

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von  
Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

# Genetische und phänotypische Charakterisierung eines Mausmodells für erbliche Polycythämie.

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

von  
Kateryna Micklich  
aus  
Riga, Lettland

München, 2012

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun  
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Wolf  
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Gabius

Tag der Promotion: 21. Juli 2012

Meiner ganzen Familie, besonders meinem Ehemann.

# INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung .....	1
2. Literaturübersicht .....	2
2.1. Das Münchener ENU-Maus-Mutagenese-Projekt.....	2
2.2. Systematische Phänotypisierung in der German Mouse Clinic .....	4
2.3. Hämatopoese .....	8
2.4. Polyglobulie (Erythrozytosen) .....	11
2.4.1. Relative Polyglobulie (Pseudopolyglobulie) .....	12
2.4.2. Absolute Polyglobulie.....	13
2.4.3. Primäre Polyglobulien .....	14
2.4.3.1. Tschuwaschien-Polycythämie .....	14
2.4.3.2. Primäre angeborene Polycythämie .....	14
2.4.3.3. Polycythämia vera.....	14
2.4.4. Mausmodelle für die Polycythämie .....	16
2.4.5. Differenzialdiagnose der Polycythämia vera.....	17
2.5. Mesenchymale Tumoren des Gastrointestinaltrakts.....	17
2.5.1. Gastrointestinale Stromatumoren .....	18
2.5.2. Mausmodelle für GIST .....	19
2.6. Megakolon.....	20
3. Material und Methoden .....	21
3.1. Versuchstiere und Haltungsbedingungen .....	21
3.2. Analyse der Lebensfähigkeit der homozygot mutanten Tiere.....	22
3.3. Körpergewichtsentwicklung.....	22
3.4. Phänotypisierung der mutanten Mauslinie MVD013 im GMC Primärscreen .....	22
3.4.1. Entnahme und Untersuchung von Blutproben.....	24
3.4.2. Bestimmung der Blutbildparameter.....	25
3.4.2.1. Automatisches Blutanalysegerät ABC-Vet .....	25
3.4.2.2. Automatisches Blutanalysegerät Sysmex XT-2000iV .....	25
3.4.3. Bestimmung der osmotischen Resistenz der Erythrozyten.....	26
3.4.4. Immunologische Phänotypisierung von peripherem Blut .....	27
3.4.5. Klinische Chemie.....	27
3.4.6. Intraperitonealer Glukose Toleranz Test .....	29
3.5. Blutgasanalyse.....	30
3.6. Bestimmung der Erythropoetinkonzentration .....	30

3.7. Pathologische Untersuchungen .....	31
3.7.1. Sektion und Makroskopische Untersuchungen.....	32
3.7.2. Hämatoxilin-Eosin-Färbung (HE) .....	32
3.7.3. Immunhistochemie (IHC).....	32
3.7.4. Immunhistochemie Analyse .....	33
3.8. Untersuchung der Zusammensetzung der Knochenmarkszellen, der Apoptoseraten und des Koloniewachstums der hämatopoetischen Progenitorzellen.....	33
3.9. Genotypisierung .....	34
3.9.1. Kartierung der Mutation .....	34
3.9.1.1. Grobkartierung der Mutation durch Kopplungsanalyse .....	34
3.9.1.2. Feinkartierung der Mutation .....	35
3.9.1.3. Priorisierung von Kandidatengen.....	35
3.9.2.1. Isolation der genomischen DNA.....	36
3.9.2.2. Polymerase-Kettenreaktion.....	36
3.9.2.3. Agarose-Gelelektrophorese .....	37
3.9.2.4. Reinigung von PCR-Produkten .....	38
3.9.2.5. Sequenzierreaktion (Cycle-Sequencing).....	39
3.9.2.6. Reinigung des Sequenzieransatzes mit Clean-Seq Beads .....	40
3.10. Statistische Auswertung .....	40
4. Ergebnisse .....	42
4.1. Analyse der Lebensfähigkeit der homozygot mutanten Tiere .....	42
4.2. Körpergewichtsentwicklung .....	43
4.3. Hämatologische Untersuchungen .....	46
4.3.1. Hämatologie.....	46
4.3.2. Bestimmung der osmotischen Resistenz der Erythrozyten.....	48
4.3.3. Untersuchung der Retikulozytenzahl und des Differentialblutbilds	49
4.3.4. Immunologische Phänotypisierung von peripherem Blut .....	50
4.4. Klinisch-chemische Parameter .....	51
4.5. Intraperitonealer Glukose Toleranz Test .....	53
4.6. Blutgasanalyse .....	55
4.7. Serum Erythropoetinkonzentration.....	57
4.8. Pathologische Untersuchungen.....	57
4.8.1. Makroskopische und histologische Untersuchungen im Primärscreen .....	57

4.8.2. Immunhistochemische Analyse .....	59
4.9. Bestimmung der Zusammensetzung der hämatopoetischen Stammzellen.....	61
4.9.1. Bestimmung der Anzahl der koloniebildenden Einheiten des Knochenmarks anhand des Koloniewachstums in vitro .....	61
4.9.2. Untersuchungen an der Milz: Bestimmung der Anzahl der kolonienbildenden Einheiten, Der Megakaryozytenzahl und des Organengewichts .....	65
4.10. Genotypisierung.....	67
4.10.1. Feinkartierung der Mutation .....	67
4.10.2. Priorisierung und Sequenzierung der Kandidatengene.....	68
5. Diskussion.....	70
5.1. Klinischer Phänotyp.....	70
5.2. Genetische Charakterisierung .....	75
5.3. Fazit und Ausblick .....	76
6. Zusammenfassung.....	77
7. Summary .....	79
8. Literaturverzeichnis.....	81
9. Anhang .....	95
10. Danksagung.....	105

