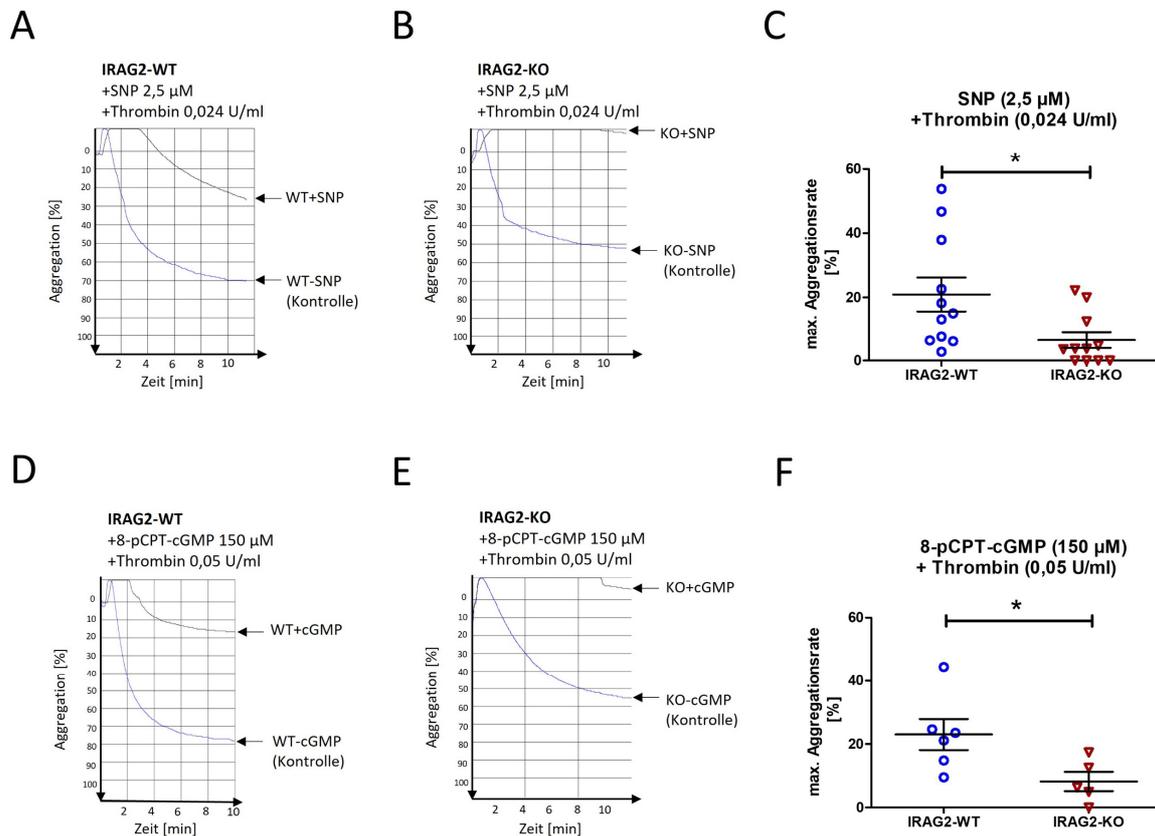


Abbildung 4-7: NO/cGMP-abhängige Aggregationshemmung in IRAG2-WT und IRAG2-KO Thrombozyten bei Stimulation der Aggregation mit Thrombin

A, B: Repräsentative Aggregationskurven nach Vorinkubation der Thrombozyten mit 2,5 μM SNP und Stimulation der Aggregation durch 0,024 U/ml Thrombin. **C:** Statistische Auswertung der Aggregationskurven von IRAG2-WT (**A**) und IRAG2-KO (**B**) Thrombozyten (IRAG2-WT: n = 11; IRAG2-KO: n = 11). **D, E:** Repräsentative Aggregationskurven nach Vorinkubation der Thrombozyten mit 150 μM 8-pCPT-cGMP und Stimulation der Aggregation durch 0,05 U/ml Thrombin. **F:** Statistische Auswertung der Aggregationskurven von IRAG2-WT (**D**) und IRAG2-KO (**E**) Thrombozyten (IRAG2-WT: n = 6; IRAG2-KO: n = 5). **C, F:** Für die Berechnung der maximalen (max.) Aggregationsrate [%] wurden die Kontrollen (Aggregation von IRAG2-WT und IRAG2-KO ohne Vorinkubation mit Inhibitor) als 100 % gesetzt und die maximale Aggregationsrate der mit Hemmstoff vorinkubierten Proben prozentual der Aggregation der Kontrollen berechnet. Die einzelnen Datenpunkte in den Graphen symbolisieren je eine Maus. Alle Graphen sind mit Mittelwert \pm SEM dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede sind angegeben als (*) ($p < 0,05$).

SNP: Nitroprussid-Natrium; 8-pCPT-cGMP: zyklisches 8-(para-chlorophenylthio)-Guanosin-3',5'-monophosphat

Wurden die Thrombozyten mit 2,5 μM SNP oder 200 μM 8-pCPT-cGMP vorinkubiert und die Aggregation anschließend durch Zugabe von 5 $\mu\text{g/ml}$ Kollagen gestartet, war hingegen weder

für SNP noch für 8-pCPT-cGMP ein Unterschied in der maximalen Aggregationsrate zwischen beiden Genotypen erkennbar (s. Abbildung 4-8 A-F).

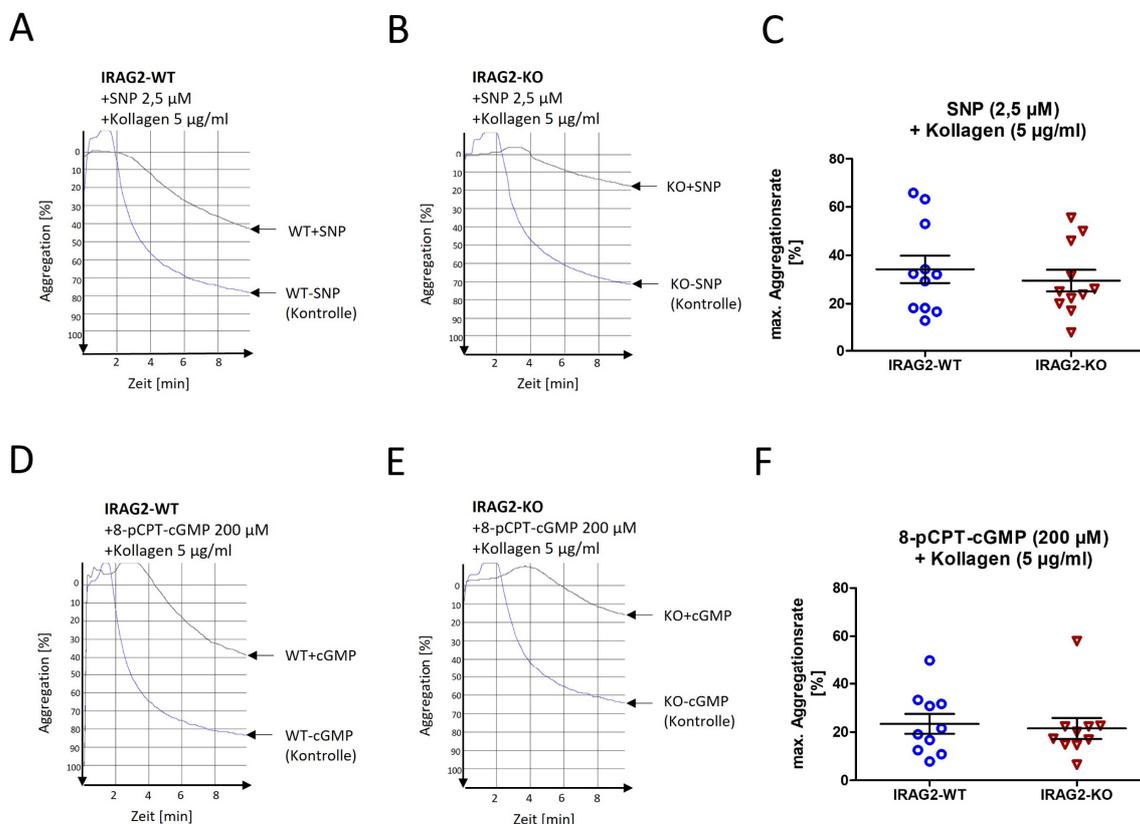


Abbildung 4-8: NO/cGMP-abhängige Aggregationshemmung in IRAG2-WT und IRAG2-KO Thrombozyten bei Stimulation der Aggregation mit Kollagen

A, B: Repräsentative Aggregationskurven nach Vorinkubation der Thrombozyten mit 2,5 μ M SNP und Stimulation der Aggregation durch 5 μ g/ml Kollagen. **C:** Statistische Auswertung der Aggregationskurven von IRAG2-WT (**A**) und IRAG2-KO (**B**) Thrombozyten (IRAG2-WT: n = 11; IRAG2-KO: n = 11). **D, E:** Repräsentative Aggregationskurven nach Vorinkubation der Thrombozyten mit 200 μ M 8-pCPT-cGMP und Stimulation der Aggregation durch 5 μ g/ml Kollagen. **F:** Statistische Auswertung der Aggregationskurven von IRAG2-WT (**D**) und IRAG2-KO (**E**) Thrombozyten (IRAG2-WT: n = 10; IRAG2-KO: n = 10). **C, F:** Für die Berechnung der maximalen (max.) Aggregationsrate [%] wurden die Kontrollen (Aggregation von IRAG2-WT und IRAG2-KO ohne Vorinkubation mit Inhibitor) als 100 % gesetzt und die maximale Aggregationsrate der mit Hemmstoff vorinkubierten Proben prozentual der Aggregation der Kontrollen berechnet. Die einzelnen Datenpunkte in den Graphen symbolisieren je eine Maus. Alle Graphen sind mit Mittelwert \pm SEM dargestellt. SNP: Nitroprussid-Natrium; 8-pCPT-cGMP: zyklisches 8-(para-chlorophenylthio)-Guanosin-3',5'-monophosphat

Es lässt sich somit festhalten, dass IRAG2-KO Thrombozyten eine stärkere NO/cGMP-abhängige Aggregationshemmung, nach Stimulation der Aggregation durch Thrombin, aufweisen als IRAG2-WT Thrombozyten.

4.2 Funktion von IRAG2 im Pankreas

4.2.1 Expression von IRAG2 in Azinus-Zellen des exokrinen Pankreas

Zur Untersuchung der Expression und Lokalisation von IRAG2 im Pankreas wurden $lacZ \times IRAG2$ -KO Tiere verwendet, die unter Kontrolle des *Irag2*-Promotors eine β -Galactosidase exprimieren (s. 3.1.2). Über deren Expression kann IRAG2 somit indirekt in der $lacZ \times IRAG2$ -KO Maus nachgewiesen werden.

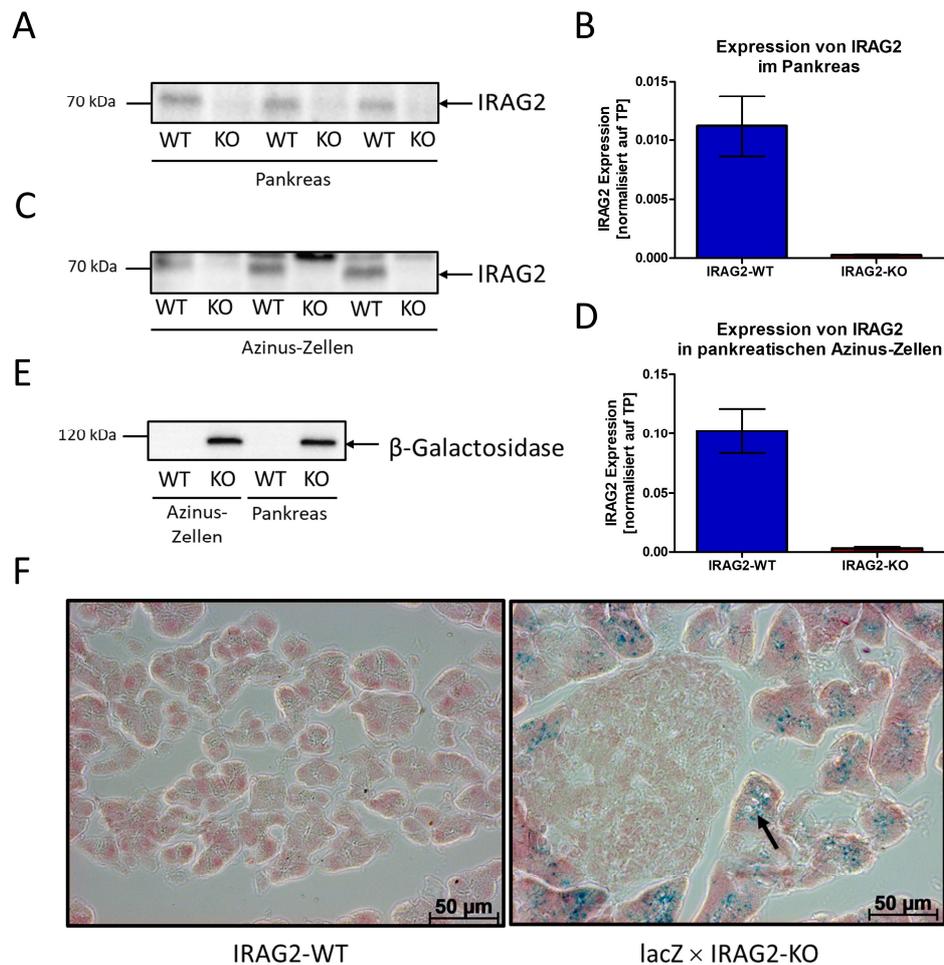


Abbildung 4-9: Expression und Lokalisation von IRAG2 im Pankreas

A-D: Repräsentativer Western Blot der Expression von Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor assoziiertem 2 (IRAG2) im Pankreas (**A**) sowie in pankreatischen Azinus-Zellen (**C**) von IRAG2-WT (WT) und $lacZ \times IRAG2$ -KO (KO) Tieren. Quantifizierung der IRAG2-Expression im Pankreas (WT: n = 12, KO: n = 12) (**B**) sowie in Azinus-Zellen (WT: n = 6; KO: n = 6) (**D**) normiert auf das Totalprotein der jeweiligen Spur. Die Graphen sind dargestellt mit Mittelwert \pm SEM. Aufnahmen des Totalproteins sind in Kapitel 8.4 (s. Abbildung 8-3) zu finden. **E:** Repräsentative Expressionsanalyse der β -Galactosidase in Pankreata und Azinus-Zellen von IRAG2-WT (WT) und $lacZ \times IRAG2$ -KO (KO) Mäusen. **F:** Repräsentative Aufnahmen der X-Gal Färbung in histologischen Schnitten von IRAG2-WT und $lacZ \times IRAG2$ -KO Mäusen. Die Blaufärbung (Pfeil) zeigt die Expression der β -Galactosidase und gibt somit Rückschluss auf die Lokalisation von IRAG2.

Die Expression von IRAG2 und der β -Galactosidase wurde dabei zunächst mittels Western Blot im Gesamt-Pankreas untersucht und anschließend die Zelltypen, die IRAG2 exprimieren, mit Hilfe der X-Gal Färbung identifiziert.

Die Expression von IRAG2 und β -Galactosidase wurde durch Verwendung spezifischer Antikörper in Pankreas-Lysaten von IRAG2-WT und lacZ \times IRAG2-KO Tieren im Western Blot analysiert. Dabei war in den Pankreata der IRAG2-WT Tiere eine Expression von IRAG2 detektierbar, jedoch nicht in den Pankreata der lacZ \times IRAG2-KO Tiere (s. Abbildung 4-9 A, B). Die Expression der β -Galactosidase, die als Reporter für IRAG2 dient, konnte in den Pankreata der lacZ \times IRAG2-KO Mäuse nachgewiesen werden, jedoch nicht in denen der IRAG2-WT Mäuse (s. Abbildung 4-9 E).

Da in der Western Blot Analyse eine Expression von IRAG2 im Pankreas zu beobachten war, wurde im nächsten Schritt untersucht, wo IRAG2 im Pankreas lokalisiert ist. Dazu wurde an histologischen Schnitten der Pankreata von IRAG2-WT und lacZ \times IRAG2-KO Mäusen eine X-Gal Färbung durchgeführt, mit deren Hilfe die β -Galactosidase-Aktivität in histologischen Schnitten nachgewiesen werden kann. Durch Bildung blauer Präzipitate in den Geweben kann so der Expressionsort lokalisiert werden. In lacZ \times IRAG2-KO Tieren war dabei eine β -Galactosidase-Aktivität in den Azinus-Zellen des exokrinen Pankreas detektierbar (s. Pfeil in Abbildung 4-9 F), die in den IRAG2-WT Tieren nicht beobachtet werden konnte. In den Langerhans-Inseln konnte im Pankreas der beiden untersuchten Genotypen keine β -Galactosidase-Aktivität nachgewiesen werden (s. Abbildung 4-9 F). Auch in den Ausführungsgängen des exokrinen Pankreas konnte keine β -Galactosidase-Aktivität in beiden Genotypen detektiert werden (s. Abbildung 4-10). Es lässt sich somit feststellen, dass IRAG2 im Pankreas in den Azinus-Zellen des exokrinen Pankreas exprimiert wird.

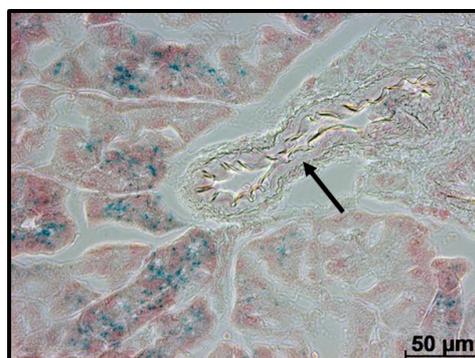


Abbildung 4-10: Expression von IRAG2 im exokrinen Pankreas

Analyse der β -Galactosidase-Aktivität mittels X-Gal Färbung in pankreatischen Ausführungsgängen (Pfeil) von lacZ \times IRAG2-KO Mäusen.

Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurden pankreatische Azini isoliert und in diesen die Expression der β -Galactosidase sowie von IRAG2 mittels Western Blot untersucht. Dabei war in den Azinus-Zellen der lacZ \times IRAG2-KO Tiere eine Expression der β -Galactosidase nachweisbar, jedoch nicht in denen der IRAG2-WT Tiere (s. Abbildung 4-9 E). Zudem wurde eine IRAG2-Expression in IRAG2-WT-Zellen detektiert, jedoch nicht in lacZ \times IRAG2-KO Zellen (s. Abbildung 4-9 C, D). Diese Resultate bestätigen ebenfalls die vorherigen Befunde zur Expression von IRAG2 in den Azinus-Zellen des exokrinen Pankreas.

Aufgrund der Lokalisation und Expression von IRAG2 im Pankreas, wurde auch die Expression dessen Homologs IRAG1 mittels Western Blot untersucht. Dabei konnte IRAG1 weder in Lysaten des gesamten Pankreas, noch in Azinus-Zellen von Wildtyp und IRAG2-KO Mäusen nachgewiesen werden. Als Kontrollen für die IRAG1-Expression wurden Thrombozyten von Wildtyp, IRAG2-KO und IRAG1-KO Tieren verwendet. Bei diesen war eine IRAG1-Expression in Thrombozyten von Wildtyp und IRAG2-KO Mäusen zu sehen, jedoch nicht in den Thrombozyten der IRAG1-KO Tiere (s. Abbildung 4-11).

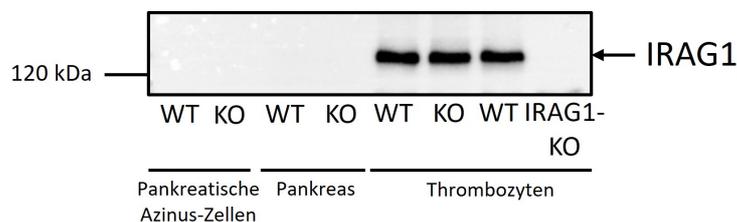


Abbildung 4-11: Expression von IRAG1 im Pankreas

Repräsentativer Western Blot der Expressionsanalyse von IRAG1 in Pankreas-Lysaten und in Azinus-Zellen von Wildtyp (WT) und IRAG2-KO (KO) Tieren. Als Positivkontrolle für die IRAG1-Expression wurden Thrombozyten von Wildtyp (WT) und IRAG2-KO (KO) Tieren verwendet. Als Negativkontrolle wurden Thrombozyten von IRAG1-KO Tieren verwendet. Die Aufnahme des Totalproteins ist in Kapitel 8.4 (s. Abbildung 8-4) zu finden.

IRAG1: Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor assoziiertes cGMP Kinase Substrat.

4.2.2 Interaktion von IRAG2 mit IP₃-Rezeptoren im Pankreas

Die Interaktion von IRAG2 mit den verschiedenen IP₃-Rezeptor Subtypen konnte im Rahmen dieser Arbeit bereits in Thrombozyten nachgewiesen werden (s. 4.1.2). Auch im Pankreas erfolgte durch Co-Immunpräzipitation mittels IRAG2-Antikörper eine Analyse der Interaktionspartner von IRAG2. Dabei wurde speziell die Interaktion von IRAG2 mit den IP₃-Rezeptor Subtypen 1, 2 und 3 untersucht. Die Immunpräzipitation führte dabei zu einer Anreicherung von IRAG2 in den immunpräzipitierten Pankreas-Lysaten des IRAG2-WT, verglichen mit den Input-Proben des IRAG2-WT, bei denen IRAG2 nicht gefällt wurde. In den IRAG2-KO Proben war IRAG2 hingegen weder in den immunpräzipitierten Proben noch in den Input-Proben detektierbar. Die Analyse der co-immunpräzipitierten Interaktionspartner ergab dabei in den immunpräzipitierten IRAG2-WT Proben Banden für den IP₃R1, den IP₃R2 sowie den IP₃R3, die in den immunpräzipitierten IRAG2-KO Proben nicht detektierbar waren (s. Abbildung 4-12).

Somit konnte auch im Pankreas eine Interaktion von IRAG2 mit allen IP₃-Rezeptor Subtypen nachgewiesen werden.

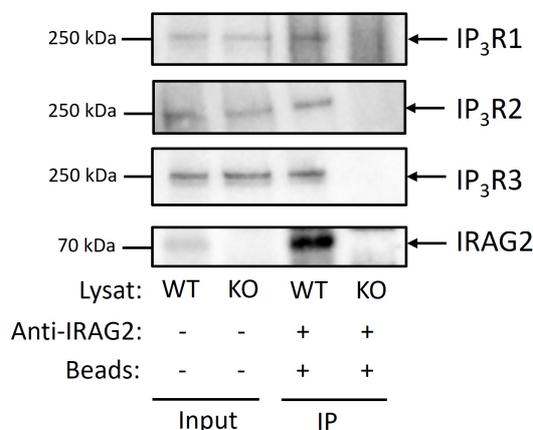


Abbildung 4-12: Interaktion von IRAG2 mit IP₃-Rezeptoren im Pankreas

Repräsentativer Western Blot der Immunpräzipitation von IRAG2 mittels IRAG2-Antikörper (Anti-IRAG2). Für die Immunpräzipitation (IP) wurden 1500 µg Pankreas-Lysat von IRAG2-WT (WT) und IRAG2-KO (KO) Tieren verwendet. Als Input Proben wurden 70 µg ungefälltes IRAG2-WT und IRAG2-KO Pankreas-Lysat aufgetragen. Aufnahmen des Totalproteins sind in Kapitel 8.4 (s. Abbildung 8-5) zu finden.