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
♀	Weibliches Geschlecht
♂	Männliches Geschlecht
A	Adenin
ABC-Methode	Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex-Methode
ABC-Vet	Animal-Blood-Counter
ABE	Aktuelle Basenabweichung
ALT	Alanin-Aminotransferase
AMY	α-Amylase
ANOVA	Analysis of variance
APL	Alkalische Phosphatase
ASAT (AST)	Aspartat-Aminotransferase
AUC	Die Fläche unter der Gewichtskurve
BASO	Basophiler Granulozyt
BFU-E	Erythroid Burst Forming Unit
BM Zellen	Knochenmarkzellen (Bone marrow)
BMDC	Aus dem Knochenmark stammende Zellen ( <i>Bone Marrow-Derived Cells</i> )
bp.	Basenpaare (base pairs)
bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin
C3H	C3HeB/FeJ-Mausinzuchtstamm
C57BL/6	C57BL/6Jlco-Mausinzuchtstamm
ca.	Circa
Ca	Kalzium
CD	Unterscheidungsgruppen (Cluster of differentiation)
CD34	Das hämatopoetische Vorläuferzellantigen
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure (complementary deoxyribonucleic acid)
CEL	Chronische Eosinophilenleukämie
CFU	Kolonie-bildende Einheiten (colony forming units)
CFU-E	Erythropoetische Kolonie-bildende Einheiten
CFU-GEMM	Hämatopoetische multipotente Stammzellen
CFU-GM	Zellkolonie für Granulozyten/Monozyten
Chr.	Chromosom
Cl	Chlorid
CLP	Gemeinsamen lymphoiden Vorläuferzellen (common lymphoid progenitors)
Cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
CML	Chronische Myeloische Leukämie
CMML	Chronischen myelomonozytären Leukämie
CMP	Gemeinsamen myeloiden Vorläuferzellen (common myeloid progenitors)
CNL	Chronische Neutrophilenleukämie

CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Cy3 und Cy5	Fluoreszenzstoffen
d.h.	das heißt
DAB	Chromogens Diaminobenzidin
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
ddNTPs	Didesoxyribonukleosid-Triphosphate
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DI	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DWP	Deep Well Plate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMPreSSslim	European Mouse Phenotyping Resource for Standardized Screens
ENU	N-ethyl-N-nitrosourea
EO	Eosinophiler Granulozyt
EPO	Erythropoetin
EPOR	Erythropoetin-Rezeptor-Gens
ESA	Erythropoese stimulierenden Agenzien
ET	Essentielle Thrombozythämie
et al.	et alii
F1=N1-F2	Erste bis zweite Filialgeneration
FACS	Durchflusszytometrie (fluorescence activated cell sorting)
Fe	Eisen
FELASA	Federation of Laboratory Animal Science Associations
fmol	Femtomol
G	Gramm
G	Guanin
GAC	Genom-Analyse-Zentrum des Helmholtz Zentrums München
G-CSF	Koloniestimulierende Faktoren (Colony Stimulating Factor )
GEO	Gene Expression Omnibus
GIST	Gastrointestinale Stromatumoren
GLS	Glukose
GMC	Die Deutsche Mauslinik (German Mouse Clinic)
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GMP	Granulozyten und Makrophagen Vorläuferzellen (granulocyte and macrophage progenitors)
GTT	Glukose-Toleranz-Test
H	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Hydrogencarbonatkonzentration
HCT	Hämatokrit
HE	Hämatoxilin-Eosin-Färbung
HES	Hypereosinophile Syndrom



HFR	Unreife Retikulozyten
HGB	Hämoglobin
HIF1	Hypoxie-induzierbaren-Faktors
HRP	Enzym Meerrettich Peroxidase
HSC	Hämatopoetische Stammzellen
HSCs/Ps	Hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen
HST	Harnstoff
ICC	Interstitielle Cajal-Zellen
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
IL-3	Interleukin 3
IL-6	Interleukin 6
IpGTT	Intraperitonealer Glukose Toleranz Test
IVC	Isolated Ventilated Cages
Jak2	Janus kinase 2 Gen
K	Kalium
Kb	Kilo-Basenpaare (kilo base pairs)
Kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
KSL	C-kit+, Sca-1+, Lin- Zellen
KL	C-kit+, Lin- Zellen
L	Liter
LDH	Laktat-dehydrogenase
LFR	Reife Retikulozyten
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LT-HSC	langfristigen hämatopoetischen Stammzellen (Long-term hematopoietic stem cells)
LYMPH	Lymphozyten
Mb	Megabasen
mbp	Megabasenpaare
MCD	Mastzellerkrankungen
MCH	Mittleres korpuskuläres Hämoglobin
MCHC	Mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration
MCV	Mittleres Zellvolumen
MEP	Megakaryozyten-erythroiden Vorläuferzellen (megakaryocyte-erythroid progenitors)
mEq	Molar equivalent
MFR	Mittelreife Retikulozyten
MIDAS	Microarray Data Analysis System
Min	Minute
Mio	Millionen
ml	Milliliter
Mm	Millimeter
mmol	Millimol
MONO	Monozyten
MPN	Myeloproliferative Neoplasien
MPP	Multipotenten myeloiden Stammzellen

	(multipotent myeloid stem cell)
MPV	Durchschnittliches Thrombozytenvolumen
Mut	Mutant/e/n
MW	Mittelwert
N	Anzahl der Tiere
n.s.	Nicht signifikant
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NEFA	Freie Fettsäuren
NEUT	Neutrophiler Granulozyt
NGFN	Nationalen Genom-Forschungs-Netzes
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OMS	Osteomyelosklerose
p	p-Wert, Überschreitungswahrscheinlichkeit
P	Anorganisches Phosphat
pCO <sub>2</sub>	Kohlendioxidpartialdruck
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
<i>Pdgfra</i>	Platelet-derived Growth Factor Receptor- $\alpha$
pH	Potentia hydrogenii
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
PV	Polycythämie vera
RBC	Erythrozyten gesamt
RDW	Erythrozytenverteilungsbreite
RET	Gesamt-Retikulozytenzahl
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
SAM	Significant Analysis of Microarrays
SCF	Stammzellfaktor
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SNPs	Einzelnukleotid-Polymorphismen (Single Nucleotide Polymorphisms)
sog.	so genannte
SPF-Hygienestatus	Spezifiziert pathogenfrei-Hygienestatus
SSC	Standard Saline Citrate
ST-HSC	Kurzfristigen hämatopoetischen Stammzellen (Short-term hematopoietic stem cells)
T	Thymin
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TGL	Triglyceride
TIBC	Totalen Eisenbindungskapazität
TMB	Tetramethylbenzidin
TP	Gesamteiweiß
U	Einheit (unit)
UIBC	Eisenbindungskapazität
usw.	und so weiter
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
VHL-Gen	Von-Hippel-Lindau Gen

WBC	Leukozyten gesamt
WHO	World Health Organization
Wt	Wildtyptiere
z.B.	zum Beispiel
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{mol}$	Mikromol

## 1. EINLEITUNG

Bei der Erforschung genetisch bedingter und multifaktorieller Erkrankungen des Menschen leisten Tiermodelle seit langem einen wichtigen Beitrag. Der Labormaus (*Mus musculus*) kommt in diesem Zusammenhang eine besondere Bedeutung zu. Die vorhandenen Möglichkeiten zur genetischen Standardisierung sowie zur genetischen Modifikation, die hohe Fruchtbarkeit und das kurze Generationsintervall prädestinieren diese Spezies als Modellorganismus für genetische Analysen bei Säugetieren [1]. Für fast alle Gene des Menschen existiert ein Gen mit ähnlicher Funktion im Mausgenom [2]. Daher eignen sich Mäuse zur Erforschung der Pathomechanismen menschlicher Erkrankungen.

Im Rahmen des Münchener ENU-Mausmutagenese-Projekts wurden durch zufällige chemische Mutagenese viele neue mutante Mauslinien erzeugt, die Veränderungen in klinisch-chemischen und hämatologischen Blutparametern aufweisen [3]. Die mutante Linie MVD013 wurde im September 1999 etabliert. Ausgehend von einem Tier, das durch eine erhöhte Zahl und ein verringertes Volumen der Erythrozyten auffiel, wurde eine Mauslinie mit dominanter Mutation gezüchtet. Außerdem zeigten einzelne ältere mutante Tiere dieser Linie zusätzliche pathologische Veränderungen wie Darmtumoren und Megacecum (massive Dilatation des Ceacum). Die Lage der dafür verantwortlichen Mutation wurde mit Hilfe einer Kopplungsanalyse auf Chromosom 5, 55,5-103 Mb lokalisiert.

Ziel der Arbeit war es, nach der ursächlichen Mutation in der Mauslinie MVD013 zu suchen und ihre pathologischen Auswirkungen zu charakterisieren, um so die Eignung der Linie als Tiermodell für Polycythämie und Tumorerkrankungen zu evaluieren.

## 2. LITERATURÜBERSICHT

### 2.1. DAS MÜNCHENER ENU-MAUS-MUTAGENESE-PROJEKT

Das Münchener ENU-Maus-Mutagenese-Projekt war ein Teil des Deutschen Humangenomprojektes. Nach der Entschlüsselung des menschlichen Genoms besteht eine neue Herausforderung darin, Kenntnisse über die Funktion von Genen zu erlangen und ihre Rolle im Rahmen der Entstehung von Erkrankungen zu klären. Für diese Zwecke sind Mausmodelle ein wichtiges Werkzeug [4].

Das Genom von Mäusen kann mit verschiedenen Methoden zufällig oder gezielt verändert werden. Die chemische Mutagenese mittels N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) führt zur Erzeugung zufälliger Punktmutationen [5].

ENU ( $C_3H_7N_3O_2$ ) stellt eine Verbindung aus der Gruppe der Nitrosoharnstoffe dar. Es ist ein starkes Karzinogen und hochpotentes Mutagen [4, 6-8]. Die Ethylgruppe des ENU kann auf Stickstoff- oder Sauerstoff-Radikale in verschiedenen reaktiven Gruppen übertragen werden [9, 10]. Werden solche Veränderungen an der DNA ausgeführt, kann es während der DNA-Replikation zu einer Fehlidentifizierung der ethylierten Base kommen. Damit kommt es zu einem Fehler bei der Basenpaarung und zum Einfügen einer falschen Base in den neu synthetisierten Strang, was bei der weiteren Replikation zum vollständigen Austausch eines Basenpaares in einem neuen replizierten Strang führt [11]. Die induzierten Mutationen verursachen meist einen partiellen Verlust der Genfunktion, es sind jedoch auch Mutationen möglich, die zu einer gesteigerten Funktion oder einem völligen Funktionsverlust führen [12].