IRAG2: Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor assoziiertes 2; IP₃R1: Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor Typ 1; IP₃R2: Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor Typ 2; IP₃R3: Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor Typ 3.

4.2.3 Expression der IP₃-Rezeptoren in Pankreata von IRAG2-WT und IRAG2-KO Mäusen

Da IRAG2 mit den verschiedenen IP₃-Rezeptor Subtypen im Pankreas interagiert (s. 4.2.2), wurde im Folgenden mittels Western Blot Analyse untersucht, ob sich die Expressionsmengen von IP₃R1, IP₃R2 und IP₃R3 in den Pankreata der IRAG2-WT und IRAG2-KO Mäuse voneinander unterscheiden.

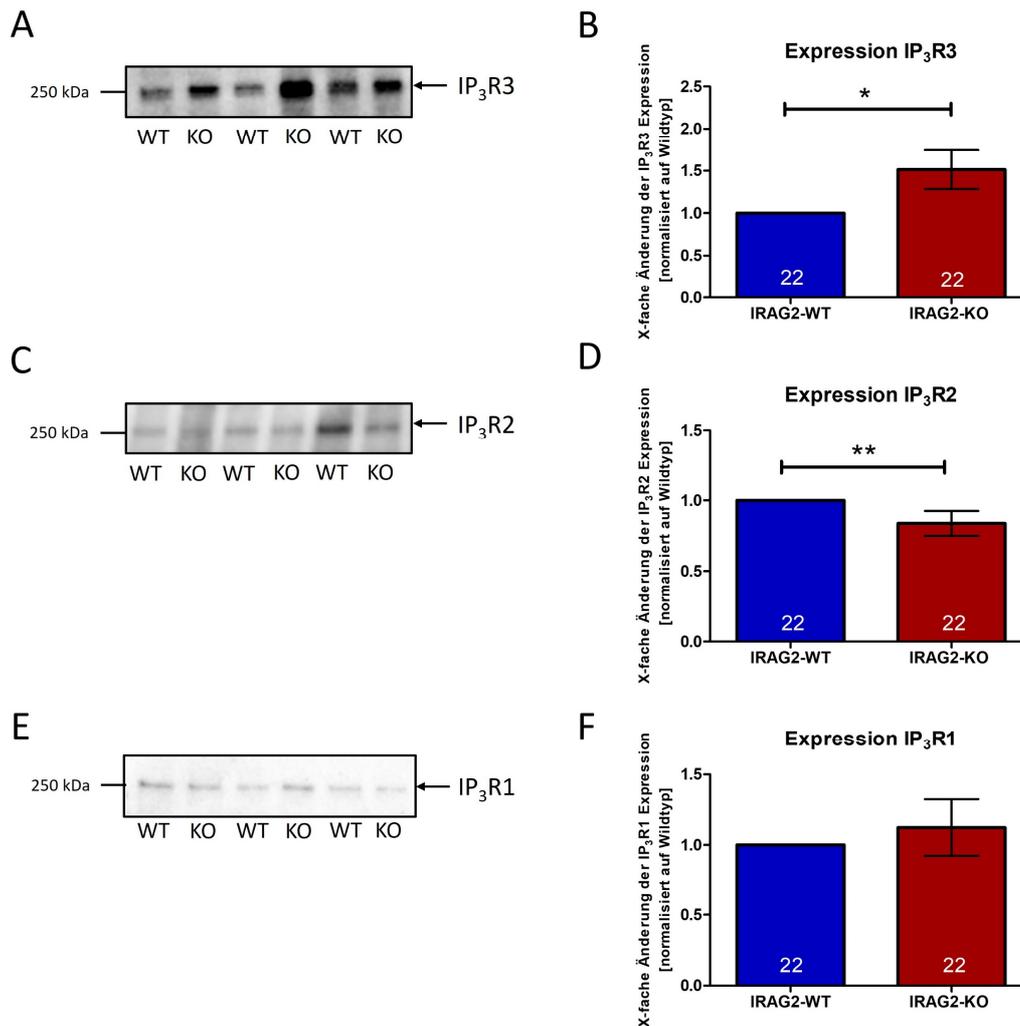


Abbildung 4-13: Vergleich der Expression der IP₃-Rezeptor Subtypen in Pankreas-Lysaten

A, C, E: Repräsentative Western Blots der Proteinexpressionen von IP₃R3 (**A**), IP₃R2 (**C**) und IP₃R1 (**E**) in Pankreas-Lysaten von IRAG2-WT (WT) und IRAG2-KO (KO) Mäusen. **B, D, F:** Die Intensitäten der einzelnen Banden des IP₃R3 (WT: n = 22; KO: n = 22) (**B**), IP₃R2 (WT: n = 22; KO: n = 22) (**D**) und IP₃R1 (WT: n = 22; KO: n = 22) (**F**) wurden quantifiziert und normiert auf das Totalprotein der jeweiligen Spur. Die Expressionen der einzelnen Proteine im IRAG2-KO wurden als X-faches der Expression im IRAG2-WT angegeben. Alle Graphen sind mit Mittelwert ± SEM dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede sind angegeben als (*) ($p < 0,05$) und (**) ($p < 0,01$). Aufnahmen des Totalproteins sind in Kapitel 8.4 (s. Abbildung 8-6) zu finden.

IP₃R1: Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor Typ 1; IP₃R2: Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor Typ 2; IP₃R3: Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor Typ 3.

Dazu wurde die Intensität der Protein-Banden quantifiziert und auf das Totalprotein der jeweiligen Spur normiert. Die Expression des jeweiligen Proteins im IRAG2-KO wurde anschließend auf die Expression im IRAG2-WT Pankreas normiert.

Die Expression des IP₃R3 war dabei im IRAG2-KO signifikant erhöht, verglichen mit dem IRAG2-WT (s. Abbildung 4-13 A, B). Die Proteinlevel des IP₃R2 hingegen waren in den Pankreas-Lysaten der IRAG2-KO Tiere signifikant reduziert im Vergleich zu denen der IRAG2-WT Tiere (s. Abbildung 4-13 C, D). In der Expression des IP₃R1 war kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen erkennbar (s. Abbildung 4-13 E, F).

4.2.4 Vergleich der Ca²⁺-Freisetzung in isolierten pankreatischen Azini von IRAG2-WT und IRAG2-KO Mäusen

IRAG1 interagiert mit IP₃-Rezeptoren und hemmt die Ca²⁺-Freisetzung aus intrazellulären Speichern [45, 109]. Da auch dessen Homolog IRAG2 mit den verschiedenen IP₃-Rezeptor Subtypen im murinen Pankreas interagiert und in den Azinus-Zellen des exokrinen Pankreas exprimiert wird (s. 4.2.2 und 4.2.1), wurde die Ca²⁺-Freisetzung in isolierten Azini von IRAG2-WT und IRAG2-KO Mäusen untersucht. Die Zellen wurden dazu für 1,5 h mit Fura-2-AM beladen und anschließend die Ca²⁺-Freisetzung durch Verwendung von Carbachol in den Konzentrationen 1 µM und 10 µM stimuliert.

Zu Beginn der Messung wurden die Azini zunächst für 2 min mit Ringer-Lösung äquilibriert, gefolgt von einer zweiminütigen Stimulation mit 1 µM Carbachol. Nachdem die Zellen anschließend zur Regeneration wieder für 2 min mit Ringer Lösung gespült wurden, erfolgte die Zugabe von Carbachol in der höheren Konzentration von 10 µM. Während der Messung wurden die Ca²⁺-Transienten durch das Fura-2 Fluoreszenz-Ratio R (340/380) bestimmt. Je höher das Fluoreszenz-Ratio war, desto mehr Calcium wurde freigesetzt (s. Abbildung 4-14 A). Das maximale basale, unstimulierte Ratio R (340/380)_{max} unter Ringer-Perfusion war dabei in den IRAG2-KO Azini signifikant geringer als in denen der IRAG2-WT Tiere, was darauf hindeutet, dass die basale Ca²⁺-Freisetzung im IRAG2-KO verringert ist (s. Abbildung 4-14 B). Bei Stimulation mit 1 µM oder 10 µM Carbachol war das maximale Ratio R (340/380)_{max} und damit die maximale Ca²⁺-Freisetzung im IRAG2-KO etwas verringert, verglichen dem IRAG2-WT. Dieser Effekt war jedoch nicht signifikant (s. Abbildung 4-14 B).

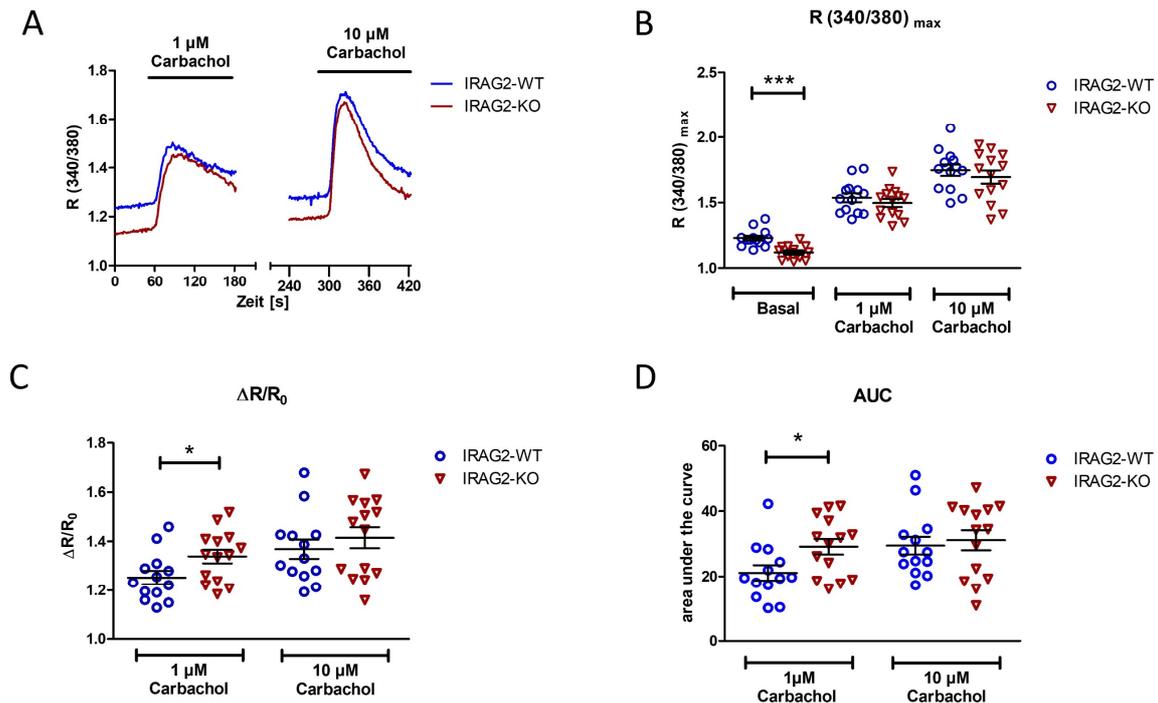


Abbildung 4-14: Ca^{2+} -Freisetzung in pankreatischen Azinus-Zellen

A: Repräsentative Ca^{2+} -Freisetzungskurven für die Stimulation der Fura-2-AM beladenen Azini von IRAG2-WT (WT) und IRAG2-KO (KO) Mäusen mit $1 \mu\text{M}$ Carbachol und $10 \mu\text{M}$ Carbachol. Das Fluoreszenz-Ratio $R(340/380)$ diente dabei als Maß für die Ca^{2+} -Freisetzung. **B:** Maximale Ratios $R(340/380)_{\text{max}}$ und damit maximal freigesetztes Calcium unter unstimulierten Bedingungen (basal) (WT: $n = 13$ Messungen von 5 Tieren; KO: $n = 14$ Messungen von 5 Tieren) sowie nach Stimulation mit $1 \mu\text{M}$ Carbachol (WT: $n = 13$ Messungen von 5 Tieren; KO: $n = 14$ Messungen von 5 Tieren) und $10 \mu\text{M}$ Carbachol (WT: $n = 13$ Messungen von 5 Tieren; KO: $n = 14$ Messungen von 5 Tieren). **C:** Maximal freigesetztes Calcium $R(340/380)_{\text{max}}$ bei Stimulation mit $1 \mu\text{M}$ Carbachol (WT: $n = 13$ Messungen von 5 Tieren; KO: $n = 14$ Messungen von 5 Tieren) und $10 \mu\text{M}$ Carbachol (WT: $n = 13$ Messungen von 5 Tieren; KO: $n = 14$ Messungen von 5 Tieren) normiert auf die basale Ca^{2+} -Freisetzung ($\Delta R/R_0$). **D:** Die *area under the curve* (AUC) der Ca^{2+} -Freisetzungskurven von IRAG2-WT und IRAG2-KO Zellen (WT: $n = 13$ Messungen von 5 Tieren; KO: $n = 14$ Messungen von 5 Tieren) wurde über den Stimulationszeitraum von 2 min berechnet. **B-D:** Jeder Datenpunkt stellt eine Messung dar, pro Messung wurde jeweils der Mittelwert aus allen Zellen gebildet. Graphen sind dargestellt mit Mittelwert \pm SEM. Statistisch signifikante Unterschiede sind angegeben als (*) ($p < 0,05$) und (***) ($p < 0,01$).

Wurde das maximale Ratio $R(340/380)_{\text{max}}$ normiert auf das basale Ratio R_0 ($\Delta R/R_0$), so war bei Stimulation mit $1 \mu\text{M}$ Carbachol ein erhöhtes $\Delta R/R_0$, und damit eine erhöhte Ca^{2+} -Freisetzung als X-faches der basalen Freisetzung in Azini von IRAG2-KO Tieren zu beobachten, verglichen mit dem IRAG2-WT. Bei Stimulation mit $10 \mu\text{M}$ war jedoch für $\Delta R/R_0$ kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen erkennbar (s. Abbildung 4-14 C).

Neben der maximalen Ca^{2+} -Freisetzung wurde zudem die *area under the curve* (AUC) bestimmt, die als Maß für die freigesetzte Ca^{2+} -Menge diente. Diese wurde über den Stimulationszeitraum von 2 min mit $1 \mu\text{M}$ Carbachol und $10 \mu\text{M}$ Carbachol berechnet. Die AUC bei Stimulation mit $1 \mu\text{M}$ Carbachol war bei den IRAG2-KO Zellen signifikant erhöht,

verglichen mit den IRAG2-WT Zellen. Bei Stimulation mit 10 μM Carbachol hingegen war kein Unterschied ersichtlich (s. Abbildung 4-14 D). Die durch 1 μM Carbachol freigesetzte Ca^{2+} -Menge war somit im IRAG2-KO höher als im IRAG2-WT.

Um die Geschwindigkeit der Ca^{2+} -Freisetzung in den Azinus-Zellen von IRAG2-WT und IRAG2-KO Tieren zu beurteilen, wurde die Steigung der Freisetzungskurven bei Stimulation mit 1 μM Carbachol und 10 μM Carbachol berechnet. Dabei ergaben sich für keine der beiden Konzentrationen signifikante Unterschiede in der Steigung und damit in der Geschwindigkeit der Ca^{2+} -Freisetzung beider Genotypen (s. Abbildung 4-15 A). Zum Vergleich der Stimulierbarkeit der Zellen mit 10 μM Carbachol nach vorheriger Stimulation mit 1 μM Carbachol, wurde das maximale Ratio $R(340/380)_{\text{max}}$ bei Stimulation mit 10 μM Carbachol als X-faches des maximalen Ratios $R(340/380)_{\text{max}}$ bei Stimulation mit 1 μM Carbachol berechnet. Dadurch ließ sich feststellen, wie gut sich die Zellen, bei vorheriger Stimulation mit einer niedrigeren Carbachol-Konzentration, nach einer anschließenden Regenerationszeit von 2 min, erneut mit einer höheren Carbachol-Konzentration stimulieren ließen. Beide Genotypen wiesen dabei die gleiche Stimulierbarkeit mit Carbachol in höherer Konzentration auf (s. Abbildung 4-15 B).

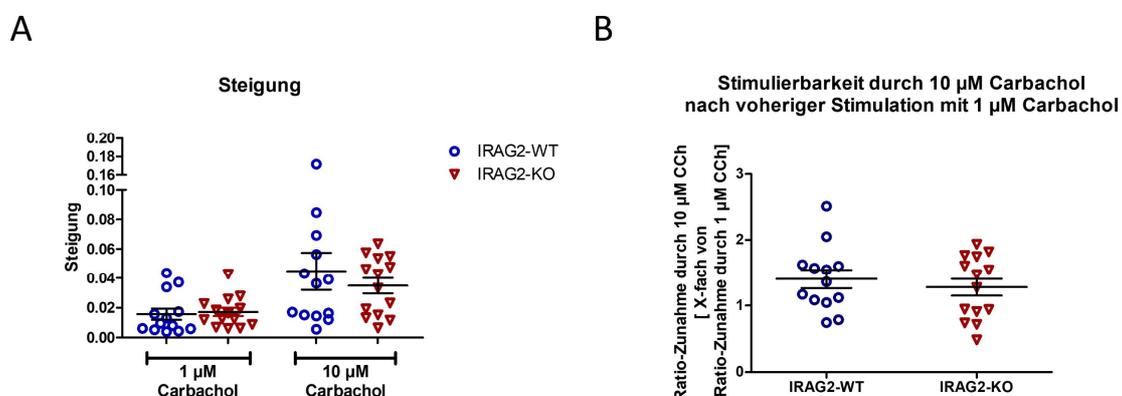


Abbildung 4-15: Geschwindigkeit der Ca^{2+} -Freisetzung und Stimulierbarkeit der pankreatischen Azinus-Zellen

A: Steigung der Ca^{2+} -Freisetzungskurven von IRAG2-WT (WT) und IRAG2-KO (KO) Azinus-Zellen (WT: n = 13 Messungen von 5 Tieren; KO: n = 14 Messungen von 5 Tieren). **B:** Stimulierbarkeit der Zellen bei Stimulation mit 10 μM Carbachol (CCh) nach vorheriger Stimulation mit 1 μM Carbachol und einer Regenerationszeit von 2 min unter Ringer-Perfusion. Das maximale Ratio $R(340/380)_{\text{max}}$ bei Stimulation mit 10 μM Carbachol wurde dabei als X-faches des maximalen Ratios $R(340/380)_{\text{max}}$ bei Stimulation mit 1 μM Carbachol berechnet (WT: n = 13 Messungen von 5 Tieren; KO: n = 14 Messungen von 5 Tieren). **A, B:** Jeder Datenpunkt stellt eine Messung dar, pro Messung wurde jeweils der Mittelwert aus allen Zellen gebildet. Graphen sind dargestellt mit Mittelwert \pm SEM.

Bei niedrigeren Carbachol-Konzentrationen zeigen Azinus-Zellen Ca^{2+} -Oszillationen. Diese oszillierenden Signale sind das Resultat einer Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern und anschließender ATP-abhängiger Wiederaufnahme des freigesetzten Calciums [125, 144]. Ca^{2+} -Oszillationen waren bei der Stimulation der Zellen mit $1 \mu\text{M}$ Carbachol sowohl in den Azinus-Zellen der IRAG2-WT Tiere (s. Abbildung 4-16 A) als auch in denen der IRAG2-KO Tiere (s. Abbildung 4-16 B) detektierbar. Die Peaks der oszillierenden Signale wurden über einen Zeitraum von einer Minute ausgezählt und als Oszillationen/min angegeben. IRAG2-KO Azini zeigten dabei eine signifikant höhere Frequenz an Oszillationen als Azini von IRAG2-WT Tieren (s. Abbildung 4-16 C).

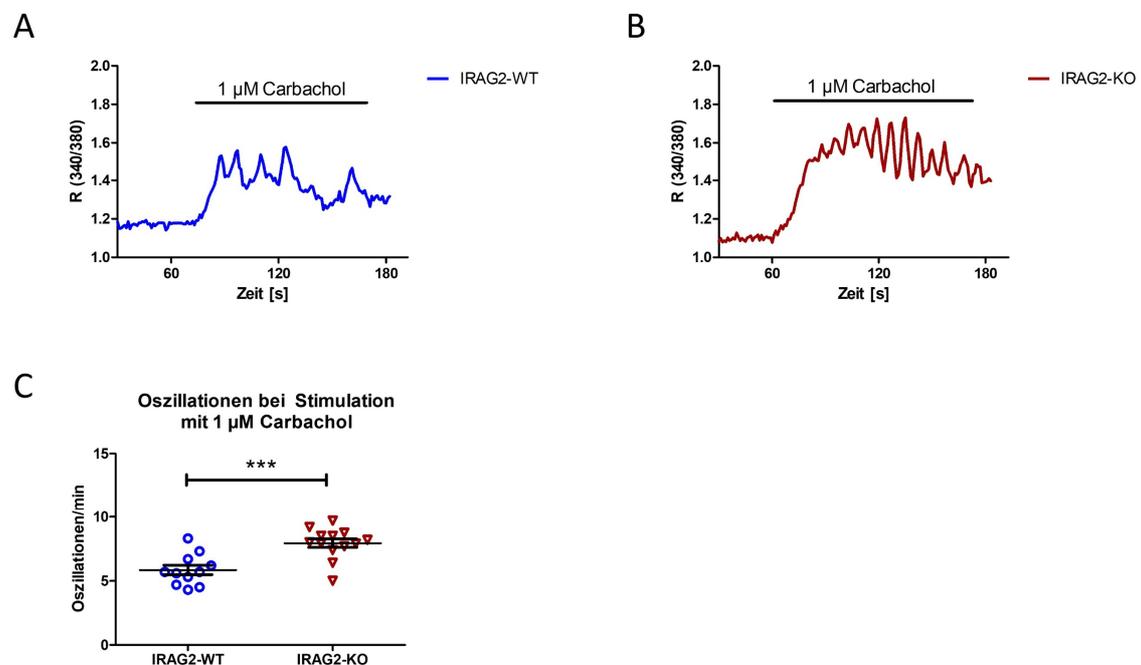


Abbildung 4-16: Ca^{2+} -Oszillationen in Azinus-Zellen

A, B: Ca^{2+} -Oszillationen in pankreatischen Azinus-Zellen von IRAG2-WT (**A**) und IRAG2-KO (**B**) Mäusen bei Stimulation mit $1 \mu\text{M}$ Carbachol. **C:** Peaks der oszillierenden Signale von IRAG2-WT ($n = 11$ Messungen von 5 Tieren) und IRAG2-KO ($n = 13$ Messungen von 5 Tieren) wurden pro Minute ausgezählt und die Frequenz der Oszillationen angegeben als Oszillationen/min. Jeder Datenpunkt stellt eine Messung dar, pro Messung wurde dabei der Mittelwert aus allen oszillierenden Zellen gebildet. Graphen sind dargestellt mit Mittelwert \pm SEM. Statistisch signifikante Unterschiede sind angegeben als (***) ($p < 0,001$).

4.2.5 Vergleich der Amylase-Sekretion in isolierten pankreatischen Azini von IRAG2-WT und IRAG2-KO Mäusen

Die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern bewirkt in pankreatischen Azinus-Zellen eine Exozytose der Zymogengranula und somit eine Sekretion von Amylase [52, 82, 98]. Da die Ca^{2+} -Freisetzung durch IRAG2 in den Azinus-Zellen des exokrinen Pankreas beeinflusst wird (s. 4.2.4), wurde nun die Amylase-Sekretion und damit die Funktion des exokrinen Pankreas in Azini von IRAG2-WT und IRAG2-KO Mäusen untersucht. Die isolierten Azini wurden dazu für je 30 min mit ddH₂O (für die basale Sekretion) und mit 1 μ M oder 10 μ M Carbachol stimuliert, um anschließend die in diesem Zeitraum sezernierte Amylase mittels Amylase-Assay zu bestimmen. Die Berechnung der Menge an sezernierter Amylase erfolgte dabei prozentual des Totalinhaltes an Amylase in den Azini.

Die unstimulierte, basale Amylase-Sekretion im Zeitraum von 30 min war in den Azini der IRAG2-KO Tiere signifikant verringert, verglichen mit denen der IRAG2-WT Mäuse. Bei Stimulation mit 1 μ M und 10 μ M Carbachol war die Amylase-Sekretion im IRAG2-KO zwar geringer im Vergleich zum IRAG2-WT, jedoch war dieser Effekt nicht signifikant (s. Abbildung 4-17 A).

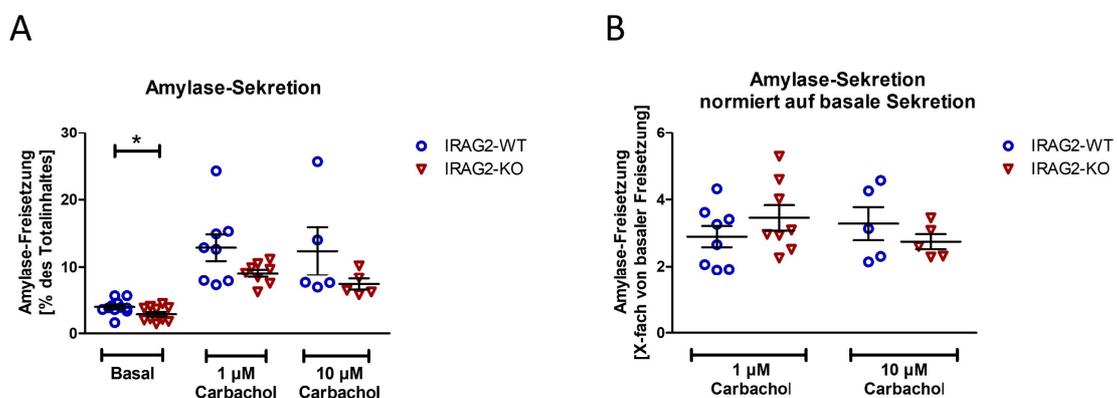


Abbildung 4-17: Amylase-Sekretion in pankreatischen Azinus-Zellen

A: Amylase-Sekretion in Prozent des Totalinhaltes an Amylase in Azini von IRAG2-WT (WT) und IRAG2-KO (KO) Mäusen (basal: WT: n = 11, KO: n = 11; 1 μ M Carbachol: WT: n = 8; KO: n = 8; 10 μ M Carbachol: WT: n = 5; KO: n = 5). **B:** Amylase-Sekretion in IRAG2-WT und IRAG2-KO Azini als X-faches der basalen Amylase-Sekretion (WT: n = 8; KO: n = 8; 10 μ M Carbachol: WT: n = 5; KO: n = 5) nach Stimulation mit 1 μ M Carbachol und 10 μ M Carbachol. **A, B:** Die einzelnen Datenpunkte in den Graphen symbolisieren je eine Maus. Alle Graphen sind mit Mittelwert \pm SEM dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede sind angegeben als (*) ($p < 0,05$).

Die stimulierte, prozentuale Amylase-Sekretion wurde anschließend auf die basale, prozentuale Amylase-Sekretion normiert. Hier zeigte sich bei Stimulation mit 1 μM Carbachol eine leicht erhöhte, jedoch nicht signifikante, Amylase-Sekretion X-fach der basalen Sekretion in den IRAG2-KO Zellen, verglichen mit den IRAG2-WT Zellen. Bei Stimulation mit 10 μM Carbachol war dies nicht zu beobachten (Abbildung 4-17 B).

4.2.6 Vergleich der Amylase-Aktivität in Lysaten und im Plasma von IRAG2-WT und IRAG2-KO Mäusen

Die Aktivität der Amylase wurde sowohl in Pankreas-Lysaten als auch im Plasma von IRAG2-WT und IRAG2-KO Mäusen mit Hilfe eines Amylase-Aktivitäts-Assay Kits bestimmt. Die Amylase-Aktivität in den Pankreas-Lysaten wurden dabei auf die Proteinmenge der Lysate normiert. In den Pankreas-Lysaten war kein signifikanter Unterschied in der Amylase-Aktivität zwischen den beiden Genotypen feststellbar (s. Abbildung 4-18 A). Auch im Plasma wurden keine Unterschiede zwischen IRAG2-WT und IRAG2-KO Tieren bezüglich der Aktivität der Amylase detektiert (s. Abbildung 4-18 B).

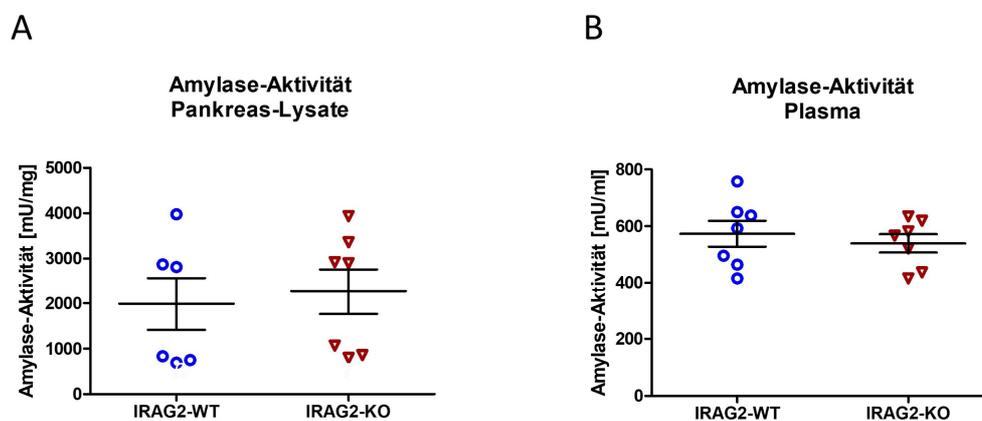


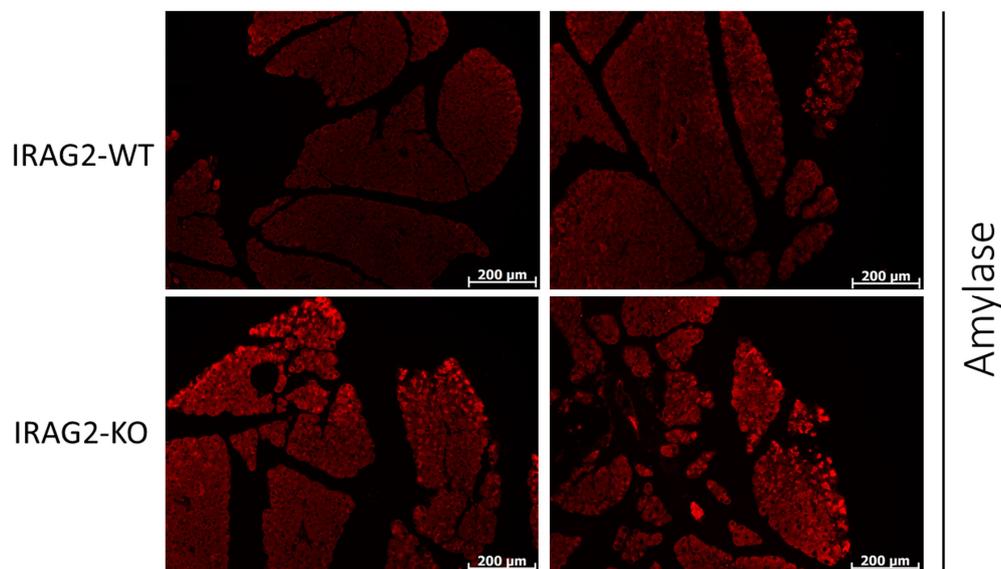
Abbildung 4-18: Amylase-Aktivität in Pankreas-Lysaten und im Plasma

A: Amylase-Aktivität in mU/mg in Pankreas-Lysaten von IRAG2-WT (WT) und IRAG2-KO (KO) Tieren (WT: n = 6; KO: n = 7). **B:** Amylase-Aktivität in mU/ml im Plasma von IRAG2-WT (WT) und IRAG2-KO (KO) Tieren (WT: n = 7; KO: n = 7). Die einzelnen Datenpunkte symbolisieren je eine Maus. Die Graphen sind mit Mittelwert \pm SEM angegeben.

4.2.7 Immunhistochemische Analyse der Amylase-Menge in den Pankreata von IRAG2-WT und IRAG2-KO Mäusen

Wie in Kapitel 4.2.5 beschrieben, ist die basale Amylase-Sekretion in den Azinus-Zellen der IRAG2-KO Mäuse im Vergleich zu denen der IRAG2-WT Mäuse signifikant verringert. Unterschiede in der Aktivität der Amylase sind dabei jedoch nicht feststellbar (s. 4.2.6). Mittels Immunhistochemie wurde die Gesamt-Amylase-Menge in den Pankreata beider Genotypen analysiert (s. Abbildung 4-19).

A



B

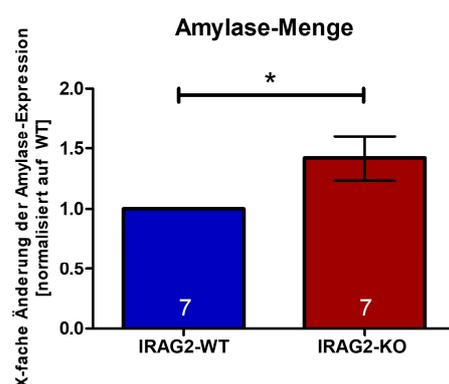


Abbildung 4-19: Immunhistochemische Analyse der Amylase-Expression im Pankreas

A: Repräsentative Aufnahmen der immunhistochemischen Analyse der Amylase-Expression an Paraffinschnitten der Pankreata von IRAG2-WT und IRAG2-KO Tieren (50× Vergrößerung). **B:** Statistische Auswertung der Amylase-Expression nach Quantifizierung der Expression in IRAG2-WT (WT) und IRAG2-KO (KO) Pankreata (WT: n = 7; KO: n = 7). Die Expressionsmenge der Amylase wurde dabei angegeben als X-fache Änderung der Amylase-Expression normiert auf den IRAG2-WT. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM. Statistisch signifikante Unterschiede sind angegeben als (*) ($p < 0,05$).

Dazu wurde die Expression der Amylase anhand eines Amylase-Antikörpers in Paraffinschnitten der Pankreata untersucht und quantifiziert. Die Amylase-Expression im IRAG2-KO wurde dabei als X-fache Änderung der Expression bezogen auf den IRAG2-WT angegeben. Es zeigte sich hierbei eine signifikante Erhöhung der Expression von Amylase in den Azini der IRAG2-KO Tiere, verglichen mit der Expression in den Azini der IRAG2-WT Tiere (s. Abbildung 4-19 A, B).

4.2.8 Histologische Untersuchung der Pankreata mittels HE-Färbung

Die Amylase wird im Pankreas in den Zymogengranula der Azinus-Zellen gespeichert und bei Stimulation mit sekretionsfördernden Substanzen freigesetzt [52, 82]. Da die Expression von Amylase in den IRAG2-KO Tieren erhöht ist (s. 4.2.7), wurde die Morphologie der Azini sowie die Menge an zymogenen Granula bei beiden Genotypen näher betrachtet (s. Abbildung 4-20).

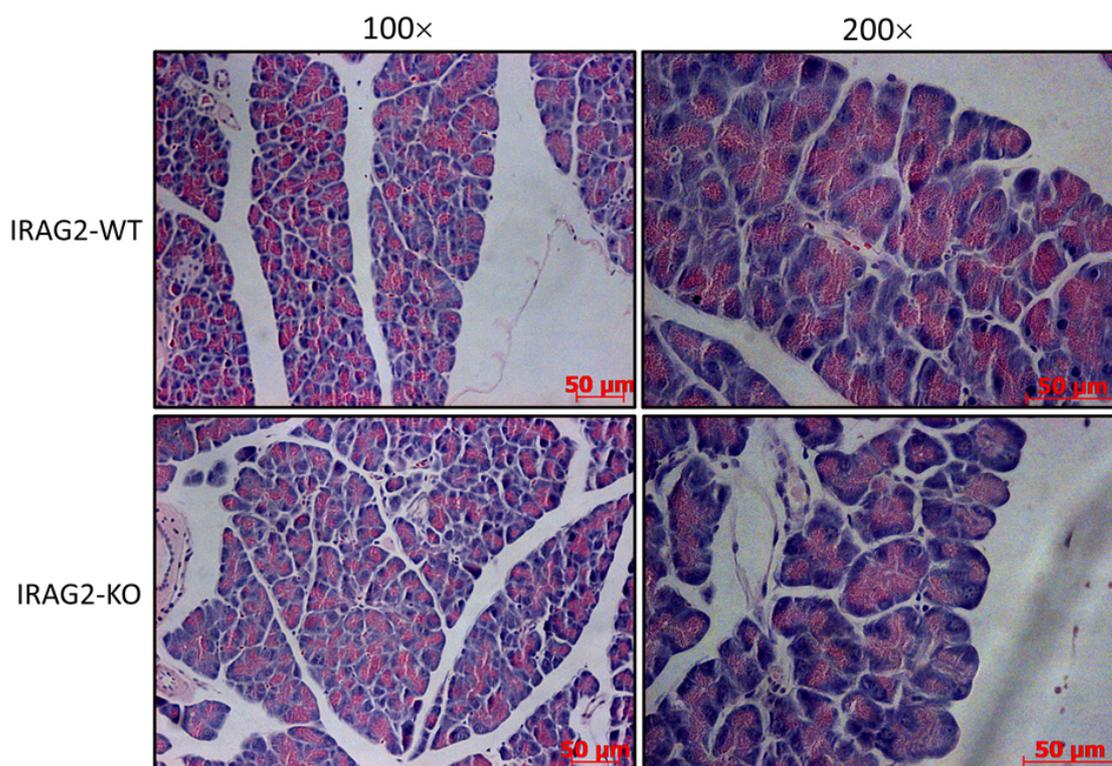


Abbildung 4-20: Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Pankreata

Repräsentative Aufnahmen der Hämatoxylin-Eosin-Färbung an Paraffinschnitten der Pankreata von IRAG2-WT und IRAG2-KO Tieren (100× Vergrößerung und 200× Vergrößerung).

Dazu wurde eine Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung an Paraffinschnitten der Pankreata von IRAG2-WT und IRAG2-KO Mäusen durchgeführt, mit deren Hilfe die basischen Strukturen der Zymogengranula, die in den apikalen Polen der Azinus-Zellen lokalisiert sind, rot angefärbt werden konnten. Saure Strukturen hingegen, wie die Zellkerne im basalen Teil der Azinus-Zellen, erschienen blau.

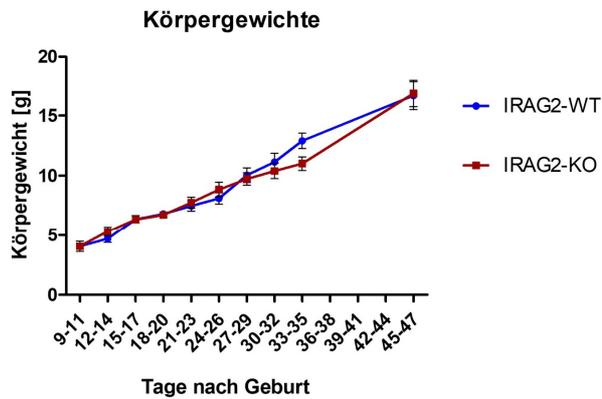
Bei der HE-Färbung war dabei weder in der Menge der Zymogengranula noch in der Morphologie der Azini ein Unterschied zwischen IRAG2-WT und IRAG2-KO Tieren erkennbar (s. Abbildung 4-20).

4.2.9 Analyse der Gewichte von IRAG2-WT und IRAG2-KO Mäusen bis zum Absetzen

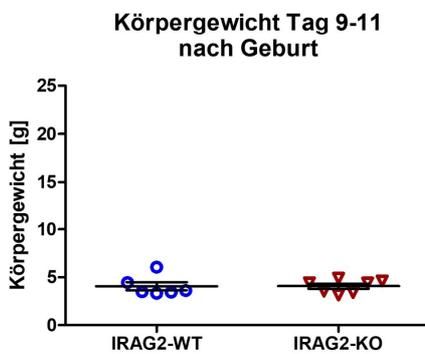
Eine Störung der Sekretion von Verdauungsenzymen aus dem exokrinen Pankreas kann die Verdauung von Nahrungsbestandteilen beeinträchtigen und sich somit auf das Körpergewicht von Tieren auswirken [40, 96].

Da die Deletion von IRAG2 zu einer Verringerung der basalen Amylase-Sekretion führt (s. 4.2.5), wurde der Einfluss dieser Sekretions-Verringerung auf die Körpergewichte der Tiere betrachtet. Dazu wurden die Tiere ab einem Alter von 10 Tagen nach der Geburt zur Markierung mit einem nummerierten Ohrclip versehen und anschließend alle 2-3 Tage bis etwa Tag 45 nach der Geburt gewogen. Die Entwicklung der Gewichte von IRAG2-WT und IRAG2-KO Mäusen wurde anschließend graphisch dargestellt. Es konnten dabei über den zeitlichen Verlauf keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen festgestellt werden (s. Abbildung 4-21 A). Die Auswertung der Gewichte ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen IRAG2-WT und IRAG2-KO Mäusen bis hin zu einem Absetzalter von etwa 21-27 Tagen (s. Abbildung 4-21 B, C). Kurz nach dem Absetzen der Tiere aus dem Elternkäfig zeigten jedoch die IRAG2-KO Tiere zwischen Tag 33-35 nach der Geburt eine Tendenz zu einem erniedrigten Körpergewicht, verglichen mit IRAG2-WT Tieren (s. Abbildung 4-21 D). Dieses normalisierte sich jedoch bis Tag 45 nach der Geburt wieder. Ab Tag 45 nach der Geburt waren wiederum keine Unterschiede in den Körpergewichten zwischen den beiden Genotypen erkennbar (s. Abbildung 4-21 E).

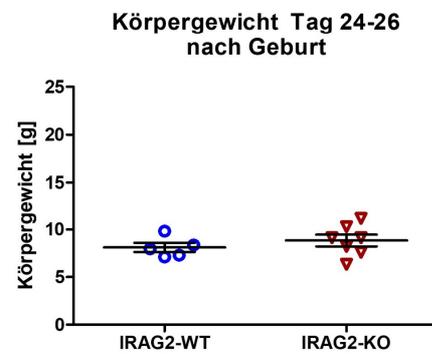
A



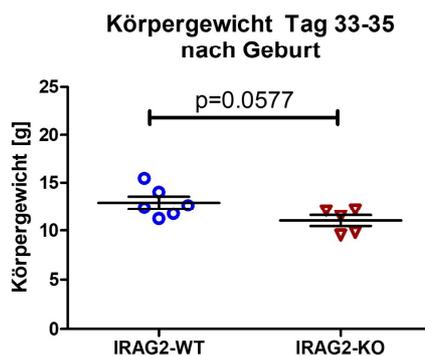
B



C



D



E

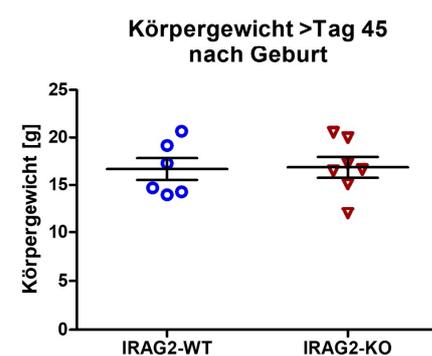


Abbildung 4-21: Gewichte der Tiere ab Tag 10 nach der Geburt

A: Verlauf der Körpergewichte der IRAG2-WT und IRAG2-KO Tiere von Tag 10 bis Tag 47 nach der Geburt. B-E: Direkter Vergleich der Körpergewichte von IRAG2-WT (WT) und IRAG2-KO (KO) Tieren an Tag 9-11 nach der Geburt (WT: n = 6; KO: n = 7) (B), Tag 24-26 nach der Geburt (WT: n = 5; KO: n = 7) (C), Tag 33-35 nach der Geburt (WT: n = 6; KO: n = 5) (D) und älter als Tag 45 nach der Geburt (WT: n = 6; KO: n = 7) (E). Die einzelnen Datenpunkte symbolisieren je eine Maus. Alle Graphen sind mit Mittelwert \pm SEM angegeben.

5 Diskussion

5.1 Analyse der Expression von IRAG2 und dessen Interaktionspartnern

5.1.1 Expression von IRAG2 in Thrombozyten und im Pankreas

In der vorliegenden Arbeit wurde unter anderem die Expression des Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor assoziierten 2 (IRAG2), das auch als Jaw1 oder *lymphoid restricted membrane protein* (LRMP) bezeichnet wird, in verschiedenen Organen und Zelltypen untersucht. Diese wurde bereits zuvor in einigen murinen und humanen Organen beschrieben, vor allem in lymphatischen Geweben und Zellen. Erstmals erfolgten Nachweise der Proteinexpression im Thymus und der Milz von Mäusen. In murinen B-Zelllinien und T-Zelllinien konnte zudem die Expression der mRNA nachgewiesen werden [5]. Weiterhin konnte in humanen Geweben eine Expression des IRAG2-Proteins in der Zunge, in der Milz und in neoplastischen Geweben, wie zum Beispiel in B-Zell-Lymphomen, mittels Immunhistochemie gezeigt werden [124]. Auch in anderen nicht-lymphoiden Geweben, wie im Sinusknoten, in Bürstenzellen des Darms oder in circumvallaten, foliaten und fungiformen Geschmackspapillen der Zunge war eine Expression von IRAG2 in Mäusen zu beobachten [23, 97, 116].

Zur Detektion von IRAG2 in weiteren Geweben und Zellen wurde eine Mauslinie generiert (lacZ × IRAG2-KO), die unter der Kontrolle des *Irag2*-Promotors eine β -Galactosidase exprimiert (s. 3.1.2). Mit Hilfe dieser war es möglich, IRAG2 indirekt über die Expression der β -Galactosidase in den lacZ × IRAG2-KO Tieren zu lokalisieren. Dafür wurde die Expression der β -Galactosidase – als Reporter für IRAG2 – sowohl histologisch, anhand der X-Gal Färbung zur Detektion der β -Galactosidase-Aktivität, als auch proteinbiochemisch, mit Hilfe des Western Blots, analysiert. Zudem konnte IRAG2 auch direkt über einen IRAG2-spezifischen Antikörper im Western Blot nachgewiesen werden.

Eine Expression von IRAG2 wurde in dieser Arbeit sowohl in Thrombozyten als auch im Pankreas nachgewiesen (s. Abbildung 4-1 und Abbildung 4-9). Zudem konnte die schon zuvor von *Behrens et al.* beschriebene IRAG2-Expression in Thymus und Milz bestätigt werden (s. Abbildung 4-1 A) [5].

Im humanen Protein Atlas (www.proteinatlas.org) wird bereits eine Expression von IRAG2 im humanen Pankreas beschrieben [126]. Dabei zeigt sich eine schwache Expression in den Ductus-Zellen und eine starke in den Azinus-Zellen des humanen Pankreas, wo IRAG2 vor allem am apikalen Pol der Zelle lokalisiert ist. In den humanen Inselzellen ist hingegen kein IRAG2 zu finden. Im Rahmen dieser Arbeit wird erstmals die Expression von IRAG2 in

murinen pankreatischen Azinus-Zellen nachgewiesen (s. Abbildung 4-9), was mit der Expression im humanen Pankreas korreliert. Im Gegensatz zu den Daten des humanen Protein Atlas wird IRAG2 jedoch hier nicht in den Ductus-Zellen des murinen exokrinen Pankreas detektiert (s. Abbildung 4-10). Eine Lokalisation von IRAG2 in den Langerhans-Inseln des murinen Pankreas wird ebenso nicht beobachtet (s. Abbildung 4-9 F), was wiederum mit dem humanen Pankreas übereinstimmt.