Zur Erzeugung von mutanten Tieren wurden 10-14 Wochen alte männliche C3HeB/FeJ (C3H) Mäuse dreimal im wöchentlichen Abstand mit ENU behandelt. Die intraperitoneale Injektion enthielt eine Dosis von 90 mg ENU pro Kilogramm Körpergewicht. Dadurch wurde in den Spermatogonien der behandelten Tiere eine Vielzahl von zufälligen Punktmutationen ausgelöst. Nach einer Sterilitätsphase von 6-8 Wochen wurden die behandelten Männchen mit weiblichen Tieren verpaart [4]. Die Nachkommen dieser Anpaarungen (F1-Generation) wurde mit Hilfe von verschiedenen

Untersuchungsmethoden systematisch auf phänotypische Veränderungen untersucht [3, 13, 14].

Bei Entdeckung auffälliger Parameter wurden die sogenannten „phänotypischen Varianten“ mit Wildtyp-Mäusen verpaart. Sollte eine dominante Mutation der Auslöser des beobachteten pathologischen Phänotyps sein, sind bei monogenem Erbgang 50% Mutanten unter den Nachkommen dieser Bestätigungskreuzungen zu erwarten. Im Falle der Weitergabe des pathologischen Phänotyps an die Nachkommen ist die Zucht einer neuen mutanten Linie möglich [5, 8, 15, 16]. Diese mutante Linie wird anschließend sowohl genotypisch auf die ursachliche Mutation, als auch phänotypisch auf die genaue Auswirkung dieser Mutation untersucht.

Mehrere große Forschungszentren weltweit beschäftigen sich mit der ENU Mutagenese bei Mäusen (Tabelle 1) [17].

Tabelle 1: ENU-Maus-Mutagenese-Projekte

ENU Zentren	Website
ENU Mutagenesis Programme MRC Harvell UK	<a href="http://www.har.mrc.ac.uk/research/mutagenesis/">http://www.har.mrc.ac.uk/research/mutagenesis/</a>
Australian Phenomics Facility	<a href="http://www.apf.edu.au/">http://www.apf.edu.au/</a>
Baylor College of Medicine Mouse Genome project	<a href="http://www.mouse-genome.bcm.tmc.edu/ENU/ENUHome.asp">http://www.mouse-genome.bcm.tmc.edu/ENU/ENUHome.asp</a>
Centre for Modeling Human disease	<a href="http://www.cmhd.ca/">http://www.cmhd.ca/</a>
Genomics Institute of the Novartis Research foundation	<a href="http://www.gnf.org/">http://www.gnf.org/</a>
Jackson Laboratory Neuroscience Mutagenesis Facility	<a href="http://nmf.jax.org/">http://nmf.jax.org/</a>
Jackson Laboratory Mouse Heart, Lung, Blood and Sleep Disorders Center	<a href="http://pga.jax.org/">http://pga.jax.org/</a>
Molecular Neurobiology at Northwestern University	<a href="http://www.neurobiology.northwestern.edu/">http://www.neurobiology.northwestern.edu/</a>
Mutagenesis Project at MRI	<a href="http://www.montana.edu/wwwmri/index.html">http://www.montana.edu/wwwmri/index.html</a>
Oak Ridge National Laboratory	<a href="http://www.ornl.gov/">http://www.ornl.gov/</a>
RIKEN Mutagenesis Center	<a href="http://www.brc.riken.jp/lab/gsc/mouse/">http://www.brc.riken.jp/lab/gsc/mouse/</a>
Tennessee Mouse Genome Consortium	<a href="http://www.tnmouse.org/">http://www.tnmouse.org/</a>
University of Pennsylvania, Philadelphia	<a href="http://www.med.upenn.edu/ins/faculty/bucan.htm">http://www.med.upenn.edu/ins/faculty/bucan.htm</a>

## 2.2. SYSTEMATISCHE PHÄNOTYPISIERUNG IN DER GERMAN MOUSE CLINIC

Nach der Etablierung einer großen Zahl an Mauslinien mit den verschiedensten, zufälligen oder gezielten genetischen Modifikationen kommt der standardisierten und systematischen phänotypischen Untersuchung der Tiere eine große Bedeutung für die funktionelle Genomanalyse zu.

Aufgrund von pleiotropen Effekten kann ein Gen unterschiedliche Funktionen in verschiedenen Organen haben. Somit ist eine möglichst umfassende Phänotypisierung der Mauslinien durchzuführen. [18]

Die Deutsche Mauslinik (German Mouse Clinic, GMC) wurde als weltweit erste Plattform für die Mausphänotypisierung im Rahmen des Nationalen Genom-Forschungs-Netzes (NGFN) und in Kollaboration mit dem europäischen Konsortium „EUMORPHIA“ etabliert [19, 20]. Sie bietet ein breites Spektrum an Analysen aus verschiedenen klinischen Bereichen (Abb. 1) für eine ausführliche und standardisierte Phänotypisierung von Mauslinien an.