IRAG2 weist, vor allem in der coiled-coil-Domäne, eine ausgeprägte Homologie von 44 % zum Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor assoziierten cGMP Kinase Substrat 1 (IRAG1) auf [97, 115, 116]. Aufgrund der Expression von IRAG2 in den murinen pankreatischen Azinus-Zellen, wurde auch überprüft, ob dessen Homolog IRAG1 darin exprimiert wird. Eine IRAG1-Expression kann hierbei weder in den murinen Azinus-Zellen noch im gesamten Pankreasgewebe beobachtet werden (s. Abbildung 4-11), womit auch eine direkte Interaktion von IRAG1 und IRAG2 ausgeschlossen werden kann. Dieses Ergebnis steht jedoch in Kontrast zum Expressionsmuster von IRAG1 im humanen Pankreas. Im humanen Protein Atlas ist eine Expression von IRAG1 in humanen pankreatischen Azinus-Zellen detektierbar. Während IRAG2 dabei am apikalen Pol der humanen Azinus-Zellen lokalisiert ist, zeigt sich bei IRAG1 eine vermehrte Expression im basalen Teil der humanen Azinus-Zellen. Auch in den endokrinen Zellen und den Ausführungsgängen konnte eine schwache IRAG1-Expression im humanen Pankreas nachgewiesen werden [126]. Somit stimmt das Expressionsmuster von IRAG2 und IRAG1 in verschiedenen murinen Zellen des Pankreas nicht komplett mit dem in humanen Pankreas-Zellen überein.

Da IRAG1 in humanen sowie in murinen Thrombozyten exprimiert wird [2], wurde zunächst auch die Expression von IRAG2 in murinen Thrombozyten untersucht. *Makhoul et al.* zeigten im Rahmen eines quantitativen Phosphoproteom-Ansatzes, zur Analyse möglicher Phosphoproteine in humanen Thrombozyten, bereits mögliche Phosphorylierungsstellen von IRAG2 auf. Dies spricht dementsprechend für eine Expression von IRAG2 in humanen Thrombozyten [78]. In der vorliegenden Arbeit wird nun erstmalig eine Expression von IRAG2 auch in den murinen Thrombozyten nachgewiesen (s. Abbildung 4-1).

Die Auswirkung der Expression von IRAG2 in Thrombozyten und in pankreatischen Azinus-Zellen auf die Funktion dieser Zellen war dabei bislang weitgehend unbekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Fragestellung untersucht und in den folgenden Kapiteln erörtert.

5.1.2 Interaktionspartner von IRAG2 in Thrombozyten und im Pankreas sowie Bedeutung der Interaktion mit den IP₃-Rezeptoren

Wie bereits zu Beginn erwähnt, handelt es sich bei IRAG2 um ein Homolog zu IRAG1, mit ausgeprägter Homologie in der coiled-coil-Domäne [97, 115, 116]. IRAG1 bildet sowohl in Thrombozyten als auch in Glattmuskelzellen einen Makrokomplex, bestehend aus IRAG1, der cGMP-abhängigen Proteinkinase I β (PKGI β) und dem Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor Typ 1 (IP₃R1). Dabei ist die coiled-coil-Domäne von IRAG1 entscheidend für die Interaktion mit dem IP₃R1 [2, 45, 109]. Die stabile Interaktion von IRAG1 mit der PKGI β erfolgt über die Leucin-Zipper-Region am Aminoterminus der PKGI β und zwar unabhängig von der coiled-coil-Domäne des IRAG1-Proteins sowie auch cGMP-unabhängig [1]. Aufgrund der Homologie zwischen IRAG1 und IRAG2 wäre es denkbar, dass beide Proteine ähnliche Interaktionen zeigen. Daher wurden die Interaktionspartner von IRAG2 in Thrombozyten und im Pankreas untersucht, wo IRAG2 im Rahmen dieser Arbeit lokalisiert wurde. Interaktionen von IRAG2 mit IP₃-Rezeptoren wurden bereits in einigen anderen Organen und Zelllinien analysiert. Bei heterologer Expression von IRAG2 in COS7-Zellen und anschließender Immunpräzipitation, konnte eine Interaktion von IRAG2 mit dem IP₃R3 gezeigt werden. Zudem wird IRAG2 in Geschmackszellen vom Typ süß, bitter und umami mit dem IP₃R3 co-exprimiert [116]. In co-transfizierten MEF-Zellen (*mouse embryo fibroblast*) wird eine Interaktion von IRAG2 mit dem IP₃R2 beschrieben [23]. Allerdings konnte bisher noch keine Interaktion mit dem IP₃R1 nachgewiesen werden. Auch in Thrombozyten und im Pankreas war bislang nichts über Protein-Protein-Wechselwirkungen von IRAG2 bekannt. In dieser Arbeit erfolgte daher die Analyse der Interaktionspartner von IRAG2 mittels Co-Immunpräzipitation.

Die Untersuchung der zusammen mit IRAG2 gefällten Proteine in Thrombozyten zeigt eine Interaktion von IRAG2 mit dem IP₃R1, dem IP₃R2 sowie dem IP₃R3 (s. Abbildung 4-2 A). Bei der co-immunpräzipitierten Bande des IP₃R2 fiel dabei auf, dass diese bei einem niedrigeren Molekulargewicht und somit etwas tiefer verlief als die Bande in den jeweiligen Input-Proben. Dies könnte darauf hindeuten, dass IRAG2 mit einem kleineren Fragment des IP₃R2 interagiert, welches ein niedrigeres Molekulargewicht aufweist und nur bei einer Fällung detektierbar ist. Weiterhin ergab die Analyse keine direkte Interaktion von IRAG2 mit IRAG1. Auch konnte zwischen der PKGI β und IRAG2 keine feste Interaktion in Thrombozyten festgestellt werden. Die Bildung eines Makrokomplexes aus IRAG1, IRAG2, IP₃R1 und PKGI β kommt in murinen Thrombozyten somit nicht zustande. Das Ergebnis, dass es zwischen IRAG2 und der PKGI β zu keiner stabilen Interaktion kommt, war dabei auch nicht überraschend, da die stabile

Interaktionsstelle des IRAG1-Proteins mit der Leucin-Zipper-Region der PKGI β zwischen den Aminosäuren 152 und 184 des N-terminalen Teils von IRAG1 lokalisiert ist. Dieser Teil fehlt jedoch im IRAG2-Protein [1, 19].

Die Analyse der Interaktionspartner von IRAG2 im Pankreas zeigt, genau wie in Thrombozyten, eine Interaktion von IRAG2 mit den IP₃-Rezeptor Subtypen 1, 2 und 3 (s. Abbildung 4-12). Die IP₃-Rezeptoren sind in den pankreatischen Azinus-Zellen dabei am apikalen, sekretorischen Pol der Zelle lokalisiert, wo auch im humanen Protein Atlas die Expression von humanem IRAG2 beschrieben wurde [126, 145]. Da IRAG2 im murinen Pankreas nur in den Azinus-Zellen exprimiert wird (s. Abbildung 4-9 und Abbildung 4-10) und im Pankreas stabil mit den IP₃-Rezeptoren interagiert (s. Abbildung 4-12), führt dies zu der Annahme, dass IRAG2 ebenso am apikalen Pol der Azinus-Zellen im murinen Pankreas lokalisiert ist. Zudem war im Rahmen der X-Gal Färbung die β -Galactosidase-Aktivität, welche als Reporter für IRAG2 dient, am apikalen Pol der Azinus-Zelle zu beobachten (s. Abbildung 4-9 F).

IP₃-Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle in humanen und murinen Organismen. Es handelt sich hierbei um Ca²⁺-Kanäle, die für intrazelluläre Ca²⁺-Signalwege von zentraler Bedeutung sind. Die Bindung von Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) an die IP₃-Rezeptoren führt dabei zu einer Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern. Das Ausmaß der Beteiligung der einzelnen Subtypen an diesen Signalwegen ist jedoch noch weitgehend unerforscht [50, 121]. Im Gehirn beispielweise liegt eine hohe Expression des IP₃R1 vor. Dort wird diesem Rezeptor Subtyp eine Rolle bei Lernprozessen, bei bestimmten Verhaltensweisen sowie bei der Gedächtnisleistung zugeschrieben [37, 59, 81, 93]. In Thrombozyten kommt es durch die Bildung eines Makrokompleses aus IP₃R1, PKGI β und IRAG1, nach cGMP-abhängiger Phosphorylierung von IRAG1, zu einer Hemmung der Ca²⁺-Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) und damit zu einer Hemmung der Thrombozytenaggregation [1, 2, 107, 109]. Die IP₃-Rezeptor Subtypen 2 und 3 hingegen zeigen eine wichtige Funktion bei exokrinen Sekretionsmechanismen [40]. Änderungen der Expressionslevel dieser Rezeptoren könnten sich damit auch auf physiologische Prozesse auswirken. Aufgrund der Interaktion von IRAG2 mit den verschiedenen IP₃-Rezeptor Subtypen, wurden in Thrombozyten und Pankreata von IRAG2-WT und IRAG2-KO Tieren daher die Expressionsmengen dieser Rezeptoren analysiert.

In IRAG2-KO Tieren kommt es in den Thrombozyten zu keiner Änderung in der Expression der verschiedenen IP₃-Rezeptor Subtypen. Die Expression der PKGI β und von IRAG1 in

IRAG2-KO Thrombozyten unterscheidet sich ebenfalls nicht von der in IRAG2-WT Thrombozyten (s. Abbildung 4-3). Diese Interaktion von IRAG2 mit den IP₃-Rezeptoren ermöglicht jedoch eine Modulation der Rezeptoren durch IRAG2, wodurch die Ca²⁺-Freisetzung beeinflusst wird. Dies wird in Kapitel 5.2.2 näher diskutiert.

Im Pankreas zeigt sich in den IRAG2-KO Tieren eine Hochregulation der IP₃R3-Expression sowie eine Verminderung der IP₃R2-Expression, verglichen mit den IRAG2-WT Tieren. Eine Veränderung der IP₃R1-Expression ist dabei jedoch nicht zu sehen (s. Abbildung 4-13). Die Auswirkungen dieser Interaktion und der damit verbundenen Regulation der IP₃R-Expression auf die Ca²⁺-Freisetzung in den pankreatischen Azinus-Zellen wird in Kapitel 5.3.1 weiter erörtert.

5.2 Funktion von IRAG2 in Thrombozyten

5.2.1 NO/cGMP-abhängige Phosphorylierung von IRAG2

IRAG1 bildet sowohl in Thrombozyten als auch in Glattmuskelzellen einen trimären Komplex mit dem IP₃R1 und der PKGI β . Innerhalb dieses stabilen Komplexes kommt es nach Stimulation mit cGMP zu einer Phosphorylierung von IRAG1 durch die PKGI β und infolgedessen zu einer Hemmung der Ca²⁺-Freisetzung aus dem ER [1, 2, 45, 109]. Wie bereits in Kapitel 5.1.2 erläutert, findet in Thrombozyten zwar eine Interaktion von IRAG2 mit den IP₃-Rezeptoren statt, jedoch kann keine stabile Interaktion mit der PKGI β gezeigt werden. Die Bildung eines Makrokompleses, in dem sich IP₃R1, IRAG1, PKGI β sowie IRAG2 befinden, ist somit nicht nachweisbar. Dieses Ergebnis schließt jedoch nicht aus, dass IRAG2 nach Stimulation mit cGMP über die PKGI phosphoryliert werden kann. *Makhoul et al.* konnten bereits im Rahmen eines Phosphoproteom-Ansatzes, zur Analyse von Phosphoproteinen in humanen Thrombozyten, Phosphorylierungsstellen von humanem LRMP aufzeigen. Nach Stimulation mit NO-Donoren oder dem sGC-Stimulator Riociguat wurden dabei die Aminosäuren Ser363, Thr375 und Ser418 des humanen LRMP als Phosphorylierungsstellen detektiert [78]. Dabei zeigen die Phosphorylierungsstellen Ser363 und Thr375 (Konsensus-Sequenzen: RSAS³⁶³ und RRVT³⁷⁵) des IRAG2-Proteins eine ausgeprägte Homologie zu den identifizierten Phosphorylierungsstellen Ser664 und Ser677 (Konsensus-Sequenzen: RSMS⁶⁶⁴ und RRVS⁶⁷⁷) des IRAG1-Proteins [78, 109].

In der vorliegenden Arbeit kann sowohl *in vitro* in lysierten Thrombozyten, also auch *ex vivo* in noch funktionsfähigen Thrombozyten, eine Phosphorylierung von murinem IRAG2, nach Stimulation mit den cGMP-Analoga 8-Br-cGMP und 8-pCPT-cGMP, gezeigt werden (s. Abbildung 4-4). Die genauen Phosphorylierungsstellen blieben dabei jedoch noch unklar und müssen zukünftig weiter analysiert werden. Zur Detektion der IRAG2-Phosphorylierung wird dabei ein Antikörper genutzt, der PKA-, PKC- und PKG-abhängige Phosphorylierungen an Serin- und Threonin-Resten der Proteine erkennt. Nach Immunfällung von IRAG2 kann mit Hilfe dieses Antikörpers die IRAG2-spezifische Phosphorylierung detektiert werden. Da die Stimulation mit cGMP oder dessen Analoga 8-pCPT-cGMP und 8-Br-cGMP überwiegend eine Aktivierung der PKGI bewirkt, ist es so möglich, die PKGI-abhängige Phosphorylierung von IRAG2 zu betrachten [17, 80]. Welche Isoform der PKGI – PKGI α oder PKGI β – für die Phosphorylierung von IRAG2 verantwortlich ist, konnte dabei nicht abschließend geklärt werden. Es ist allerdings bekannt, dass in murinen Thrombozyten vorwiegend die PKGI β exprimiert wird und die PKGI α nur in geringen Mengen vorliegt. In humanen Thrombozyten hingegen wird nur die PKGI β exprimiert [2, 44]. Zudem wird IRAG1 in Thrombozyten durch die PKGI β phosphoryliert und die Phosphorylierungssequenzen von IRAG2 und IRAG1 zeigen, wie bereits weiter oben in diesem Kapitel erwähnt, ausgeprägte Homologien [2, 78, 109]. All diese Fakten führen letztlich zu der Annahme, dass auch die IRAG2-Phosphorylierung durch die PKGI β vermittelt wird. Für eine abschließende Bestätigung dieser Annahme, sind jedoch weitere Untersuchungen nötig.

5.2.2 Einfluss von IRAG2 auf die Ca²⁺-Freisetzung in Thrombozyten

Den Thrombozyten kommt eine bedeutende Rolle bei der Blutungsstillung zu. Nach einer Gefäßverletzung kommt es zur Adhäsion, zur Aktivierung und nachfolgend zur Aggregation der Thrombozyten. Durch diese Schritte kann der schnelle Verschluss eines Gefäßes gewährleistet und somit ein großer Blutverlust vermieden werden. Allerdings können die selben Vorgänge auch dazu führen, dass durch Thrombozyten gebildete Plaques rupturieren und es somit zum Verschluss ganzer Gefäße und dementsprechend zu Herzinfarkten, Schlaganfällen oder anderen Organinfarkten kommt [104]. Ein wichtiger *second-messenger* bei diesen Prozessen ist dabei das Calcium. Eine Erhöhung von zytosolischem Calcium führt zur Aktivierung von Thrombozyten sowie zur Degranulation der sekretorischen Granula und damit

zur Freisetzung weiterer Botenstoffe, die letztlich zur Aggregation der Thrombozyten führen [129].

Die Freisetzung von Calcium kann unter anderem durch Thrombin stimuliert werden. Dieses bindet an die sogenannten PAR-Rezeptoren (Protease-aktivierte-Rezeptoren), bei denen es sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) handelt und die auf der Oberfläche der Thrombozyten exprimiert werden. Durch Bindung von Thrombin an diese Rezeptoren wird die Phospholipase C (PLC) aktiviert, wodurch es zu einer Bildung von IP_3 kommt. Das gebildete IP_3 stimuliert wiederum die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern über die Bindung an IP_3 -Rezeptoren, was in einer Aktivierung des GP IIb/IIIa-Rezeptors resultiert und damit zur Fibrinogen-induzierten Thrombozytenaggregation führt [8, 94, 122, 129].

In Thrombozyten sind alle IP_3 -Rezeptor Subtypen vertreten. Die höchste Expression ist dabei für den IP_3R1 und den IP_3R2 beschrieben. Verschiedene Kinasen regulieren dabei die Aktivität der IP_3 -Rezeptoren durch deren Phosphorylierung [129]. Wie bereits in Kapitel 5.1.2 diskutiert, interagiert IRAG2 mit allen IP_3 -Rezeptor Subtypen in murinen Thrombozyten. Aus diesem Grund wurden die Auswirkungen dieser Interaktion auf die Ca^{2+} -Signalwege in murinen Thrombozyten im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Dazu wurde die Ca^{2+} -Freisetzung in Thrombozyten von IRAG2-WT und IRAG2-KO Tieren nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen an Thrombin verglichen. Es wird dabei, verglichen mit den IRAG2-WT Tieren, eine verringerte Ca^{2+} -Freisetzung in Thrombozyten von IRAG2-KO Tieren beobachtet. Dies bedeutet somit, dass IRAG2 die Freisetzung von Calcium in Thrombozyten fördert (s. Abbildung 4-5). Damit zeigt IRAG2 den gegenteiligen Effekt zu IRAG1. Da IRAG1 nach Phosphorylierung durch die PKGI β die Ca^{2+} -Freisetzung in Thrombozyten hemmt und IRAG2 ebenso über die PKGI phosphoryliert wird, wäre eine denkbare Theorie, dass die PKGI-abhängige Phosphorylierung von IRAG2 die Ca^{2+} -Freisetzung fördert [1, 2, 109]. Um diese These zu stützen, muss jedoch im Rahmen zukünftiger Messungen noch der Einfluss von NO/cGMP auf die Ca^{2+} -Freisetzung in IRAG2-WT und IRAG2-KO Thrombozyten analysiert werden.

Ob die Interaktion mit dem IP_3R1 , dem IP_3R2 oder dem IP_3R3 für den Einfluss von IRAG2 auf die Ca^{2+} -Freisetzung verantwortlich ist, bleibt hierbei jedoch unklar. Bei IRAG1 ist vor allem der trimäre Komplex aus PKGI β , IRAG1 und IP_3R1 für die Hemmung der Ca^{2+} -Freisetzung von Bedeutung. Daher wäre es denkbar, dass auch bei IRAG2 die Modulation des IP_3R1 durch IRAG2 für die Förderung der Ca^{2+} -Freisetzung verantwortlich ist. Da IRAG2 jedoch mit allen Subtypen interagiert, ist auch ein Zusammenspiel der Interaktion von IRAG2 mit allen IP_3 -Rezeptoren nicht auszuschließen. Aufgrund der geringen Expression des IP_3R3 in

Thrombozyten [129], scheint die Interaktion von IRAG2 mit dem IP₃R3 dabei aber eher von untergeordneter Bedeutung zu sein.

Andere Arbeitsgruppen untersuchten bereits die Auswirkung von IRAG2 auf die Ca²⁺-Freisetzung in verschiedenen Zelllinien. *Chang et al.* beschreiben dabei nach Stimulation mit Ionomycin eine verminderte Ca²⁺-Freisetzung in murinen Embryo-Fibroblasten, die kein IRAG2 enthalten. Wird jedoch IRAG2 transfiziert, ist die Ca²⁺-Freisetzung nach Stimulation erhöht. IRAG2 fördert somit den Ca²⁺-Flux in diesen Zellen [23]. Auch *Okumura et al.* zeigen eine verminderte Freisetzung von Calcium in HEK-Zellen (*human embryonic kidney*), die kein IRAG2 enthalten, verglichen mit Zellen, in denen IRAG2 exprimiert wird [95]. Diese Erkenntnisse stützen damit die These, dass IRAG2 die Ca²⁺-Freisetzung aus intrazellulären Speichern in das Zytosol fördert.

IRAG1 bildet in Thrombozyten einen trimären Komplex mit dem IP₃R1 und der PKGI β . Nach Phosphorylierung durch die PKGI β , bewirkt IRAG2 dabei eine Hemmung der IP₃-vermittelten Ca²⁺-Freisetzung aus dem ER [1, 2, 109]. Somit haben IRAG1 und IRAG2 gegenteilige Auswirkungen auf die Ca²⁺-Freisetzung in Thrombozyten, da IRAG2 die Ca²⁺-Freisetzung in diesen Zellen fördert. Dies lässt die These aufstellen, dass IRAG2 den Gegenspieler zu IRAG1 in murinen Thrombozyten darstellt. Die verminderte Ca²⁺-Freisetzung in den IRAG2-KO Thrombozyten bewirkt dabei auch eine verringerte Aggregation der Thrombozyten. Somit sind auch in Bezug auf die Thrombozytenaggregation die gegenteiligen Effekte von IRAG1 zu beobachten (weitere Erörterung s. 5.2.3).

Die Untersuchung der basalen Ca²⁺-Mengen in murinen Thrombozyten zeigt keine Unterschiede zwischen IRAG2-WT und IRAG2-KO Tieren (s. Abbildung 4-5 A, B). Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen in den pankreatischen Azinus-Zellen, bei denen im IRAG2-KO eine geringere basale Ca²⁺-Menge detektiert wurde als in IRAG2-WT Zellen (s. Abbildung 4-14 B). Eine Begründung hierfür könnte die Co-Expression von IRAG1 und IRAG2 in Thrombozyten darstellen. Möglicherweise findet in Zelltypen, in denen beide Proteine exprimiert werden, keine Regulation des basalen Calciums durch IRAG2 statt. Jedoch scheint auch in pankreatischen Azini, in denen nur IRAG2 und kein IRAG1 lokalisiert ist, die basale Ca²⁺-Freisetzung durch IRAG2 gefördert zu werden (hierzu s. 5.3.1). Der genaue Einfluss der Co-Expression von IRAG1 und IRAG2 auf die Modulation der IP₃-Rezeptoren sowie auf die Ca²⁺-Freisetzung, bleibt jedoch unklar und muss zukünftig – am besten anhand von IRAG1/IRAG2-Doppel-KO Mausmutanten – untersucht werden.