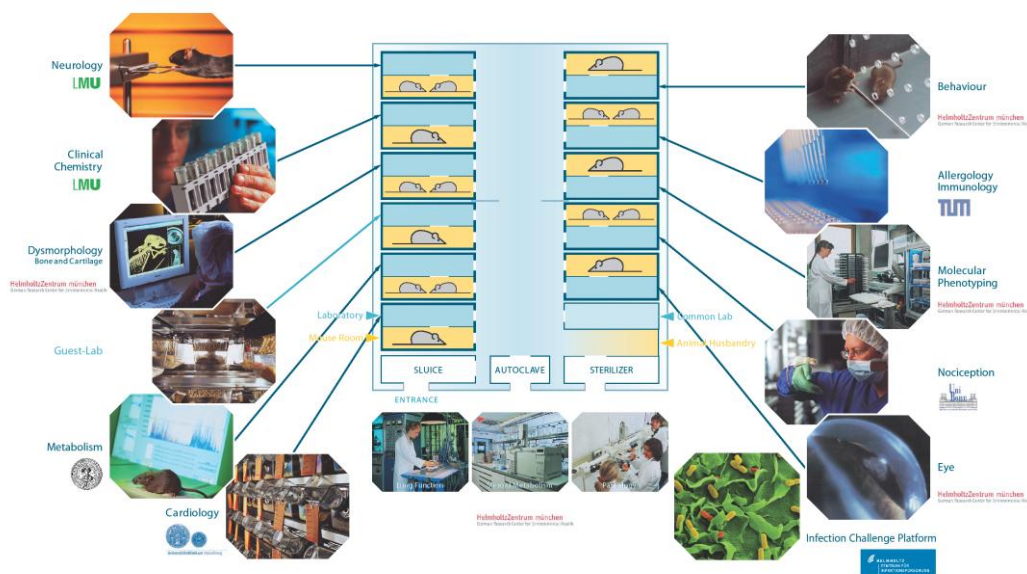


Abbildung 1: Die Deutsche Mauslinik

Die Labore für die verschiedenen Untersuchungen sind in einem Gebäudekomplex untergebracht, wodurch sich die Zusammenarbeit an der gemeinsamen Mausphänotypisierung besonders effektiv gestaltet lässt (Quelle: <http://www.mouseclinic.de>).

Tabelle 2: Untersuchungen der Basisphänotypisierung in der GMC

<b>Untersuchung</b>	<b>Parameter</b>	<b>Methoden</b>
Dysmorphologie	Analyse von Körper, Skelett, Knochen und Knorpeln [21] [22]	Morphologische Untersuchungen, Knochendichtemessung, Röntgen
Verhalten	Analyse des Angst- und, Sozialverhaltens, sowie der sensorimotorischen Reizverarbeitung von Reflexen [23]	<i>Open field</i> , <i>acoustic startle &amp; PPI</i>
Neurologie	Bewertung der spinozerebellären, sensorischen, autonomen und Muskel-Funktionen [24].	<i>Modified SHIRPA protocol</i> , <i>grip strength</i> , <i>rotarod</i>
Ophthalmologie	Beurteilung der morphologischen Veränderungen des Auges und der Sehkraft [25, 26]	<i>Funduscopy laser interference biometry</i> <i>slit lamp biomicroscopy</i> , <i>optokinetic drum</i>
Klinische Chemie und Hämatologie	Bestimmung von klinisch-chemischen und hämatologischen Parametern im Blut, Beurteilung der Glukosetoleranz [27]	Klinisch-chemische und hämatologische Laborparameter, intraperitoneale Glukosetoleranztest (IpGTT)
Immunologie	Analyse von immunologischen Parametern im peripheren Blut	<i>Flow cytometry</i> , <i>multiplex Bead Array</i>
Allergie	Analyse von Plasma-Immunglobulinen [28]	<i>ELISA</i>
Steroidmetabolismus	Messung von Steroidhormonen im Plasma (Testosteron, DHEA)	<i>ELISA</i>
Nozizeption	Untersuchung der Schmerzreaktion	<i>Hot plate assay</i>
Herz-Kreislauf	Beurteilung von funktionalen und blutbasierten Herz-Kreislauf-Parametern [29, 30]	Nicht-invasive Blutdruckmessung, ANP, Optional: Elektrokardiographie, Echokardiographie
Lungenfunktion	Beurteilung von Veränderungen im spontanen Atemmuster und in der Lungenfunktion [31]	Ganzkörper-Plethysmographie
Genexpression	RNA Expression Profiling [32]	DNA-Chip-Technologie
Energiestoffwechsel	Beurteilung der Veränderungen im Körpergewicht, Regulation der Körpertemperatur und des Energiestoffwechsel [33]	Indirekte Kalorimetrie
Pathologie	Komplette morphologische Untersuchung, makroskopische und mikroskopische Analyse der Organe [3, 34, 35]	Standard-Färbungen: <i>H&amp;E</i> , <i>PAS</i> , <i>Luxol fast blue</i>



Um einerseits mit einer relativ geringen Tierzahl einen umfangreichen und standardisierten Datensatz zu produzieren und andererseits eine zeit- und kostenoptimierte Phänotypisierung zu ermöglichen, wurde ein einheitlicher Arbeitsablauf etabliert. Diese zehnwöchige Untersuchung einer Mauslinie in der GMC erlaubt die standardisierte Durchführung einer maximalen Anzahl von Analysen an derselben Mauskohorte in verschiedenen Modulen (Tabelle 2).

In einer ersten Version des Arbeitsablaufes wurden die Mäuse in einem einzigen Durchgang phänotypisiert. Eine Kohorte von 30 Mausmutanten, jeweils 15 Tiere pro Geschlecht, wurde mit der gleichen Anzahl von Kontrolltieren verglichen. Seit die GMC ein Mitglied des EUMODIC Konsortiums (European Mouse Disease Clinic, [www.eumodic.org](http://www.eumodic.org)) ist, wurde die Phänotypisierung auf einen neuen Ablauf nach der Vorgaben des Projektes, genannt EMPReSSslim (European Mouse Phenotyping Resource for Standardized Screens), umgestellt [23]. EUMODIC vereint vier Forschungsinstitute: das Medical Research Council (MRC Harwell) und das Wellcome Trust Sanger Institute (WTSI) in Großbritannien, das Institut Clinique de la Souris (ICS) in Frankreich und die GMC im Helmholtz Zentrum München [36]. Der aktuelle Arbeitsablauf nach EMPReSSslim schließt mehr als 150 SOPs (Standard Operation Procedures) ein, sowie detaillierte Informationen über die gemessenen Parameter, die verwendeten Einheiten und den Datentyp [36]. Als ersten Schritt zu einer umfassenden Erforschung des Mausgenoms wird das EUMODIC Konsortium die Phänotypisierung von 650 mutanten Mauslinien durchführen. Die mutanten Mauslinien werden zuerst in einem Primärscreen analysiert, der grundlegende Untersuchungen mit mehr als 550 Parametern umfasst [37]. Dabei werden mindestens 56 Tiere (14 pro Geschlecht und Genotyp) analysiert. Die Mäuse werden in zwei Kohorten mit je mindestens 7 Tieren pro Gruppe aufgeteilt, die die unterschiedlichen Untersuchungen durchlaufen. Die Ergebnisse dieser Analysen werden in einer zentralen Datenbank gespeichert und sind über das Internet frei zugänglich ([www.europenome.org](http://www.europenome.org)). Bei Bedarf einer genaueren Charakterisierung der mutierten Mauslinien, können zusätzliche sekundäre Untersuchungen durchgeführt werden.