5.2.3 Einfluss von IRAG2 auf die Thrombozytenaggregation und die NO/cGMP-abhängige Aggregationshemmung

Thrombozyten von IRAG1-KO Tieren weisen nach Stimulation mit den Agonisten Kollagen oder Thrombin eine höhere Aggregationsrate auf als Thrombozyten von Wildtyp-Tieren. Dementsprechend besitzt IRAG1 einen hemmenden Effekt auf die Agonist-induzierte Thrombozytenaggregation [107]. Thrombin fördert dabei, wie bereits im vorherigen Kapitel beschrieben, die Thrombozytenaggregation überwiegend über eine Aktivierung der PLC und einer damit verbundenen IP₃-abhängigen Ca²⁺-Freisetzung aus intrazellulären Speichern. Die Wirkung von Kollagen hingegen kann über verschiedene Mechanismen zustande kommen, wie zum Beispiel über Bindung an den Kollagen-Rezeptor GP VI, was zu einer Integrin-vermittelten Adhäsion der Thrombozyten an subendotheliale Oberflächen führt [94, 122, 129]. Nach Stimulation mit diesen Agonisten zeigen Thrombozyten von IRAG2-KO Tieren, gegenteilig zu IRAG1, eine reduzierte Aggregabilität, verglichen mit Wildtyp-Thrombozyten (s. Abbildung 4-6). Die verminderte Ca²⁺-Freisetzung, die nach Stimulation mit Thrombin in Thrombozyten der IRAG2-KO Tiere beobachtet werden konnte (s. 5.2.1), geht somit mit einer verringerten Thrombozytenaggregation einher. Während IRAG1 damit die Thrombozytenaggregation hemmt, fördert IRAG2 diese und scheint daher der Gegenspieler zu IRAG1 in Thrombozyten zu sein [107]. Gegenteilige Effekte von IRAG1 und IRAG2 konnten bereits von *Peters et al.* festgestellt werden. Dabei wurde eine Interaktion beider Proteine mit HCN4-Kanälen (*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-sensitive isoform 4*) beobachtet, jedoch üben IRAG1 und IRAG2 unterschiedliche Effekte auf diese Kanäle aus [97]. HCN4-Kanäle können spannungsabhängig aktiviert werden. Die Bindung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) an diese Kanäle führt zu einer Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit, indem die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung in Richtung depolarisierender Potentiale verschoben wird [29, 132, 138]. Durch die Interaktion mit IRAG1 kommt es hierbei zu einer Erhöhung der Kanalfunktion, indem es, unabhängig von der cAMP-Bindung, die Aktivierung der Kanäle in Richtung depolarisierender Potentiale verschiebt. IRAG2 hingegen bewirkt einen Funktionsverlust der Kanäle, indem es die cAMP-abhängige Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung in Richtung depolarisierender Potential reduziert und somit die Sensitivität der Kanäle für die cAMP-abhängige Aktivierung verringert [97]. Diese Daten stützen damit die These, dass es sich bei IRAG2 um den Gegenspieler zu IRAG1 handelt.

Wie bereits beschrieben, wird IRAG2 in Thrombozyten durch die Stimulation mit den cGMP-Analoga 8-pCPT-cGMP und 8-Br-cGMP phosphoryliert (s. 5.2.1). Um den Effekt der cGMP-abhängigen Phosphorylierung von IRAG2 auf die Thrombozytenaggregationshemmung zu untersuchen, wurden die Thrombozyten vor der Aggregation entweder mit dem NO-Donor Nitroprussid-Natrium (SNP) oder mit dem cGMP-Analogen 8-pCPT-cGMP inkubiert. Durch Aktivierung der NO/cGMP/PKG-Signalkaskade verursachen diese Substanzen eine Hemmung der Thrombozytenaggregation [17, 54, 80, 134]. Die Wirkung wird dabei über eine Phosphorylierung von IRAG1 vermittelt, was zu einer Hemmung der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER führt und in der Folge die Aggregation der Thrombozyten hemmt [2, 107, 109]. In IRAG2-KO Thrombozyten wird dabei, nach Vorinkubation mit den Inhibitoren, eine verringerte maximale Aggregationsrate beobachtet, verglichen mit den IRAG2-WT Thrombozyten, wenn die Aggregation durch Thrombin gestartet wurde (s. Abbildung 4-7 A-F). Bei Stimulation der Aggregation mit Kollagen, nach vorheriger Inkubation mit den Inhibitoren, war dieser Effekt jedoch nicht zu sehen (s. Abbildung 4-8 A-F). Dies bedeutet, dass die Aggregationshemmung durch NO/cGMP bei Deletion von IRAG2 stärker ist, wenn die Aggregation mit Thrombin induziert wird. Es lässt sich hierbei festhalten, dass es sich bei Thrombin um einen der effektivsten Agonisten der Thrombozytenaggregation handelt, der seine Wirkung vorwiegend über die Stimulation von PAR-Rezeptoren ausübt, durch die es letztlich zu einer erhöhten IP_3 -Bildung und zur Ca^{2+} -Freisetzung kommt. Die Wirkungen von Kollagen hingegen kann über verschiedene Mechanismen zustande kommen, wodurch sich die verstärkte NO/cGMP-abhängige Aggregationshemmung in IRAG2-KO Thrombozyten möglicherweise mit Thrombin besser hervorheben lässt als durch Kollagen [94, 129].

Auch dieser Effekt ist gegensätzlich zum Effekt von IRAG1 auf die Hemmung der Thrombozytenaggregation. IRAG1-KO Thrombozyten zeigen nach Vorinkubation mit cGMP-Analoga oder SNP keine oder nur eine schwache Aggregationshemmung [107]. Es liegt somit die Vermutung nahe, dass die Phosphorylierung von IRAG2, durch Aktivierung des NO/cGMP/PKG-Signalweges, die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER und folglich die Thrombozytenaggregation fördert. Auch diese Resultate unterstützen weiter die Annahme, dass es sich bei IRAG2 möglicherweise um einen Gegenspieler von IRAG1 handelt.

In Wildtyp-Tieren konnte außerdem gezeigt werden, dass die Thrombusbildung nach einer Gefäßverletzung durch die NO/cGMP-abhängige Phosphorylierung von IRAG1 gehemmt wird. Nach Stimulation mit NO/cGMP weisen IRAG1-KO Thrombozyten dadurch eine erhöhte Bildung von Thromben auf, verglichen mit dem Wildtyp. IRAG1 wirkt sich somit präventiv auf die Bildung einer arteriellen Thrombose aus [2]. Da IRAG2 hingegen die

Thrombozytenaggregation fördert, könnte dies dementsprechend in einer vermehrten Thrombusbildung resultieren. Somit wäre es denkbar, dass IRAG2 eine Rolle bei der Pathogenese der Atherosklerose oder von kardiovaskulären Erkrankungen spielt. Auch diese These sollte in Zukunft noch genauer untersucht werden.

5.3 Funktion von IRAG2 im Pankreas

5.3.1 Einfluss der IRAG2-Defizienz auf die Ca^{2+} -Freisetzung und auf Ca^{2+} -Oszillationen in pankreatischen Azinus-Zellen

Aufgrund der hohen Menge an endoplasmatischem Retikulum und sekretorischen Granula, sind Azini des exokrinen Pankreas sehr gut geeignet, um den Zusammenhang zwischen Ca^{2+} -Freisetzung und sekretorischen Prozessen zu untersuchen. Ist die Ca^{2+} -Freisetzung verändert, so können sich daraus Änderungen in der Sekretion von Verdauungsenzymen ergeben. Eine erhöhte Freisetzung von Calcium kann dementsprechend zu einer erhöhten Sekretion von Amylase führen, was schwerwiegende Erkrankungen des Pankreas, wie beispielsweise eine Pankreatitis, auslösen kann [98]. Im exokrinen Pankreas vermitteln vor allem die IP_3 -Rezeptor Subtypen 2 und 3 die Freisetzung von Calcium nach Stimulation mit Sekretagoga. Doppel-Knockouts des $\text{IP}_3\text{R}2$ und des $\text{IP}_3\text{R}3$ zeigen daher eine stark eingeschränkte Ca^{2+} -Freisetzung und daraus folgend eine Dysfunktion des exokrinen Pankreas [40]. Das Ausmaß des $\text{IP}_3\text{R}1$ auf die Ca^{2+} -Signalwege in pankreatischen Azinus-Zellen ist weitgehend unbekannt. Bekannt ist allerdings, dass dessen Expression in den Azinus-Zellen eher gering ist, verglichen mit der Expression des $\text{IP}_3\text{R}2$ und des $\text{IP}_3\text{R}3$ [141]. In dieser Arbeit kann eine Interaktion von IRAG2 mit allen IP_3 -Rezeptor Subtypen im Pankreas detektiert werden (s. Abbildung 4-12). Bei Deletion von IRAG2 ist dabei eine Hochregulation der $\text{IP}_3\text{R}3$ - sowie eine Verringerung der $\text{IP}_3\text{R}2$ -Expression zu beobachten. Die Proteinexpression des $\text{IP}_3\text{R}1$ hingegen ist nicht verändert (s. Abbildung 4-13). Zudem ist die basale Ca^{2+} -Freisetzung in den Azinus-Zellen des IRAG2-KO verringert, verglichen mit dem IRAG2-WT. Auch die maximal freigesetzten Ca^{2+} -Mengen nach Stimulation mit Carbachol waren etwas verringert im IRAG2-KO im Vergleich zum IRAG2-WT. Wird jedoch die Ca^{2+} -Freisetzung nach Stimulation mit $1 \mu\text{M}$ Carbachol als ein X-faches der basalen Ca^{2+} -Freisetzung sowie die AUC als Maß für die insgesamt freigesetzte Ca^{2+} -Menge berechnet, so war diese, trotz der verringerten basalen Ca^{2+} -Freisetzung, im IRAG2-KO höher als im IRAG2-WT (s. Abbildung 4-14). Für höhere Carbachol-Konzentrationen kann dieser Effekt jedoch nicht beobachtet werden. IRAG2 scheint somit vor

allein die basalen Ca^{2+} -Level zu beeinflussen, indem es unter unstimulierten Bedingungen die Aktivität der IP_3 -Rezeptoren und somit die basale Ca^{2+} -Freisetzung fördert. Wird IRAG2 deletiert und dadurch, aufgrund verminderter Aktivität der IP_3 -Rezeptoren, basal weniger Calcium freigesetzt, wäre es möglich, dass es als Folge dieser Aktivitätsverminderung zu einer Down-Regulation der $\text{IP}_3\text{R2}$ -Expression kommt (s. Abbildung 4-13 B). Dies würde zu der These führen, dass der $\text{IP}_3\text{R2}$ an der basalen Freisetzung von Calcium in pankreatischen Azinus-Zellen beteiligt ist. Die nach Stimulation mit Carbachol erhöhte Menge an insgesamt freigesetztem Calcium, könnte durch eine Erhöhung der $\text{IP}_3\text{R3}$ -Expression im IRAG2-KO erklärt werden (s. Abbildung 4-13 A). Die Hochregulation des $\text{IP}_3\text{R3}$ wäre somit ein Kompensationsmechanismus des IRAG2-KO, um die verringerte basale Ca^{2+} -Menge auszugleichen und somit die Ca^{2+} -Freisetzung nach Stimulation mit Sekretagoga aufrechtzuerhalten.

Andererseits könnte die Ursache für die verringerten basalen Ca^{2+} -Mengen im IRAG2-KO auch die verringerte Expression des $\text{IP}_3\text{R2}$ sein. Wird durch die Deletion von IRAG2, aufgrund deren Interaktion, auch die $\text{IP}_3\text{R2}$ -Expression verringert, so wird basal weniger Calcium freigesetzt. Auch dies würde zu der Theorie führen, dass der $\text{IP}_3\text{R2}$ an der basalen Ca^{2+} -Freisetzung in den pankreatischen Azinus-Zellen involviert ist.

Es ist gezeigt, dass die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration die Aktivität der IP_3 -Rezeptoren in einigen Zelltypen auf zweierlei Weise beeinflusst. Ist diese niedrig, so wird die Aktivität der IP_3 -Rezeptoren und somit die IP_3 -vermittelte Freisetzung von Ca^{2+} erhöht. Ist die Ca^{2+} -Konzentration jedoch hoch, kommt es zu einer Abnahme der IP_3R -Aktivität, was in einer verringerten Ca^{2+} -Freisetzung resultiert [11, 33, 58]. Folglich wäre eine weitere Theorie, dass die verringerte basale Ca^{2+} -Menge im IRAG2-KO zu einer Erhöhung der Aktivität der IP_3 -Rezeptoren führt, wodurch es zu einer Erhöhung der nach Stimulation freigesetzten Ca^{2+} -Menge in den Azinus-Zellen des IRAG2-KO kommt.

Hinsichtlich der Geschwindigkeit der Ca^{2+} -Freisetzung sind keine Unterschiede zwischen IRAG2-WT und IRAG2-KO feststellbar (s. Abbildung 4-15 A). Nach Stimulation sind Azinus-Zellen von IRAG2-KO Tieren somit in der Lage, Calcium genauso schnell freizusetzen wie die Azinus-Zellen der Wildtyp-Tiere. Auch in der Stimulierbarkeit der Zellen zeigen sich keine Unterschiede bei beiden Genotypen (s. Abbildung 4-15 B). Die Azinus-Zellen von IRAG2-KO Tieren können, nach vorheriger Stimulation und einer anschließenden Regenerationszeit von 2 min, ebenso wieder stimuliert werden wie Azinus-Zellen von IRAG2-WT Tieren. Es kommt somit im IRAG2-KO zu keiner Veränderung der Sensitivität gegenüber dem Stimulans, verglichen mit dem IRAG2-WT.

Bei niedrigen Konzentrationen an Carbachol zeigen pankreatische Azinus-Zellen Ca^{2+} -Oszillationen. Dieses Phänomen kommt zustande durch eine Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern und dessen anschließender ATP-abhängiger Wiederaufnahme in die Speicher [125, 144]. Die Frequenz der Ca^{2+} -Oszillationen ist dabei höher in den Azinus-Zellen der IRAG2-KO Tiere, als in denen der IRAG2-WT Tiere (s. Abbildung 4-16). Dies könnte ebenso ein Mechanismus der Zellen sein, die verringerten basalen Ca^{2+} -Mengen im IRAG2-KO auszugleichen, um eine adäquate Freisetzung von Calcium, nach Stimulation mit Sekretagoga, zu gewährleisten.

In welchem Ausmaß die einzelnen IP_3 -Rezeptor Subtypen die Ca^{2+} -Freisetzung sowie die Ca^{2+} -Oszillationen beeinflussen ist noch immer zu einem großen Teil unerforscht [50]. Was jedoch bereits gezeigt werden konnte ist, dass ein Knockdown des $\text{IP}_3\text{R1}$ in COS7-Zellen und in HeLa-Zellen zu einer Verringerung der Gesamt- Ca^{2+} -Menge führt und die oszillierenden Ca^{2+} -Signale aufhebt. Ein Knockdown des $\text{IP}_3\text{R3}$ fördert hingegen ausgeprägtere Peak-Amplituden und länger andauernde Oszillationen. Der $\text{IP}_3\text{R3}$ wurde dabei als „anti-oszillatorische-Einheit“ beschrieben [50]. In B-Zelllinien, die so generiert wurden, dass nur der $\text{IP}_3\text{R2}$ exprimiert wird, konnte gezeigt werden, dass die Oszillationen eher lang andauernd und sehr gleichmäßig sind. B-Zelllinien, die nur $\text{IP}_3\text{R1}$ oder $\text{IP}_3\text{R3}$ exprimieren, weisen hingegen Oszillationen auf, die sich sehr schnell auflösen und damit sehr kurzweilig sind [88]. Diese Daten stehen in Kontrast zu dem, was im Pankreas von IRAG2-KO Tieren beobachtet wird. Durch den Knockout von IRAG2 kommt es hier zu einer Hochregulation der $\text{IP}_3\text{R3}$ -Expression, aber auch zu einer Erhöhung der Frequenz an Oszillationen. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass IRAG2 zwar die Aktivität der IP_3 -Rezeptoren und damit die Ca^{2+} -Oszillationen beeinflusst, jedoch unabhängig von der Expressionsmenge des $\text{IP}_3\text{R3}$ und anderer IP_3 -Rezeptor Subtypen. Andererseits wurde für pankreatische Azinus-Zellen bereits beschrieben, dass in diesen vor allem der $\text{IP}_3\text{R3}$ an der Entstehung der Agonist-induzierten Ca^{2+} -Oszillationen beteiligt ist [47, 119, 143]. Daher liegt die Vermutung nahe, dass IRAG2 in pankreatischen Azinus-Zellen die Aktivität des $\text{IP}_3\text{R3}$ moduliert und dadurch sowohl den Rezeptor als auch die Ca^{2+} -Oszillationen stabilisiert.

Wie bereits zuvor geschildert, beeinflusst die zytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration die Aktivität der IP_3 -Rezeptoren und damit die Ca^{2+} -Freisetzung in bivalenter Weise [11, 33, 58]. Basierend auf diesem Mechanismus wäre es ebenso denkbar, dass die verringerte basale Ca^{2+} -Menge in den Azinus-Zellen des IRAG2-KO zu einer Aktivierung der IP_3 -Rezeptoren führt und dies in einer erhöhten Frequenz an Ca^{2+} -Oszillationen resultiert. Dabei könnte die Aktivität des $\text{IP}_3\text{R3}$ beeinflusst werden, für den in pankreatischen Azinus-Zellen eine wichtige Rolle bei der

Entstehung der oszillatorischen Ca^{2+} -Signale postuliert wird [47, 119, 143]. Denkbar wäre aber auch die Beteiligung anderer IP_3 -Rezeptor Subtypen, mit einer höheren Affinität zu zytosolischem Calcium, wie der $\text{IP}_3\text{R2}$ oder der $\text{IP}_3\text{R1}$ [88]. Da der $\text{IP}_3\text{R1}$ aber nur eine sehr geringe Expressionsmenge im Pankreas aufweist [141, 143], ist eine Beteiligung des $\text{IP}_3\text{R1}$ an den oszillatorischen Signalen in IRAG2-WT und IRAG2-KO Tieren eher unwahrscheinlich. Durch die verringerte Expression des $\text{IP}_3\text{R2}$ im IRAG2-KO wäre jedoch eine Beteiligung des $\text{IP}_3\text{R2}$ an den Oszillationen denkbar, da dieser Rezeptor Subtyp lang andauernde, regelmäßige Oszillationen fördert [88]. Um einen genauen Einblick in die IRAG2-abhängige Modulation der verschiedenen IP_3 -Rezeptor Subtypen zu erhalten und um herauszufinden in welchem Ausmaß diese Modulation die Ca^{2+} -Freisetzung und die Ca^{2+} -Oszillationen beeinflusst, sind jedoch noch weitere Untersuchungen nötig.

5.3.2 Einfluss der IRAG2-Defizienz auf die Funktion des exokrinen Pankreas sowie auf die Gewichte der Mäuse

Die Freisetzung von Calcium und die Sekretion von Verdauungsenzymen in pankreatischen Azinus-Zellen sind eng miteinander verbunden. So bewirkt eine Ca^{2+} -Freisetzung nach Stimulation mit Sekretagoga eine Sekretion von Amylase aus den zymogenen Granula [52, 82, 98]. Wie bereits in Kapitel 5.3.1 dargelegt, wird im Rahmen dieser Arbeit eine reduzierte basale Ca^{2+} -Freisetzung in Azinus-Zellen der IRAG2-KO Tiere beobachtet, was auch in einer reduzierten basalen Amylase-Sekretion resultiert (s. Abbildung 4-17 A). Die Menge an sezernierter Amylase nach Stimulation mit $1 \mu\text{M}$ Carbachol – normalisiert auf die basale Amylase-Sekretion – war dabei jedoch etwas erhöht im IRAG2-KO, verglichen mit dem IRAG2-WT (s. Abbildung 4-17 B). Dennoch war die maximal prozentual sezernierte Amylase-Menge nach Stimulation mit Carbachol etwas geringer im IRAG2-KO im Vergleich zum IRAG2-WT (s. Abbildung 4-17 A). Die Sekretion von Amylase korreliert somit mit der Freisetzung von Calcium. Damit lässt sich festhalten, dass IRAG2 die basale Ca^{2+} -Freisetzung und somit auch die basale Amylase-Sekretion fördert. Eine Deletion von IRAG2 hingegen führt zu verringerter basaler Ca^{2+} -Freisetzung und damit zu einer geringeren Amylase-Sekretion. Ebenso bewirkt ein Knockout von IRAG2, dass nach Stimulation mit $1 \mu\text{M}$ Carbachol eine höhere Ca^{2+} -Menge – normiert auf die basale Menge – freigesetzt, und somit auch eine größere Amylase-Menge – normiert auf die basale Menge – sezerniert wird. Dabei könnte es sich um einen Kompensationsmechanismus des IRAG2-KO handeln, bei der die – durch die

verminderte basale Ca^{2+} -Freisetzung bedingte – verringerte Amylase-Sekretion ausgeglichen werden soll. Die maximal freigesetzten Mengen an Calcium und Amylase waren dabei im IRAG2-KO dennoch noch etwas geringer als im IRAG2-WT (s. Abbildung 4-14 A, B und Abbildung 4-17 A).

Eine Akkumulation und vorzeitige Aktivierung von Verdauungsenzymen, unter anderem der Amylase, kann im Pankreas zu schwerwiegenden Erkrankungen, wie akuter Pankreatitis, führen [98]. In den Azinus-Zellen von IRAG2-KO Tieren ist eine Akkumulation der Amylase in den immunhistologischen Schnitten des Pankreas zu sehen (s. Abbildung 4-19). Unterschiede in der Aktivität der Amylase können jedoch nicht beobachtet werden (s. Abbildung 4-18). Die Anreicherung der Amylase in IRAG2-KO Azinus-Zellen könnte möglicherweise eine Folge der verringerten Ca^{2+} -Freisetzung und der damit verringerten basalen Amylase-Freisetzung sein. Die Theorie wäre somit, dass bei der Deletion von IRAG2 basal weniger Amylase aus den Azinus-Zellen freigesetzt wird, weshalb mehr Amylase in den Zellen zurückbleibt. Das Risiko der Entwicklung einer akuten Pankreatitis könnte somit im IRAG2-KO Tier, vor allem in Kombination mit Risikofaktoren, die diese Erkrankung begünstigen, erhöht sein. Folglich wäre es möglich, dass IRAG2 einen protektiven Effekt auf die Entwicklung einer akuten Pankreatitis zeigt. Um dies zu analysieren, sind jedoch zukünftig weitere Untersuchungen nötig, bei denen diese These anhand von Krankheitsmodellen am Tier untersucht wird.

Die Amylase wird in sekretorischen Granula gespeichert, die sich vor allem im apikalen Teil der Azinus-Zelle befinden. Durch Stimulation mit bestimmten Substanzen, erfolgt die Sekretion der Amylase aus diesen Granula durch Exozytose [52, 139]. Da die IRAG2-KO Tiere eine Akkumulation von Amylase in den Azinus-Zellen zeigen, wurde die Morphologie des Pankreas näher betrachtet. Dabei wurde zum einen untersucht, ob sich die Granula in ihrer Größe unterscheiden und zum anderen wurde betrachtet, ob sich die Menge der sekretorischen Granula durch die Deletion von IRAG2 verändert. Allerdings können hier keine Unterschiede zwischen IRAG2-WT und IRAG2-KO Tieren beobachtet werden (s. Abbildung 4-20). Somit führt der Knockout von IRAG2 und die damit verbundene Akkumulation der Amylase nicht zu einer Veränderung der Größe oder der Menge an zymogenen Granula.

Eine Dysfunktion des exokrinen Pankreas kann zu Störungen in der Sekretion von Verdauungsenzymen führen. Nahrungsbestandteile können dadurch nur noch unzureichend gespalten und verdaut werden. Als Folge daraus können sich auch Änderungen im Körpergewicht ergeben. Doppel-Knockouts von $\text{IP}_3\text{R}2$ und $\text{IP}_3\text{R}3$ weisen durch die verminderte Freisetzung von Calcium schwere Störungen im exokrinen Pankreas auf. Verdauungsenzyme werden dabei nur noch unzureichend sezerniert und die Verdauung ist dementsprechend

beeinträchtigt. Diese Tiere nehmen dabei nach der Geburt weniger an Gewicht zu als Wildtyp-Tiere. Nach dem Absetzen verlieren die Tiere zudem stark an Gewicht und versterben innerhalb der vierten Woche nach der Geburt [40]. Betrachtet man das Körpergewicht der IRAG2-KO Tiere, ist dieses bis zum Absatzalter von ca. 21 Tagen nicht verändert im Vergleich zu den IRAG2-WT Tieren. Nach dem Absetzen ist das Gewicht der IRAG2-KO Tiere leicht erniedrigt, normalisiert sich jedoch bis hin zu Tag 45 nach dem Absetzen aus dem Elternkäfig (s. Abbildung 4-21). Dies lässt den Schluss zu, dass IRAG2-KO Tiere in der Lage sind, die Nahrung vollständig zu verdauen, trotz der verringerten Amylase-Sekretion. Eine starke exokrine Dysfunktion scheint daher nicht vorzuliegen und die verringerte basale Amylase-Sekretion in diesen Tieren kann offenbar ausgeglichen werden.

6 Zusammenfassung

Das Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor assoziierte 2 (IRAG2) wird auch als Jaw1 oder *lymphoid restricted membrane protein* (LRMP) bezeichnet und ist über seine C-terminale Transmembrandomäne am endoplasmatischen Retikulum (ER) verankert. Exprimiert wird IRAG2 vor allem in lymphatischen Geweben und Zellen, wie Thymus, Milz, B-Zelllinien oder T-Zelllinien, aber auch in nicht lymphatischen Organen und Zellen, wie Sinusknoten, circumvallaten, fungiformen und foliaten Geschmacksknospen vom Typ süß, bitter und umami oder in Bürstenzellen des Darms. Im Rahmen dieser Arbeit wird nun auch eine Expression von IRAG2 in Thrombozyten sowie im Pankreas gezeigt. Im Pankreas ist IRAG2 dabei in den exokrinen pankreatischen Azinus-Zellen lokalisiert.

Die coiled-coil-Domäne des IRAG2-Proteins zeigt eine ausgeprägte Homologie zu der des Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor assoziierten cGMP Kinase Substrats 1 (IRAG1). Diese Domäne ist für die Interaktion von IRAG1 mit den Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptoren (IP₃-Rezeptoren, IP₃R) entscheidend. Eine Interaktion von IRAG2 mit dem IP₃R3 ist bereits in transfizierten COS7-Zellen beschrieben, außerdem ist eine Interaktion mit dem IP₃R2 in intestinalen Bürstenzellen gezeigt. Auch in Thrombozyten und im Pankreas kann nun in der vorliegenden Arbeit eine Interaktion von IRAG2 mit den IP₃-Rezeptor Subtypen 1, 2 und 3 nachgewiesen werden. Erstmals kann damit auch die Interaktion mit dem IP₃R1 bewiesen werden.

6.1 Funktion von IRAG2 in Thrombozyten

IRAG1 bildet zusammen mit der cGMP-abhängigen Proteinkinase I β (PKGI β) sowie dem IP₃R1 einen trimären Komplex. Nach Phosphorylierung durch die PKGI β hemmt IRAG1 die Calcium (Ca²⁺)-Freisetzung aus dem ER und somit auch die Thrombozytenaggregation. In der vorliegenden Arbeit wurden nun auch die Interaktionspartner von IRAG2 in Thrombozyten untersucht. Eine stabile Interaktion von IRAG2 und der PKGI β wird dabei nicht nachgewiesen. Allerdings kann gezeigt werden, dass IRAG2 in Thrombozyten nach Stimulation durch zyklische Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP)-Analoga phosphoryliert wird.

Da IRAG2 in Thrombozyten mit den IP₃-Rezeptor Subtypen 1, 2 und 3 interagiert, wurde der Einfluss von IRAG2 auf die Ca²⁺-Freisetzung sowie auf die Aggregation der Thrombozyten untersucht. Zudem wurde die Stickstoffmonoxid (NO)/cGMP-abhängige Hemmung der

Thrombozytenaggregation betrachtet. Dabei zeigt sich in IRAG2-Knockout (KO) Thrombozyten eine signifikant verringerte Ca^{2+} -Freisetzung, verglichen mit den IRAG2-Wildtyp (WT) Thrombozyten. Diese verringerte Ca^{2+} -Freisetzung wirkt sich auch auf die Aggregabilität der Thrombozyten aus. Die Thrombozyten von IRAG2-KO Tieren weisen eine verringerte Aggregationsrate, verglichen mit den IRAG2-WT Thrombozyten, auf. Bei Stimulation mit dem cGMP-Analogon 8-pCPT-cGMP sowie dem NO-Donor Nitroprussid-Natrium (SNP) ist die Aggregationshemmung in den Thrombozyten der IRAG2-KO Tiere sogar noch stärker ausgeprägt als in denen der IRAG2-WT Tiere. Alle diese Daten deuten darauf hin, dass IRAG2, nach Aktivierung des NO/cGMP/PKG-Signalweges, durch die PKGI phosphoryliert wird und somit die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER fördert. Dies wiederum resultiert in einer verstärkten Thrombozytenaggregation (s. Abbildung 6-1). Aus diesem Grund kann IRAG2 möglicherweise als der Gegenspieler zu IRAG1 in Thrombozyten angesehen werden.

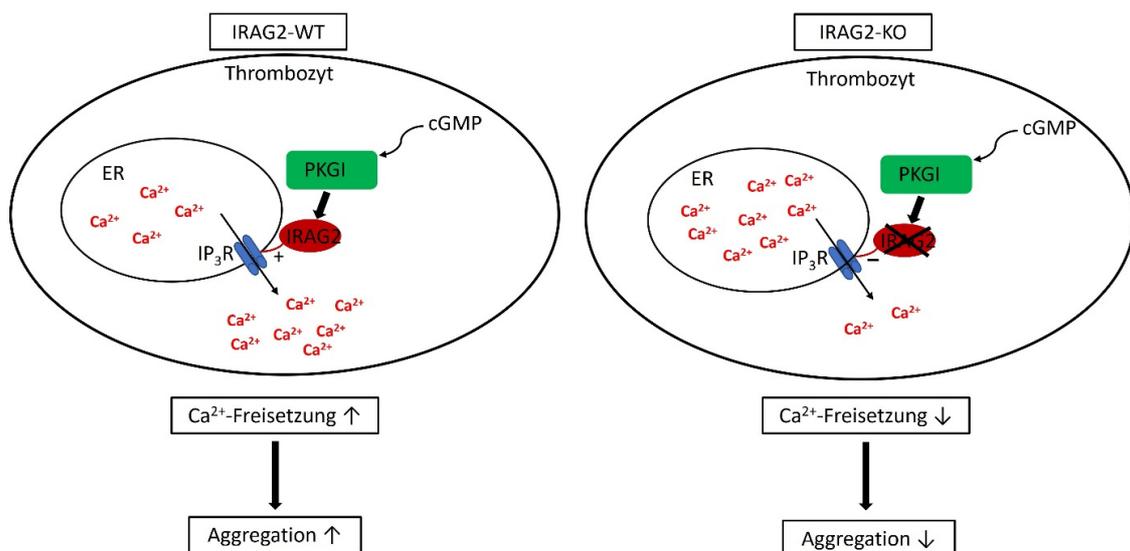


Abbildung 6-1: Schematische Darstellung der Funktion von IRAG2 in Thrombozyten

IRAG2 interagiert mit den IP₃-Rezeptoren in murinen Thrombozyten. Die Phosphorylierung von IRAG2 durch die PKGI nach Stimulation mit cGMP führt zu einer Förderung der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER. Dies resultiert in einer verstärkten Thrombozytenaggregation. Bei einem Knockout von IRAG2 wird die Ca^{2+} -Freisetzung und somit auch die Thrombozytenaggregation verringert, verglichen mit dem IRAG2-WT.

IRAG2: Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor assoziiertes 2; IP₃R: Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor; PKGI: cGMP-abhängige Proteinkinase I; cGMP: zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat; Ca^{2+} : Calcium; ER: endoplasmatisches Retikulum; IRAG2-KO: IRAG2-Knockout; IRAG2-WT: IRAG2-Wildtyp.

6.2 Funktion von IRAG2 im Pankreas

IRAG2 ist im exokrinen Pankreas im apikalen Bereich der Azinus-Zellen lokalisiert. Diese Zelltypen sind für die Sekretion von Verdauungsenzymen, wie zum Beispiel Amylase, von Bedeutung. Eine Expression von IRAG1 hingegen kann im murinen Pankreas nicht gezeigt werden. Im Pankreas interagiert IRAG2 mit den IP₃-Rezeptor Subtypen 1, 2 und 3, die ebenso vor allem im apikalen Teil der Azinus-Zellen exprimiert werden. Für die sekretorischen Prozesse im exokrinen Pankreas werden dabei überwiegend der IP₃R2 und der IP₃R3 verantwortlich gemacht.

In der vorliegenden Arbeit kann im IRAG2-KO eine Verringerung der Expression des IP₃R2 sowie eine Erhöhung der IP₃R3 Expression nachgewiesen werden. Die basale Ca²⁺-Freisetzung ist dabei im IRAG2-KO signifikant verringert, verglichen mit dem IRAG2-WT. Dies resultiert auch in einer verringerten basalen Amylase-Sekretion. Durch die verminderte basale Amylase-Sekretion im IRAG2-KO bleibt auch mehr Amylase in den zymogenen Granula der Azinus-Zellen zurück. Dies scheint jedoch weder einen signifikanten Einfluss auf die Menge der zymogenen Granula noch auf die Morphologie der pankreatischen Azini zu haben. Die IRAG2-KO Tiere entwickeln sich auch hinsichtlich ihrer Körpergewichte annähernd normal, was letztlich zu der Annahme führt, dass es durch die verminderte basale Amylase-Sekretion zu keiner signifikanten Beeinträchtigung der Verdauung von Nahrungsbestandteilen kommt und die verringerte Sekretion der Amylase somit ausgeglichen werden kann. IRAG2 fördert damit die basale Ca²⁺-Freisetzung, möglicherweise durch eine Aktivierung der IP₃-Rezeptoren. Bei Stimulation mit Carbachol hingegen wird in den IRAG2-KO Azinus-Zellen – normalisiert auf die basale Ca²⁺-Menge – mehr Calcium freigesetzt als im IRAG2-WT. Dies könnte auf einen Kompensationsmechanismus in den IRAG2-KO Azinus-Zellen zurückzuführen sein, durch den die verringerte basale Ca²⁺-Menge ausgeglichen werden soll. Möglicherweise sollen somit die Ca²⁺-Freisetzung, sowie damit verbundene wichtige physiologische Prozesse wie die Amylase-Sekretion, aufrechterhalten werden.

Auch die Frequenz von Ca²⁺-Oszillationen ist im IRAG2-KO höher als im IRAG2-WT. Die Ursache hierfür könnte eine Modulation der IP₃-Rezeptoren durch IRAG2 sein oder aber auch ein kompensatorischer Mechanismus zum Ausgleich der verminderten basalen Ca²⁺-Freisetzung (s. Abbildung 6-2).

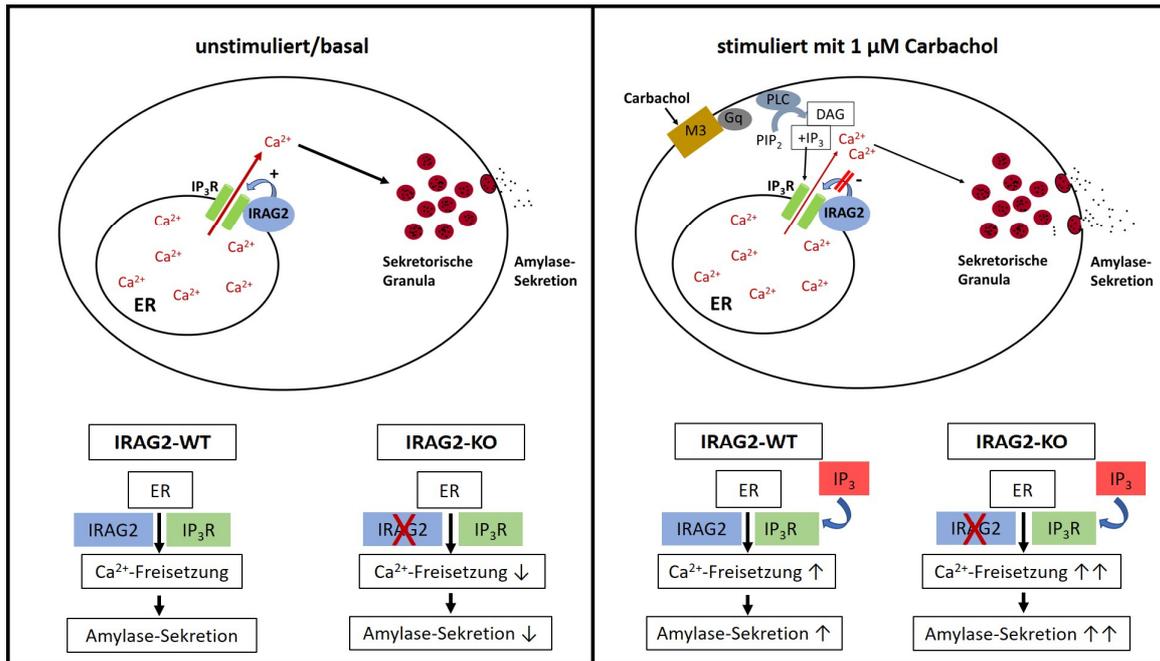


Abbildung 6-2: Schematische Darstellung der Funktion von IRAG2 im Pankreas

IRAG2 ist am ER lokalisiert und interagiert mit den IP₃-Rezeptoren im murinen Pankreas. Unter basalen, unstimulierten Bedingungen fördert IRAG2 die basale Ca²⁺-Freisetzung sowie die basale Amylase-Sekretion. Im IRAG2-KO kommt es daher zu einer Verringerung der basalen Ca²⁺-Freisetzung und der basalen Amylase-Sekretion, verglichen mit dem IRAG2-WT. Bei Stimulation der M3-Muskarinrezeptoren durch Carbachol kommt es zur Aktivierung der PLC und dadurch zur Spaltung von PIP₂ zu IP₃ und DAG. IP₃ stimuliert die IP₃R und damit die Ca²⁺-Freisetzung aus dem ER. In den Azini von IRAG2-KO Tieren führt diese Stimulation zu einer Erhöhung der insgesamt freigesetzten Ca²⁺-Menge sowie zu einer Erhöhung der sezernierten Menge an Amylase, verglichen mit dem IRAG2-WT.

IRAG2: Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor assoziiertes 2; IP₃R: Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor; Ca²⁺: Calcium; ER: endoplasmatisches Retikulum; IRAG2-KO: IRAG2-Knockout; IRAG2-WT: IRAG2-Wildtyp; M3 Gq: Gq-gekoppelter M3-Muskarinrezeptor; PLC: Phospholipase C; PIP₂: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; IP₃: Inositol-1,4,5-trisphosphat; DAG: Diacylglycerol.

7 Literaturverzeichnis

1. Ammendola A, Geiselhöringer A, Hofmann F et al. (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* 276:24153–24159. doi: 10.1074/jbc.M101530200
2. Antl M, Brühl M-L von, Eiglsperger C et al. (2007) IRAG mediates NO/cGMP-dependent inhibition of platelet aggregation and thrombus formation. *Blood* 109:552–559. doi: 10.1182/blood-2005-10-026294
3. Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S et al. (1977) Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:3203–3207. doi: 10.1073/pnas.74.8.3203
4. Aumüller G, Aust G, Engele J et al. (2020) *Duale Reihe Anatomie, 5., korrigierte Auflage. Duale Reihe.* Thieme, Stuttgart
5. Behrens TW, Jagadeesh J, Scherle P et al. (1994) Jaw1, A lymphoid-restricted membrane protein localized to the endoplasmic reticulum. *J Immunol* 153:682–690
6. Behrens TW, Kearns GM, Rivard JJ et al. (1996) Carboxyl-terminal Targeting and Novel Post-translational Processing of JAW1, a Lymphoid Protein of the Endoplasmic Reticulum. *J Biol Chem* 271:23528–23534. doi: 10.1074/jbc.271.38.23528
7. Bender AT, Beavo JA (2006) Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev* 58:488–520. doi: 10.1124/pr.58.3.5
8. Bennett JS (2005) Structure and function of the platelet integrin α IIb β 3. *J Clin Invest* 115:3363–3369. doi: 10.1172/JCI26989
9. Berridge MJ (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361:315–325. doi: 10.1038/361315a0
10. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:11–21. doi: 10.1038/35036035
11. Bezprozvanny I, Watras J, Ehrlich BE (1991) Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5)P₃- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature* 351:751–754. doi: 10.1038/351751a0
12. Biel M (2009) Cyclic nucleotide-regulated cation channels. *J Biol Chem* 284:9017–9021. doi: 10.1074/jbc.R800075200

13. Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM (1999) Endothelial Cells Undergoing Apoptosis Become Proadhesive for Nonactivated Platelets. *Blood* 93:3831–3838. doi: 10.1182/blood.V93.11.3831
14. Bommas-Ebert U, Teubner P, Voß R (2011) *Kurzlehrbuch Anatomie und Embryologie*, 3., aktualisierte und erw. Aufl. Thieme, Stuttgart, New York
15. Brandes R, Lang F, Schmidt RF (2019) *Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie*, 32. Auflage. Lehrbuch. Springer, Berlin, Heidelberg
16. Burn SF (2012) Detection of β -Galactosidase Activity: X-gal Staining. In: *Kidney Development*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 241–250
17. Butt E, Nolte C, Schulz S et al. (1992) Analysis of the functional role of cGMP-dependent protein kinase in intact human platelets using a specific activator 8-para-chlorophenylthio-cGMP. *Biochemical Pharmacology* 43:2591–2600. doi: 10.1016/0006-2952(92)90148-C
18. Butt E, Abel K, Krieger M et al. (1994) cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets. *J Biol Chem* 269:14509–14517. doi: 10.1016/S0021-9258(17)36652-8
19. Casteel DE, Boss GR, Pilz RB (2005) Identification of the interface between cGMP-dependent protein kinase I β and its interaction partners TFII-I and IRAG reveals a common interaction motif. *J Biol Chem* 280:38211–38218. doi: 10.1074/jbc.M507021200
20. Cavallini L, Coassin M, Borean A et al. (1996) Prostacyclin and sodium nitroprusside inhibit the activity of the platelet inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and promote its phosphorylation. *J Biol Chem* 271:5545–5551. doi: 10.1074/jbc.271.10.5545
21. Chadwick CC, Saito A, Fleischer S (1990) Isolation and characterization of the inositol trisphosphate receptor from smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:2132–2136. doi: 10.1073/pnas.87.6.2132
22. Chandra, Rashmi, and Liddle, Rodger A. (2020) Regulation of Pancreatic Secretion. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*. doi: 10.3998/panc.2020.14
23. Chang C-Y, Wang J, Zhao Y et al. (2021) Tumor suppressor p53 regulates intestinal type 2 immunity. *Nature communications* 12:3371. doi: 10.1038/s41467-021-23587-x
24. Chen J, López JA (2005) Interactions of platelets with subendothelium and endothelium. *Microcirculation* 12:235–246. doi: 10.1080/10739680590925484
25. Cimmino G, Golino P (2013) Platelet Biology and Receptor Pathways. *J of Cardiovasc Trans Res* 6:299–309. doi: 10.1007/s12265-012-9445-9

26. Conti M, Beavo J (2007) Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu Rev Biochem* 76:481–511. doi: 10.1146/annurev.biochem.76.060305.150444
27. Coughlin SR (2005) Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost* 3:1800–1814. doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01377.x
28. Desch M, Sigl K, Hieke B et al. (2010) IRAG determines nitric oxide- and atrial natriuretic peptide-mediated smooth muscle relaxation. *Cardiovasc Res* 86:496–505. doi: 10.1093/cvr/cvq008
29. DiFrancesco D, Tortora P (1991) Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature* 351:145–147. doi: 10.1038/351145a0
30. Dymecki SM (1996) Flp recombinase promotes site-specific DNA recombination in embryonic stem cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6191–6196. doi: 10.1073/pnas.93.12.6191
31. el-Husseini AE, Bladen C, Vincent SR (1995) Molecular characterization of a type II cyclic GMP-dependent protein kinase expressed in the rat brain. *Journal of Neurochemistry* 64:2814–2817. doi: 10.1046/j.1471-4159.1995.64062814.x
32. Feil R, Lohmann SM, Jonge H de et al. (2003) Cyclic GMP-dependent protein kinases and the cardiovascular system: insights from genetically modified mice. *Circ Res* 93:907–916. doi: 10.1161/01.RES.0000100390.68771.CC
33. Finch EA, Turner TJ, Goldin SM (1991) Calcium as a coagonist of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release. *Science* 252:443–446. doi: 10.1126/science.2017683
34. Förstermann U, Sessa WC (2012) Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal* 33:829-37, 837a-837d. doi: 10.1093/eurheartj/ehr304
35. Förstermann U, Schmidt HH, Pollock JS et al. (1991) Isoforms of nitric oxide synthase Characterization and purification from different cell types. *Biochemical Pharmacology* 42:1849–1857. doi: 10.1016/0006-2952(91)90581-O
36. Friebe A, Koesling D (2003) Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circ Res* 93:96–105. doi: 10.1161/01.RES.0000082524.34487.31
37. Fujii S, Matsumoto M, Igarashi K et al. (2000) Synaptic plasticity in hippocampal CA1 neurons of mice lacking type 1 inositol-1,4,5-trisphosphate receptors. *Learn Mem* 7:312–320. doi: 10.1101/lm.34100

38. Furuichi T, Yoshikawa S, Miyawaki A et al. (1989) Primary structure and functional expression of the inositol 1,4,5-trisphosphate-binding protein P400. *Nature* 342:32–38. doi: 10.1038/342032a0
39. Furuichi T, Kohda K, Miyawaki A et al. (1994) Intracellular channels. *Current Opinion in Neurobiology* 4:294–303. doi: 10.1016/0959-4388(94)90089-2
40. Futatsugi A, Nakamura T, Yamada MK et al. (2005) IP₃ receptor types 2 and 3 mediate exocrine secretion underlying energy metabolism. *Science* 309:2232–2234. doi: 10.1126/science.1114110
41. Gawaz M (2006) Platelets in the onset of atherosclerosis. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 36:206–210. doi: 10.1016/j.bcmd.2005.12.022
42. Gawaz M, Langer H, May AE (2005) Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest* 115:3378–3384. doi: 10.1172/JCI27196
43. Gawaz MP (1999) *Das Blutplättchen*. Thieme, Stuttgart, New York
44. Geiselhöringer A, Gaisa M, Hofmann F et al. (2004) Distribution of IRAG and cGKI-isoforms in murine tissues. *FEBS Letters* 575:19–22. doi: 10.1016/j.febslet.2004.08.030
45. Geiselhöringer A, Werner M, Sigl K et al. (2004) IRAG is essential for relaxation of receptor-triggered smooth muscle contraction by cGMP kinase. *EMBO J* 23:4222–4231. doi: 10.1038/sj.emboj.7600440
46. Geraldo RB, Sathler PC, Lourenço AL et al. (2014) Platelets: still a therapeutic target for haemostatic disorders. *Int J Mol Sci* 15:17901–17919. doi: 10.3390/ijms151017901
47. Giovannucci DR, Groblewski GE, Sneyd J et al. (2000) Targeted phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively inhibits localized Ca²⁺ release and shapes oscillatory Ca²⁺ signals. *J Biol Chem* 275:33704–33711. doi: 10.1074/jbc.M004278200
48. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260:3440–3450
49. Hartwig J, Italiano J (2003) The birth of the platelet. *J Thromb Haemost* 1:1580–1586. doi: 10.1046/j.1538-7836.2003.00331.x
50. Hattori M, Suzuki AZ, Higo T et al. (2004) Distinct roles of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor types 1 and 3 in Ca²⁺ signaling. *J Biol Chem* 279:11967–11975. doi: 10.1074/jbc.M311456200
51. Hauser W, Knobloch KP, Eigenthaler M et al. (1999) Megakaryocyte hyperplasia and enhanced agonist-induced platelet activation in vasodilator-stimulated phosphoprotein knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:8120–8125. doi: 10.1073/pnas.96.14.8120