### **Das klinisch-chemische Labor der GMC**

Das klinisch-chemische Labor in der Deutschen Mauslinik untersucht klinisch-chemische und hämatologische Laborparameter. Ursprünglich wurde die klinisch-chemische Untersuchung für die Analyse der Nachkommenschaft von ENU-mutagenisierten Mäusen etabliert [13, 14]. Plasmaanalysen wurden zuerst im Rahmen einer externen Kollaboration mit Hilfe des automatisierten photometrischen Analysegeräts Hitachi 717 (Roche, Mannheim, Deutschland) und später dann im GMC Labor unter Verwendung des Analysegerätes Olympus AU400 (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) durchgeführt. Das kleine Blutbild wird unter Verwendung des automatischen Blutanalysegerätes ABC-Vet (Scil, Viernheim, Deutschland) analysiert, und das Differentialblutbild wurde in der Anfangsphase des ENU-Projekts anhand von Blutaussstrichen mikroskopisch beurteilt [16].

Mit diesen und weiteren Untersuchungen ist die klinisch-chemische Untersuchung in der GMC an der systematischen Mausphänotypisierung beteiligt. Für die Bestimmung wichtiger diagnostischer Parameter mit großer Präzision verfügt der Untersuchung über ein breites Spektrum von etablierten labordiagnostischen Methoden [14, 16, 27, 38]. Zu den Tests, die hier im Rahmen des Primärscreens durchgeführt werden, gehören die folgenden Untersuchungen:

- Ein breites Spektrum von klinisch-chemischen und hämatologischen Laborparametern wird bei Mäusen im Alter von 14 und 17 Wochen (sog. „Pipeline 2“) bestimmt.
- Die Bestimmung von klinisch-chemischen Parametern nach Futterentzug über Nacht findet bei 15 Wochen alten Mäusen statt („Pipeline 1“). Hier werden Gesamt-Cholesterin, HDL-Cholesterin, Triglyceride, Glukose, freie Fettsäuren und Glycerin gemessen.
- Zur Abklärung einer gestörten Glukosetoleranz wird in Zusammenarbeit mit dem Metabolismus-Screen ein intraperitoneale Glukosetoleranztest an den Mäusen der Pipeline 1 im Alter von 13 Wochen durchgeführt [37].
- Bei Bedarf einer gründlicheren Phänotypisierung der Mauslinie bietet der klinisch-chemische Screen mehrere sekundäre Untersuchungen an.

- Die Messung zusätzlicher klinisch-chemischer Parameter, die nicht im Primärscreen gemessen werden ist möglich, und unter Verwendung eines Blutgasanalysegerät ABL5 (Radiometer, Willich, Deutschland) können Blutgasmessungen durchgeführt werden [37, 39].
- Die Nierenfunktion wird durch die Untersuchung der Mäuse in individuellen metabolischen Käfigen bei Einzeltieren analysiert. Während des Tests werden Futter- und Wasseraufnahme, sowie die Produktion von Urin und Kot durch regelmäßiges Wiegen kontrolliert. Im Sammelurin werden klinisch-chemische Parameter wie Elektrolyte, Albumin, Harnstoff, Harnsäure, Kreatinin, Glukose, Gesamteiweiß und  $\alpha$ -Amylase gemessen, und die Osmolarität an Hand der Gefrierpunktniedrigung bestimmt [38].

Aufgrund des gesamten Ergebnisbildes ist es möglich, hämatologische Veränderungen, Organschäden sowie Störungen in wichtigen Stoffwechselwegen zu erkennen. Zahlreiche Mausmutanten aus dem Münchener ENU-Mausmutagenese-Projekt und weitere untersuchte Linien wurden im klinisch-chemische Screen erfolgreich charakterisiert [31, 39, 40].

### **2.3. HÄMATOPOESE**

Die Hämatopoese bezeichnet die Bildung der Zellen des Blutes (Blutkörperchen) aus blutzellbildenden Stammzellen.

Die hämatopoetische Ontogenese ist ein komplexer Entwicklungsprozess, währenddessen die Migration von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen (HSCs/Ps) durch die fetale Zirkulation zwischen Dottersack, Aorta-Gonaden-Mesonephros-Region und Plazenta stattfindet [41]. Die ersten hämatopoetischen Zellen sind beim Säugetier intrauterin im Dottersack nachweisbar [42-44]. Nach bestimmten Entwicklungsschritten besiedeln Stammzellen der Hämatopoese die Leber, weniger später den Thymus [45]. Gegen Ende der Schwangerschaft und kurz nach der Geburt migrieren HSCs/Ps in Knochenmark und Milz [43, 46, 47]. Postnatal liegt das gesamte Knochenmark als aktives Mark vor. Beim erwachsenen Organismus ist die Bildung von Blutzellen vor allem im Bereich des platten Knochens und an den Enden der langen Röhrenknochen lokalisiert [48]. Rotes blutbildendes Mark hat einen Anteil von 25-50% des Knochenmarks, davon sind 85% in

Wirbelkörpern, Becken, Rippen, Sternum und Kopf verteilt [49]. Im Alter wird das aktive Knochenmark in den Röhrenknochen in inaktives gelbes Fettmark umgebaut [50].

Wichtigster Bestandteil des hämatopoetischen Gewebes sind die pluripotenten Stammzellen. Hämatopoetische Stammzellen (HSC) sind der gemeinsame Ausgangspunkt zur Erzeugung reifer Zellen aller hämatopoetischen Linien. Von anderen Körperzellen unterscheiden sie sich durch ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und ihre Fähigkeit, sich zu verschiedenen Zelltypen zu differenzieren [51, 52].

Man unterscheidet mindestens zwei Reifegrade von pluripotenten Stammzellen: „*long-term*“ hämatopoetische Stammzellen können zu einer langfristigen Rekonstitution der Hämatopoese führen und „*short-term*“ Zellen können kurzfristig die Hämatopoese aufrechterhalten. Wenn eine „*long-term*“ hämatopoetische Stammzelle den Weg der Differenzierung einschlägt, entwickeln sich nachfolgend zwei multipotente Progenitorzellen aus der Gruppe der „*short-term*“ hämatopoetischen Stammzellen [53].

Die Proliferation von Vorläuferzellen im Knochenmark, sowie die Ausdifferenzierung und Funktion der einzelnen hämatopoetischen Zellreihen werden von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren gesteuert [54].

Diese gehören zur Familie der Zytokine und werden von Zellen des Immunsystems und des Knochenmarkstromas gebildet. Die meisten Wachstumsfaktoren werden in Fibroblasten, T-Lymphozyten, Monozyten und Endothelzellen synthetisiert.

Die verschiedenen Wachstumsfaktoren können nur solche Zellen beeinflussen, die auf ihre Oberfläche einen spezifischen Rezeptor tragen (Abb.2) [53]. Auf Grund ihrer Fähigkeit das Kolonienwachstum von Knochenmarkzellen *in vitro* zu stimulieren, werden die hämatopoetischen Wachstumsfaktoren auch als sog. Koloniestimulierende Faktoren (Colony Stimulating Factor CSF) bezeichnet [54]. Unter der Wirkung von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren entstehen aus den multipotenten Progenitorzellen zwei Hauptlinien: die lymphoide und die myeloische Zellreihe (Abb 3).

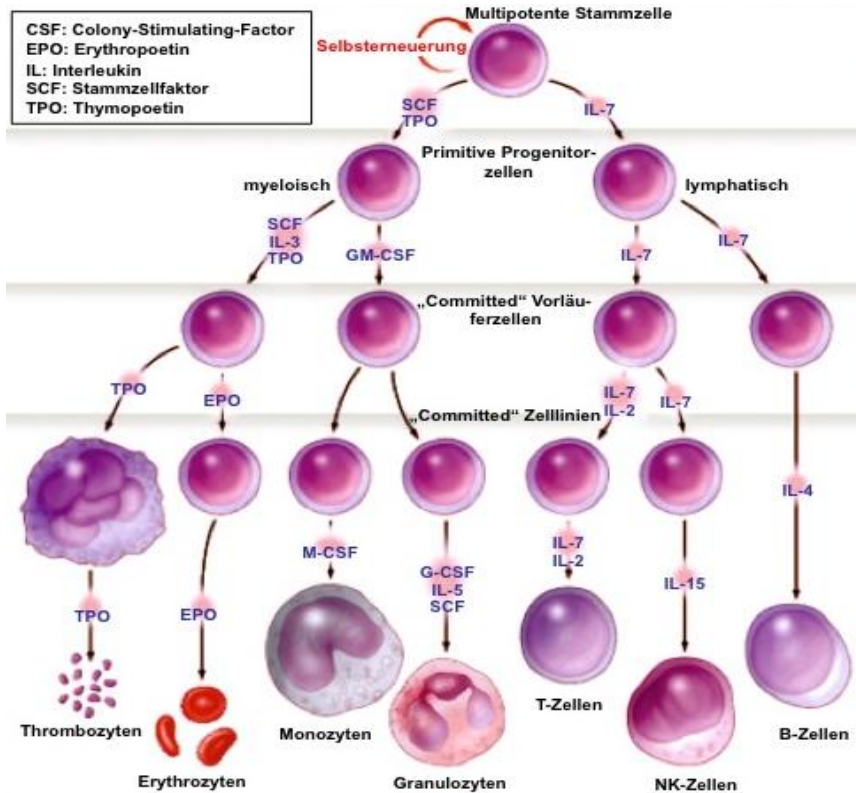


Abbildung 2: Die hämatopoetischen Wachstumsfaktoren.

Die Namen der individuellen Faktoren sind angelehnt an die Bezeichnung der Zielzellen: M-CSF (Makrophagen), G-CSF (Granulozyten), GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen), IL-3 (Interleukin-3, multifunktionaler-CSF), Meg-CSF (Megakaryozyten), TPO = platelet growth factor o. Thrombopoetin, S-CSF (Stammzellfaktor).