52. Herbert Y, Gaisano, Subhankar Dolai, and Toshimasa Takahashi (2020) Physiologic Exocytosis in Pancreatic Acinar Cells and Pathologic Fusion Underlying Pancreatitis. *Pancreapedia: The Exocrine Pancreas Knowledge Base*. doi: 10.3998/panc.2020.04
53. Hofmann F, Ammendola A, Schlossmann J (2000) Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J Cell Sci* 113 (Pt 10):1671–1676. doi: 10.1242/jcs.113.10.1671
54. Hofmann F (2005) The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases. *J Biol Chem* 280:1–4. doi: 10.1074/jbc.R400035200
55. Hofmann F, Feil R, Kleppisch T et al. (2006) Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. *Physiol Rev* 86:1–23. doi: 10.1152/physrev.00015.2005
56. Horn HF, Kim D in, Wright GD et al. (2013) A mammalian KASH domain protein coupling meiotic chromosomes to the cytoskeleton. *J Cell Biol* 202:1023–1039. doi: 10.1083/jcb.201304004
57. Ignarro LJ, Degnan JN, Baricos WH et al. (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* 718:49–59. doi: 10.1016/0304-4165(82)90008-3
58. Iino M (1990) Biphasic Ca^{2+} dependence of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca release in smooth muscle cells of the guinea pig taenia caeci. *J Gen Physiol* 95:1103–1122. doi: 10.1085/jgp.95.6.1103
59. Inoue T, Kato K, Kohda K et al. (1998) Type 1 Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Is Required for Induction of Long-Term Depression in Cerebellar Purkinje Neurons. *J Neurosci* 18:5366–5373. doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-14-05366.1998
60. Iwai M, Tateishi Y, Hattori M et al. (2005) Molecular cloning of mouse type 2 and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and identification of a novel type 2 receptor splice variant. *J Biol Chem* 280:10305–10317. doi: 10.1074/jbc.M413824200
61. Jurk K, Kehrel BE (2005) Platelets: physiology and biochemistry. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 31:381–392. doi: 10.1055/s-2005-916671
62. Kahner BN, Shankar H, Murugappan S et al. (2006) Nucleotide receptor signaling in platelets. *J Thromb Haemost* 4:2317–2326. doi: 10.1111/j.1538-7836.2006.02192.x
63. Kamisaki Y, Saheki S, Nakane M et al. (1986) Soluble guanylate cyclase from rat lung exists as a heterodimer. *J Biol Chem* 261:7236–7241
64. Kass DA, Takimoto E, Nagayama T et al. (2007) Phosphodiesterase regulation of nitric oxide signaling. *Cardiovasc Res* 75:303–314. doi: 10.1016/j.cardiores.2007.02.031

65. Komalavilas P, Lincoln TM (1994) Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 269:8701–8707
66. Kozono T, Tadahira K, Okumura W et al. (2018) Jaw1/LRMP has a role in maintaining nuclear shape via interaction with SUN proteins. *J Biochem*. doi: 10.1093/jb/mvy053
67. Kozono T, Sato H, Okumura W et al. (2021) The N-terminal region of Jaw1 has a role to inhibit the formation of organized smooth endoplasmic reticulum as an intrinsically disordered region. *Sci Rep* 11:753. doi: 10.1038/s41598-020-80258-5
68. Kuhn M (2003) Structure, regulation, and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on guanylyl cyclase-A. *Circ Res* 93:700–709. doi: 10.1161/01.RES.0000094745.28948.4D
69. Kyhse-Andersen J (1984) Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 10:203–209. doi: 10.1016/0165-022X(84)90040-X
70. Ladner CL, Yang J, Turner RJ et al. (2004) Visible fluorescent detection of proteins in polyacrylamide gels without staining. *Anal Biochem* 326:13–20. doi: 10.1016/j.ab.2003.10.047
71. Ladner CL, Tran K, Le M et al. (2014) Excited state photoreaction between the indole side chain of tryptophan and halocompounds generates new fluorophores and unique modifications. *Photochem Photobiol* 90:1027–1033. doi: 10.1111/php.12279
72. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685. doi: 10.1038/227680a0
73. Lohmann SM, Vaandrager AB, Smolenski A et al. (1997) Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends in Biochemical Sciences* 22:307–312. doi: 10.1016/S0968-0004(97)01086-4
74. Longnecker DS (2021) Anatomy and Histology of the Pancreas. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*. doi: 10.3998/panc.2021.01
75. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL et al. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275
76. Lukowski R, Weinmeister P, Bernhard D et al. (2008) Role of smooth muscle cGMP/cGKI signaling in murine vascular restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:1244–1250. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.166405
77. Lüllmann-Rauch R, Asan E (2019) Taschenlehrbuch Histologie, 6., vollständig überarbeitete Auflage. George Thieme Verlag, Stuttgart, New York

78. Makhoul S, Walter E, Pagel O et al. (2018) Effects of the NO/soluble guanylate cyclase/cGMP system on the functions of human platelets. *Nitric Oxide* 76:71–80. doi: 10.1016/j.niox.2018.03.008
79. Marsh N, Marsh A (2000) A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 27:313–319. doi: 10.1046/j.1440-1681.2000.03240.x
80. Massberg S, Sausbier M, Klatt P et al. (1999) Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3',5'-monophosphate kinase I. *The Journal of Experimental Medicine* 189:1255–1264. doi: 10.1084/jem.189.8.1255
81. Matsumoto M, Nakagawa T, Inoue T et al. (1996) Ataxia and epileptic seizures in mice lacking type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Nature* 379:168–171. doi: 10.1038/379168a0
82. Matthews EK, Petersen OH, Williams JA (1973) Pancreatic acinar cells: acetylcholine-induced membrane depolarization, calcium efflux and amylase release. *J Physiol* 234:689–701. doi: 10.1113/jphysiol.1973.sp010367
83. Mergia E, Friebe A, Dangel O et al. (2006) Spare guanylyl cyclase NO receptors ensure high NO sensitivity in the vascular system. *J Clin Invest* 116:1731–1737. doi: 10.1172/JCI27657
84. Meyers EN, Lewandoski M, Martin GR (1998) An Fgf8 mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination. *Nat Genet* 18:136–141. doi: 10.1038/ng0298-136
85. Mignery GA, Südhof TC (1990) The ligand binding site and transduction mechanism in the inositol-1,4,5-triphosphate receptor. *EMBO J* 9:3893–3898. doi: 10.1002/j.1460-2075.1990.tb07609.x
86. Mignery GA, Newton CL, Archer BT et al. (1990) Structure and expression of the rat inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem* 265:12679–12685. doi: 10.1016/S0021-9258(19)38397-8
87. Mikoshiba K (2007) IP₃ receptor/Ca²⁺ channel: from discovery to new signaling concepts. *Journal of Neurochemistry* 102:1426–1446. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04825.x
88. Miyakawa T, Maeda A, Yamazawa T et al. (1999) Encoding of Ca²⁺ signals by differential expression of IP₃ receptor subtypes. *EMBO J* 18:1303–1308. doi: 10.1093/emboj/18.5.1303
89. Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335–350. doi: 10.1016/0076-6879(87)55023-6

90. Murugappa S, Kunapuli SP (2006) The role of ADP receptors in platelet function. *Front Biosci* 11:1977–1986. doi: 10.2741/1939
91. Nagy A (2000) Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)* 26:99–109
92. Nieswandt B, Varga-Szabo D, Elvers M (2009) Integrins in platelet activation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 7 Suppl 1:206–209. doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03370.x
93. Nishiyama M, Hong K, Mikoshiba K et al. (2000) Calcium stores regulate the polarity and input specificity of synaptic modification. *Nature* 408:584–588. doi: 10.1038/35046067
94. Offermanns S (2006) Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ Res* 99:1293–1304. doi: 10.1161/01.RES.0000251742.71301.16
95. Okumura W, Kozono T, Sato H et al. (2022) Jaw1/LRMP increases Ca²⁺ influx upon GPCR stimulation with heterogeneous effect on the activity of each ITPR subtype. *Sci Rep* 12:9476. doi: 10.1038/s41598-022-13620-4
96. Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S (2019) *Physiologie, 9., vollständig überarbeitete Auflage.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
97. Peters CH, Myers ME, Juchno J et al. (2020) Isoform-specific regulation of HCN4 channels by a family of endoplasmic reticulum proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117:18079–18090. doi: 10.1073/pnas.2006238117
98. Petersen OH (2009) Ca²⁺ signaling in pancreatic acinar cells: physiology and pathophysiology. *Braz J Med Biol Res* 42:9–16. doi: 10.1590/S0100-879X2009000100003
99. Pötzsch B, Madlener K (2010) *Hämostaseologie, 2., vollst. aktualisierte und erw. Aufl.* Springer, Berlin, Heidelberg
100. Prüschenk S, Schlossmann J (2022) Function of IRAG2 Is Modulated by NO/cGMP in Murine Platelets. *Int J Mol Sci* 23. doi: 10.3390/ijms23126695
101. Prüschenk S, Majer M, Schreiber R et al. (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. doi: 10.3390/ijms222413409
102. Raju TNK (2000) The Nobel Chronicles. *The Lancet* 356:346. doi: 10.1016/S0140-6736(05)73635-7
103. Robert C. DeLisle (2020) Role of the actin cytoskeleton in acinar cell protein secretion. *Pancreapedia: The Exocrine Pancreas Knowledge Base.* doi: 10.3998/panc.2020.07
104. Ruggeri ZM (2002) Platelets in atherothrombosis. *Nat Med* 8:1227–1234. doi: 10.1038/nm1102-1227

105. Samara WM, Gurbel PA (2003) The role of platelet receptors and adhesion molecules in coronary artery disease. *Coron Artery Dis* 14:65–79. doi: 10.1097/00019501-200302000-00008
106. Schelter F, Gerg M, Halbgewachs B et al. (2010) Identification of a survival-independent metastasis-enhancing role of hypoxia-inducible factor-1alpha with a hypoxia-tolerant tumor cell line. *J Biol Chem* 285:26182–26189. doi: 10.1074/jbc.M110.140608
107. Schinner E, Salb K, Schlossmann J (2011) Signaling via IRAG is essential for NO/cGMP-dependent inhibition of platelet activation. *Platelets* 22:217–227. doi: 10.3109/09537104.2010.544151
108. Schinner E, Schramm A, Kees F et al. (2013) The cyclic GMP-dependent protein kinase I α suppresses kidney fibrosis. *Kidney international* 84:1198–1206. doi: 10.1038/ki.2013.219
109. Schlossmann J, Ammendola A, Ashman K et al. (2000) Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP₃ receptor and cGMP kinase Ibeta. *Nature* 404:197–201. doi: 10.1038/35004606
110. Schlossmann J, Desch M (2011) IRAG and novel PKG targeting in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301:H672-82. doi: 10.1152/ajpheart.00198.2011
111. Schulze H, Shivdasani RA (2005) Mechanisms of thrombopoiesis. *J Thromb Haemost* 3:1717–1724. doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01426.x
112. Schwarz UR, Walter U, Eigenthaler M (2001) Taming platelets with cyclic nucleotides. *Biochemical Pharmacology* 62:1153–1161. doi: 10.1016/S0006-2952(01)00760-2
113. Schwenk F, Baron U, Rajewsky K (1995) A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Research* 23:5080–5081. doi: 10.1093/nar/23.24.5080
114. Scott JD (1991) Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Pharmacology & therapeutics* 50:123–145. doi: 10.1016/0163-7258(91)90075-w
115. Shaughnessy JD, Largaespada DA, Tian E et al. (1999) Mrvi1, a common MRV integration site in BXH2 myeloid leukemias, encodes a protein with homology to a lymphoid-restricted membrane protein Jaw1. *Oncogene* 18:2069–2084. doi: 10.1038/sj.onc.1202419
116. Shindo Y, Kim M-R, Miura H et al. (2010) Lrmp/Jaw1 is Expressed in Sweet, Bitter, and Umami Receptor-Expressing Cells. *Chem Senses* 35:171–177. doi: 10.1093/chemse/bjp097

117. Sonnenburg WK, Beavo JA (1994) Cyclic GMP and Regulation of Cyclic Nucleotide Hydrolysis. *Advances in pharmacology* (San Diego, Calif.) 26:87–114. doi: 10.1016/s1054-3589(08)60052-6
118. Sorrentino V, Barone V, Rossi D (2000) Intracellular Ca²⁺ release channels in evolution. *Current Opinion in Genetics & Development* 10:662–667. doi: 10.1016/S0959-437X(00)00139-8
119. Straub SV, Giovannucci DR, Bruce JIE et al. (2002) A role for phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in defining calcium signals induced by Peptide agonists in pancreatic acinar cells. *J Biol Chem* 277:31949–31956. doi: 10.1074/jbc.M204318200
120. Straubinger J, Boldt K, Kuret A et al. (2017) Amplified pathogenic actions of angiotensin II in cysteine-rich LIM-only protein 4-negative mouse hearts. *FASEB J* 31:1620–1638. doi: 10.1096/fj.201601186
121. Streb H, Irvine RF, Berridge MJ et al. (1983) Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature* 306:67–69. doi: 10.1038/306067a0
122. Strehl A, Munnix ICA, Kuijpers MJE et al. (2007) Dual role of platelet protein kinase C in thrombus formation: stimulation of pro-aggregatory and suppression of procoagulant activity in platelets. *J Biol Chem* 282:7046–7055. doi: 10.1074/jbc.M611367200
123. Taylor CW, Genazzani AA, Morris SA (1999) Expression of inositol trisphosphate receptors. *Cell Calcium* 26:237–251. doi: 10.1054/ceca.1999.0090
124. Tedoldi S, Paterson JC, Cordell J et al. (2006) Jaw1/LRMP, a germinal centre-associated marker for the immunohistological study of B-cell lymphomas. *The Journal of pathology* 209:454–463. doi: 10.1002/path.2002
125. Tsunoda Y, Stuenkel EL, Williams JA (1990) Oscillatory mode of calcium signaling in rat pancreatic acinar cells. *Am J Physiol* 258:C147-55. doi: 10.1152/ajpcell.1990.258.1.C147
126. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM et al. (2015) Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 347:1260419. doi: 10.1126/science.1260419
127. Vaandrager AB, Ehlert EM, Jarchau T et al. (1996) N-terminal myristoylation is required for membrane localization of cGMP-dependent protein kinase type II. *J Biol Chem* 271:7025–7029. doi: 10.1074/jbc.271.12.7025
128. Vaandrager AB, Smolenski A, Tilly BC et al. (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* 95:1466–1471. doi: 10.1073/pnas.95.4.1466

129. Varga-Szabo D, Braun A, Nieswandt B (2009) Calcium signaling in platelets. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 7:1057–1066. doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03455.x
130. Vente J de, Asan E, Gambaryan S et al. (2001) Localization of cGMP-dependent protein kinase type II in rat brain. *Neuroscience* 108:27–49. doi: 10.1016/S0306-4522(01)00401-8
131. Wagner C, Pfeifer A, Ruth P et al. (1998) Role of cGMP-kinase II in the control of renin secretion and renin expression. *J Clin Invest* 102:1576–1582. doi: 10.1172/JCI4044
132. Wainger BJ, DeGennaro M, Santoro B et al. (2001) Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels. *Nature* 411:805–810. doi: 10.1038/35081088
133. Waldman SA, Murad F (1987) Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol Rev* 39:163–196
134. Walter U, Gambaryan S (2004) Roles of cGMP/cGMP-dependent protein kinase in platelet activation. *Blood* 104:2609. doi: 10.1182/blood-2004-06-2389
135. Werner C, Raivich G, Cowen M et al. (2004) Importance of NO/cGMP signalling via cGMP-dependent protein kinase II for controlling emotionality and neurobehavioural effects of alcohol. *Eur J Neurosci* 20:3498–3506. doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03793.x
136. Wernet W, Flockerzi V, Hofmann F (1989) The cDNA of the two isoforms of bovine cGMP-dependent protein kinase. *FEBS Letters* 251:191–196. doi: 10.1016/0014-5793(89)81453-X
137. West DB, Pasumarthi RK, Baridon B et al. (2015) A lacZ reporter gene expression atlas for 313 adult KOMP mutant mouse lines. *Genome Res* 25:598–607. doi: 10.1101/gr.184184.114
138. Wicks NL, Wong T, Sun J et al. (2011) Cytoplasmic cAMP-sensing domain of hyperpolarization-activated cation (HCN) channels uses two structurally distinct mechanisms to regulate voltage gating. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:609–614. doi: 10.1073/pnas.1012750108
139. Williams JA (2008) Receptor-mediated signal transduction pathways and the regulation of pancreatic acinar cell function. *Curr Opin Gastroenterol* 24:573–579. doi: 10.1097/MOG.0b013e32830b110c
140. Williams JA (2010) Isolation of rodent pancreatic acinar cells and acini by collagenase digestion. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*. doi: 10.3998/panc.2010.18
141. Wojcikiewicz RJ (1995) Type I, II, and III inositol 1,4,5-trisphosphate receptors are unequally susceptible to down-regulation and are expressed in markedly different

- proportions in different cell types. *J Biol Chem* 270:11678–11683. doi: 10.1074/jbc.270.19.11678
142. Wooldridge AA, MacDonald JA, Erdodi F et al. (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* 279:34496–34504. doi: 10.1074/jbc.M405957200
143. Yano K, Petersen OH, Tepikin AV (2004) Dual sensitivity of sarcoplasmic/endoplasmic Ca^{2+} -ATPase to cytosolic and endoplasmic reticulum Ca^{2+} as a mechanism of modulating cytosolic Ca^{2+} oscillations. *Biochem J* 383:353–360. doi: 10.1042/BJ20040629
144. Yule DI, Gallacher DV (1988) Oscillations of cytosolic calcium in single pancreatic acinar cells stimulated by acetylcholine. *FEBS Letters* 239:358–362. doi: 10.1016/0014-5793(88)80951-7
145. Yule DI, Ernst SA, Ohnishi H et al. (1997) Evidence that zymogen granules are not a physiologically relevant calcium pool. Defining the distribution of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in pancreatic acinar cells. *J Biol Chem* 272:9093–9098. doi: 10.1074/jbc.272.14.9093
146. Zaccolo M, Movsesian MA (2007) cAMP and cGMP signaling cross-talk: role of phosphodiesterases and implications for cardiac pathophysiology. *Circ Res* 100:1569–1578. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.106.144501

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Abbildung 1-1: Der NO/cGMP/PKG-Signalweg..... | 5 |
| Abbildung 1-2: Aufbau der cGMP-abhängigen Proteinkinasen | 7 |
| Abbildung 1-3: Trimärer Signalkomplex aus IRAG1, PKGI β und IP ₃ R1 | 9 |
| Abbildung 1-4: Fünf-Domänen-Strukturmodell des IP ₃ -Rezeptors..... | 10 |
| Abbildung 1-5: Strukturmodell von IRAG1 und IRAG2..... | 12 |
| Abbildung 3-1: Generierung der beiden IRAG2-Knockout Mauslinien..... | 33 |
| Abbildung 3-2: Proteintransfer mittels Semi-Dry Verfahren..... | 48 |
| Abbildung 3-3: Beladung von Zellen mit Fura-2-AM..... | 59 |
| Abbildung 3-4: Prinzip der X-Gal Färbung | 74 |
| Abbildung 4-1: Expression von IRAG2 in Thrombozyten | 79 |
| Abbildung 4-2: Interaktionspartner von IRAG2 in murinen Thrombozyten | 81 |
| Abbildung 4-3: Expression von Signalproteinen des NO/cGMP/PKG-Signalweges..... | 82 |
| Abbildung 4-4: Phosphorylierung von IRAG2 in Thrombozyten | 83 |
| Abbildung 4-5: Ca ²⁺ -Freisetzung in Thrombozyten | 85 |
| Abbildung 4-6: Einfluss von IRAG2 auf die Thrombozytenaggregation | 87 |
| Abbildung 4-7: NO/cGMP-abhängige Aggregationshemmung in IRAG2-WT und IRAG2-KO Thrombozyten bei Stimulation der Aggregation mit Thrombin | 89 |
| Abbildung 4-8: NO/cGMP-abhängige Aggregationshemmung in IRAG2-WT und IRAG2-KO Thrombozyten bei Stimulation der Aggregation mit Kollagen..... | 90 |
| Abbildung 4-9: Expression und Lokalisation von IRAG2 im Pankreas | 91 |
| Abbildung 4-10: Expression von IRAG2 im exokrinen Pankreas | 92 |
| Abbildung 4-11: Expression von IRAG1 im Pankreas | 93 |
| Abbildung 4-12: Interaktion von IRAG2 mit IP ₃ -Rezeptoren im Pankreas..... | 94 |
| Abbildung 4-13: Vergleich der Expression der IP ₃ -Rezeptor Subtypen in Pankreas-Lysaten | 95 |
| Abbildung 4-14: Ca ²⁺ -Freisetzung in pankreatischen Azinus-Zellen | 97 |
| Abbildung 4-15: Geschwindigkeit der Ca ²⁺ -Freisetzung und Stimulierbarkeit der pankreatischen Azinus-Zellen | 98 |
| Abbildung 4-16: Ca ²⁺ -Oszillationen in Azinus-Zellen | 99 |
| Abbildung 4-17: Amylase-Sekretion in pankreatischen Azinus-Zellen | 100 |
| Abbildung 4-18: Amylase-Aktivität in Pankreas-Lysaten und im Plasma | 101 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung 4-19: Immunhistochemische Analyse der Amylase-Expression im Pankreas..... | 102 |
| Abbildung 4-20: Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Pankreata | 103 |
| Abbildung 4-21: Gewichte der Tiere ab Tag 10 nach der Geburt..... | 105 |
| Abbildung 6-1: Schematische Darstellung der Funktion von IRAG2 in Thrombozyten..... | 123 |
| Abbildung 6-2: Schematische Darstellung der Funktion von IRAG2 im Pankreas..... | 125 |
| Abbildung 8-1: Totalproteinaufnahmen zu Interaktionspartnern von IRAG2 in Thrombozyten | 146 |
| Abbildung 8-2: Totalproteinaufnahmen zur Expression von Signalproteinen des NO/cGMP/PKG-Signalweges | 146 |
| Abbildung 8-3: Totalproteinaufnahmen zur Lokalisation von IRAG2 im Pankreas | 147 |
| Abbildung 8-4: Totalproteinaufnahme zur Expression von IRAG1 im Pankreas | 147 |
| Abbildung 8-5: Totalproteinaufnahme zur Analyse der Interaktionspartner von IRAG2 im Pankreas | 148 |
| Abbildung 8-6: Totalproteinaufnahme zur Analyse der Expressionsmenge der IP ₃ -Rezeptor Subtypen in Pankreata von IRAG2-WT und IRAG2-KO Tieren | 148 |

8.2 Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 2.1: Verwendete Geräte | 24 |
| Tabelle 2.2: Verwendete Software | 25 |
| Tabelle 2.3: Verwendete Primärantikörper | 26 |
| Tabelle 2.4: Verwendete Sekundärantikörper | 26 |
| Tabelle 2.5: Verwendete Substanzen und Materialien für die Genotypisierung..... | 27 |
| Tabelle 2.6: Verwendete Primer für die Genotypisierung | 28 |
| Tabelle 2.7: Verwendete Substanzen und Materialien für die Organentnahme..... | 28 |
| Tabelle 2.8: Verwendete Substanzen und Materialien für die Analyse von Thrombozyten.... | 29 |
| Tabelle 2.9: Verwendete Substanzen und Materialien für die Gewinnung von Blut aus dem retrobulbären Plexus sowie zur Bestimmung der Amylase-Aktivität..... | 29 |
| Tabelle 2.10: Verwendete Substanzen und Materialien zur Analyse pankreatischer Azini | 30 |
| Tabelle 2.11: Verwendete Substanzen und Materialien für histologische Untersuchungen..... | 30 |
| Tabelle 3.1: Konzentrationen und Inkubationszeiten von Agonisten und Hemmstoffen der Thrombozytenaggregation | 58 |
| Tabelle 3.2: Verwendete Konzentrationen der Thrombin-Lösungen für die Ca ²⁺ -Messung in Thrombozyten | 61 |

8.3 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|---|
| % | Prozent |
| < | kleiner als |
| > | größer als |
| × g | X-faches der Erdbeschleunigung |
| ® | registrierte Marke |
| °C | Grad Celsius |
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |
| µm | Mikrometer |
| µM | Mikromolar |
| 8-Br-cGMP | zyklisches 8-Bromo-Guanosin-3',5'-monophosphat |
| 8-pCPT-cGMP | zyklisches 8-(para-chlorophenylthio)-Guanosin- 3',5'-monophosphat |
| A | Extinktion |
| AA | Acrylamid |
| Ach | Acetylcholin |
| ad | auf |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| AI | autoinhibitorische Domäne |
| AK | Antikörper |
| al. | andere |
| AM | Acetoxymethylester |
| AMP | Adenosin-5'-monophosphat |
| ANP | Atriales natriuretisches Peptid |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| AUC | <i>area under the curve</i> |
| BisAA | Bisacrylamid |
| BNP | B-Typ natriuretisches Peptid/ <i>brain natriuretic peptide</i> |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| c | Konzentration |
| ca. | circa |
| Ca ²⁺ | Calcium-Ion |
| cAMP | zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat |
| CCh | Carbachol |
| CCK | Cholecystokinin |
| CFTR | <i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i> |
| cGK | cGMP-abhängige Proteinkinase |
| cGMP | zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat |
| Cl ⁻ | Chlorid |
| cm | Zentimeter |
| CMV | Cytomegalovirus |

| | |
|-------------------------------|--|
| CNG | durch zyklische Nukleotide gesteuert |
| CNP | C-Typ natriuretisches Peptid |
| Cre | <i>cyclization recombination</i> |
| Cu ⁺ | Kupfer(I)-Ion |
| Cu ²⁺ | Kupfer(II)-Ion |
| D | Verdünnungsfaktor/ <i>dilution factor</i> |
| DAG | Diacylglycerol |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2-phenylindol |
| ddH ₂ O | Reinstwasser |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure/ <i>deoxyribonucleic acid</i> |
| dNTP | Desoxyribonukleotide |
| DTS | Dichtes tubuläres System/ <i>dense tubular system</i> |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGTA | Ethylenglykoltetraessigsäure |
| eNOS | endotheliale NO-Synthase |
| ER | endoplasmatisches Retikulum |
| F | Fluoreszenz |
| FELASA | <i>Federation of European Laboratory Animal Science Associations</i> |
| Flp | Flippase |
| g | Gramm |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| GD | <i>Gatekeeper</i> -Domäne |
| ges. | gesamt |
| GMP | Guanosin-5'-monophosphat |
| GP | Glykoprotein |
| GPCR | G-Protein-gekoppelter-Rezeptor/ <i>G protein-coupled receptor</i> |
| GTP | Guanosin-5'-triphosphat |
| h | Stunde/ <i>hour</i> |
| HCl | Salzsäure |
| HCN4 | <i>hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 4</i> |
| HCO ₃ ⁻ | Hydrogencarbonat |
| HE | Hämatoxylin-Eosin |
| HEK | <i>human embryonic kidney</i> |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| HRP | Meerrettich peroxidase/ <i>horseradish peroxidase</i> |
| I | Interaktionsdomäne |
| I | Stromstärke |
| IgG | Immunglobulin G |
| iNOS | induzierbare NO-Synthase |
| IP | Immunpräzipitation |
| IP ₃ | Inositol-1,4,5-trisphosphat |

| | |
|--------------------|--|
| IP ₃ R1 | Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor Typ 1 |
| IP ₃ R2 | Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor Typ 2 |
| IP ₃ R3 | Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor Typ 3 |
| IRAG | Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor assoziiertes cGMP Kinase Substrat |
| IRAG1 | Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor assoziiertes cGMP Kinase Substrat 1 |
| IRAG2 | Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor assoziiertes 2 |
| K/S | Kupplungs-/Suppressordomäne |
| KASH | <i>Klarsicht/ANC-1/Syne/homology</i> |
| k _D | Dissoziationskonstante |
| kDa | Kilodalton |
| kg | Kilogramm |
| KO | Knockout |
| l | Liter |
| <i>lacZ</i> | Gen, das für β-Galactosidase codiert |
| LINC | <i>linker of nucleus and cytoskeletons</i> |
| LRMP | <i>lymphoid restricted membrane protein</i> |
| LZ | Leuzin-Zipper-Motiv |
| M | Molar |
| m | Masse |
| mA | Milliampere |
| max. | maximal |
| MEF | <i>mouse embryo fibroblast</i> |
| MeOH | Methanol |
| MES | 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure |
| mg | Milligramm |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| MLCP | Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase/ <i>myosin light chain phosphatase</i> |
| mm | Millimeter |
| mM | Millimolar |
| mRNA | Boten-Ribonukleinsäure/ <i>messenger ribonucleic acid</i> |
| MRVII | <i>murine retrovirus integration site 1</i> |
| mU | Milliunit |
| MYPT1 | <i>myosin phosphatase targeting subunit 1</i> |
| n | Anzahl/ <i>number</i> |
| NADPH | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat |
| neo | Neomycin |
| nm | Nanometer |
| nM | Nanomolar |
| nmol | Nanomol |
| nNOS | neuronale NO-Synthase |
| NO | Stickstoffmonoxid/ <i>nitric oxide</i> |

| | |
|-------------------|--|
| NO-GC | lösliche Guanylylzyklase |
| NOS | NO-Synthase |
| NP | natriuretische Peptide |
| OCS | offenes kanalikuläres System/ <i>open canalicular system</i> |
| OSER | <i>organized smooth endoplasmic reticulum</i> |
| <i>p</i> | Signifikanzwert |
| P2Y ₁ | P2Y Purinozeptor 1 |
| P2Y ₁₂ | P2Y Purinozeptor 12 |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PAR | Protease-aktivierter-Rezeptor |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung/ <i>phosphate buffered saline</i> |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion/ <i>polymerase chain reaction</i> |
| PDE | Phosphodiesterase |
| PF4 | Plättchenfaktor 4 |
| PFA | Paraformaldehyd |
| pGC | partikuläre Guanylylzyklase |
| PIP ₂ | Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat |
| P-IRAG2 | phosphoryliertes Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor assoziiertes 2 |
| PKA | Proteinkinase A |
| PKC | Proteinkinase C |
| PKG | Proteinkinase G |
| PKGI | cGMP-abhängige Proteinkinase I |
| PKGII | cGMP-abhängige Proteinkinase II |
| PKGI α | cGMP-abhängige Proteinkinase I α |
| PKGI β | cGMP-abhängige Proteinkinase I β |
| PLC | Phospholipase C |
| PMSF | Phenylmethansulfonylfluorid |
| PP | pankreatisches Polypeptid |
| PRP | plättchenreiches Plasma |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| R | Ratio |
| rpm | Umdrehungen pro Minute/ <i>revolutions per minute</i> |
| RT | Raumtemperatur |
| s | Sekunde |
| s. | siehe |
| SDS | Natriumdodecylsulfat/ <i>sodium dodecyl sulfate</i> |
| SEM | Standardfehler des Mittelwertes/ <i>standard error of the mean</i> |
| Ser | Serin |
| sez. | sezerniert |
| sGC | lösliche Guanylylzyklase/ <i>soluble Guanylyl cyclase</i> |
| SNAP | <i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein</i> |
| SNP | Nitroprussid-Natrium/ <i>sodium nitroprusside</i> |
| SUN | Sad-1/UNC-84 |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA-Puffer |

| | |
|------------------|---|
| TBS | Tris-gepufferte Salzlösung/ <i>Tris buffered saline</i> |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin |
| Thr | Threonin |
| TiBUR | Tierbestand Uni Regensburg |
| TM | Transmembrandomäne |
| TP | Totalprotein |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| TxA ₂ | Thromboxan A ₂ |
| ™ | nicht registrierte Marke |
| U | Unit |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volt |
| V | Volumen |
| VASP | Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein |
| VEGF | vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor/ <i>vascular endothelial growth factor</i> |
| vWF | von-Willebrand-Faktor |
| WT | Wildtyp |
| X | Menge |
| X-Gal | 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl-β-D-Galactopyranosid |
| ZTL | zentrale Tierlaboratorien |
| ΔT | Reaktionszeit |
| λ | Wellenlänge |

8.4 Totalproteinaufnahmen

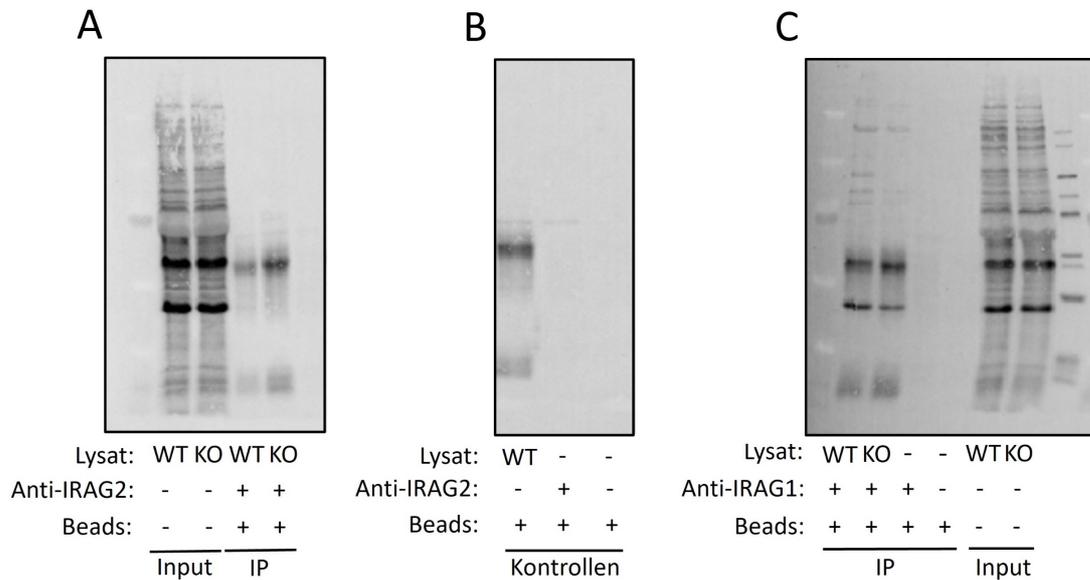


Abbildung 8-1: Totalproteinaufnahmen zu Interaktionspartnern von IRAG2 in Thrombozyten

A: Totalprotein zu Abbildung 4-2 A. **B:** Totalprotein zu Abbildung 4-2 B. **C:** Totalprotein zu Abbildung 4-2 C.

IP: Immunpräzipitation; WT: IRAG2-WT; KO: IRAG2-KO; Anti-IRAG1: IRAG1-Antikörper; Anti-IRAG2: IRAG2-Antikörper.

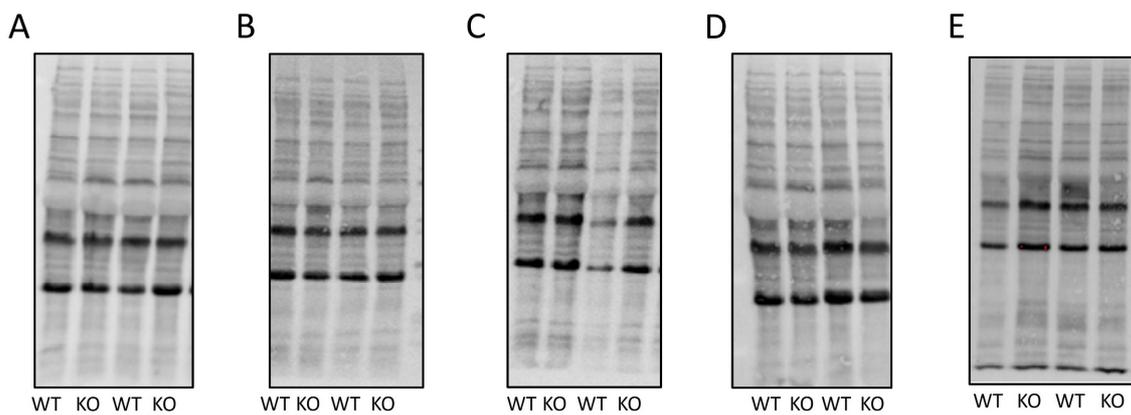


Abbildung 8-2: Totalproteinaufnahmen zur Expression von Signalproteinen des NO/cGMP/PKG-Signalweges

A: Totalprotein zu Abbildung 4-3 A (IP₃R1). **B:** Totalprotein zu Abbildung 4-3 B (IP₃R2). **C:** Totalprotein zu Abbildung 4-3 C (IP₃R3). **D:** Totalprotein zu Abbildung 4-3 D (IRAG1). **E:** Totalprotein zu Abbildung 4-3 E (PKGIβ).

WT: IRAG2-WT; KO: IRAG2-KO.

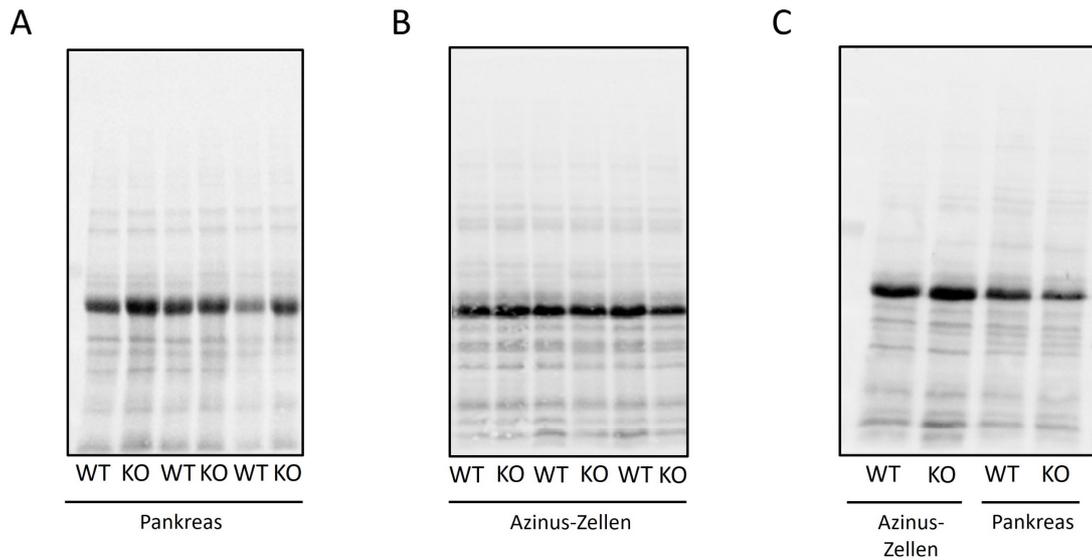


Abbildung 8-3: Totalproteinaufnahmen zur Lokalisation von IRAG2 im Pankreas

A: Totalprotein zu Abbildung 4-9 A. B: Totalprotein zu Abbildung 4-9 C. C: Totalprotein zu Abbildung 4-9 E.

WT: IRAG2-WT; KO: lacZ × IRAG2-KO.

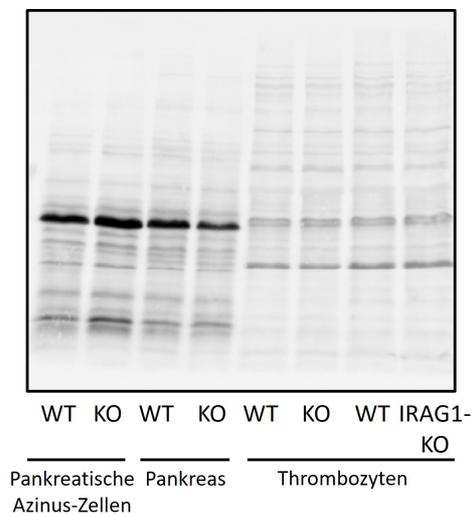


Abbildung 8-4: Totalproteinaufnahme zur Expression von IRAG1 im Pankreas

Totalprotein zu Abbildung 4-11.

WT: IRAG2-WT; KO: IRAG2-KO.

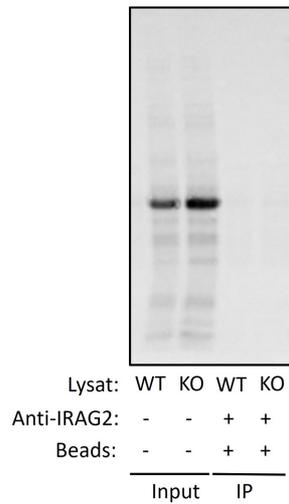


Abbildung 8-5: Totalproteinaufnahme zur Analyse der Interaktionspartner von IRAG2 im Pankreas

Totalprotein zu Abbildung 4-12.

WT: IRAG2-WT; KO: IRAG2-KO; IP: Immunpräzipitation; Anti-IRAG2: IRAG2-Antikörper.

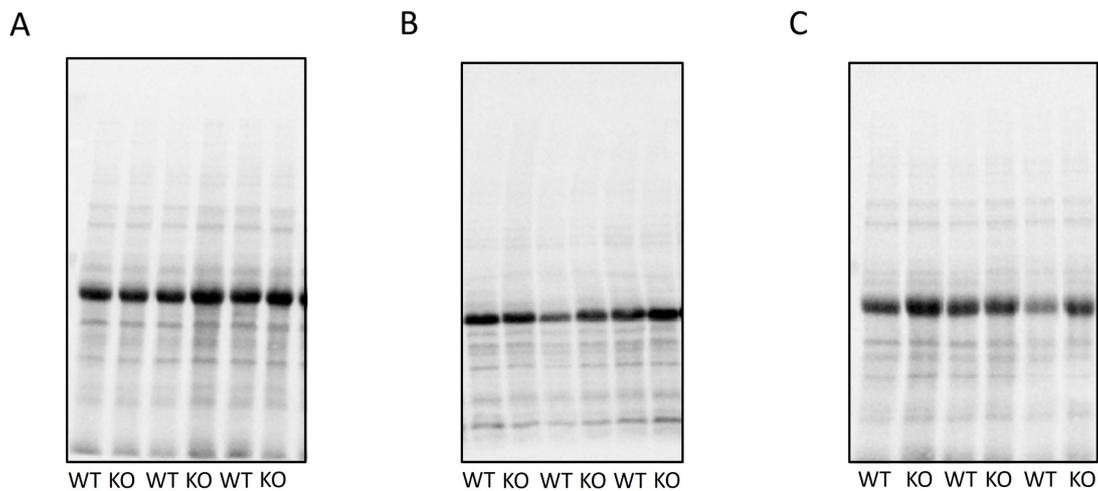


Abbildung 8-6: Totalproteinaufnahme zur Analyse der Expressionsmenge der IP₃-Rezeptor Subtypen in Pankreata von IRAG2-WT und IRAG2-KO Tieren

A: Totalprotein zu Abbildung 4-13 A (IP₃R3) **B:** Totalprotein zu Abbildung 4-13 C (IP₃R2). **C:** Totalprotein zu Abbildung 4-13 E (IP₃R1). WT: IRAG2-WT; KO: IRAG2-KO.

8.5 Wissenschaftliche Veröffentlichungen

8.5.1 Publikationen im Rahmen der Dissertation

Prüschenk, S. and J. Schlossmann (2022). "Function of IRAG2 is Modulated by NO/cGMP in Murine Platelets." Int J Mol Sci **23**(12): 6695

Prüschenk, S., M. Majer, R. Schreiber, 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.

8.5.2 Weitere Publikationen

Harloff, M., *S. Prüschenk*, R. Seifert and J. Schlossmann (2022). "Activation of soluble guanylyl cyclase signalling with cinaciguat improves impaired kidney function in diabetic mice." Br J Pharmacol. **179**(11): 2460-2475

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

8.5.3 Posterpräsentationen

Prüschenk, S., J. Schlossmann (2022) "Function of IRAG2 is modulated by NO/cGMP in murine platelets." *10th International Conference on cGMP, Augsburg*

Prüschenk, S., M. Majer, R. Schreiber, J. Schlossmann (2022) "IRAG2 interacts with IP₃-receptor types 1, 2 and 3 and regulates intracellular Ca²⁺ in murine pancreatic acinar cells." *7th German Pharm-Tox Summit, virtuell*

Prüschenk, S., M. Majer, R. Schreiber, J. Schlossmann (2021) "IRAG2 interacts with IP₃-receptor types 1, 2 and 3 and regulates intracellular Ca²⁺." *CanCaN Conference on Cancer, Cardiovascular Diseases & Neurological Disorders 2021, Tübingen*

8.6 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, seine fachliche Unterstützung sowie die engagierte Betreuung während der letzten Jahre bedanken. Bei Herrn Prof. Dr. Achim Göpferich bedanke ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie die Möglichkeit zur Durchführung der Calcium-Messungen an seinem Lehrstuhl. Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. Rainer Schreiber und Herrn Prof. Dr. Sigurd Elz dafür danken, dass Sie als weiterer Prüfer bzw. Vorsitzender des Prüfungsausschusses zur Verfügung stehen.

Vielen Dank auch an Herrn Prof. Dr. Karl Kunzelmann, der mir die Möglichkeit gegeben hat an seinem Lehrstuhl Calcium-Messungen durchzuführen. Bei der gesamten AG Kunzelmann, insbesondere bei Herrn Prof. Dr. Rainer Schreiber, bedanke ich mich herzlich für die Unterstützung, die Hilfe und die Ratschläge bei den Messungen.

Ein großes Dankeschön für die kleinen und großen Hilfen im Laboralltag geht an unsere technischen Assistenten, Simon Kerler, Gertraud Wilberg und insbesondere an Astrid Seefeld, die immer mit Unterstützung, Rat und Tat zur Seite stand. Vielen Dank auch hier nochmals an Simon für die Versorgung der Tiere. Auch an unsere Sekretärin Martina Wechler ein herzliches Dankeschön, für all die Hilfe bei organisatorischen Anliegen.

Bedanken möchte ich mich auch bei den weiteren Lehrstuhlmitgliedern, Labor-Nachbarn und ehemaligen Kollegen – Robert, Philipp, Michael, Consti, Leo, Prof. Dr. Frieder Kees, PD Dr. Christoph Dorn, Andrea, Gani und Manu – für die schöne Zeit am Lehrstuhl während der letzten Jahre. Danke, für all die schönen Gespräche und witzigen Momente – sowohl während des Arbeitsalltags als auch danach. Ein großer geht Dank hier an Michael für seine Hilfsbereitschaft und das Korrekturlesen der Paper und dieser Arbeit.

Bei meinen Freunden – vor allem bei Annika, Simone, Steffi, Sarah, Max und Steff – möchte ich mich besonders bedanken. Danke, dass ihr immer ein offenes Ohr habt und die letzten Jahre für so viele schöne Stunden, tolle Urlaube und viel Ablenkung gesorgt habt!

Schließlich geht mein größter Dank an meine gesamte Familie und meinen Freund Max, die mich immer aufgebaut und unterstützt haben, mir Rückhalt gegeben und auch nie den Glauben an mich verloren haben.

8.7 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 07.11.2022

(Sally Prüschenk)