Quelle: [http://www.uk-koeln.de/institute/kchemie/Lehre/Vorlesung/B\\_Erythropoese/B\\_text.html](http://www.uk-koeln.de/institute/kchemie/Lehre/Vorlesung/B_Erythropoese/B_text.html)

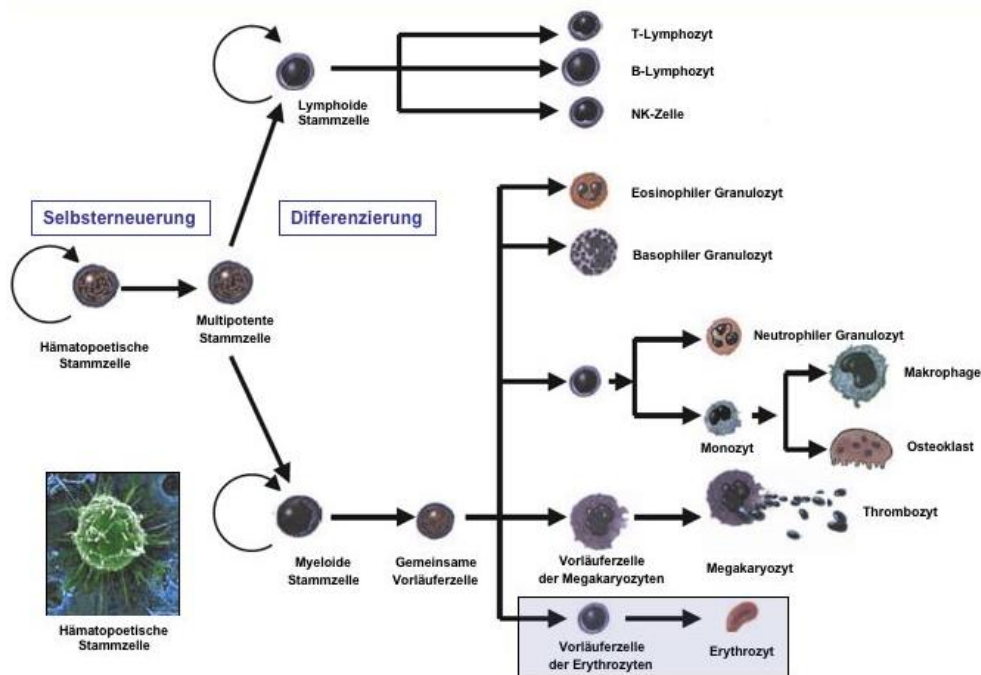


Abbildung 3: Hämatopoese. Entwicklung der einzelnen Blutzellen aus einer pluripotenten Stammzelle.

Quelle: [http://www.uk-koeln.de/institute/kchemie/Lehre/Vorlesung/B\\_Erythropoese/B\\_text.html](http://www.uk-koeln.de/institute/kchemie/Lehre/Vorlesung/B_Erythropoese/B_text.html)

Aus den myeloischen Progenitorzellen entstehen neben den Granulozyten die Monozyten, die sich zu Makrophagen bzw. Osteoklasten weiterentwickeln können, sowie Thrombozyten und Erythrozyten.

Die erste Differenzierungsstufe der Erythropoese sind die Proerythroblasten. Sie differenzieren über die Zwischenstufen Erythroblast und Makroblast zum Normoblast. Während dieser Differenzierung findet der größte Teil der Globin- und der Hämoglobinsynthese statt. Normoblasten sind nicht mehr teilungsfähig, sondern wandeln sich nur unter Ausstoßung des pyknotisch gewordenen Zellkerns und Verlust ihrer Zellorganellen in Retikulozyten um. Auf der Stufe des Retikulozyten gelangt die rote Blutzelle in die Blutbahn. Dort reift sie durch Abbau der restlichen Kernbestandteile und Organellenfragmente zum Erythrozyten [55].

Weitgehend differenzierte Vorläuferzellen der einzelnen Zelllinien bezeichnet man als so genannte Kolonie-bildende Einheiten (CFU, colony forming units), die mit dem Zelltyp entsprechenden Abkürzungen bezeichnet werden z.B. CFU-E (erythropoetische Zellkolonie), oder CFU-GM (Zellkolonie für Granulozyten/Monozyten).

Die frühen Vorstufen der Erythrozyten werden durch Interleukin-9, Interleukin-3, GM-CSF und SCF stimuliert. Späte Stadien, die aufgrund der abweichenden Koloniemorphologie auch als „burst forming units“ (BFU-E) bezeichnet werden, und die CFU-E verfügen über Rezeptoren für den Wachstumsfaktor Erythropoetin (EPO) [56], wodurch sie zur Proliferation, Differenzierung und zur Hämoglobinbildung angeregt werden.

#### **2.4. POLYGLOBULIE (ERYTHROZYTOSEN)**

Polyglobulie (griech. Polys = viel, lat. Globulus = Kügelchen) wird als Synonym für die Begriffe Erythrozytose und Polycythämie gebraucht. Eine Polyglobulie ist als eine Erhöhung des Hämatokrits bzw. des Hämoglobins definiert [57].

Es wird zwischen absoluten und relativen Polyglobulien unterschieden.

Tabelle 3 gibt einen Überblick der bekannten Erythrozytosen des Menschen und des dazu gehörigen EPO-Produktionsgrades.

Tabelle 3: Pathophysiologische Klassifikation von Erythrozytosen [58]

Erythrozytose	EPO-Produktion
<b><i>Absolute Erythrozytose (erhöhte Erythrozytenanzahl)</i></b>	
<b>Genetische Erkrankungen</b>	
• Primäre angeborene Polycythämie (Mutation im <i>Epo-Rezeptor</i> Gen)	Normal bis niedrig
• Tschuwaschien-Polycythämie (Mutation im <i>VHL</i> Gen)	Erhöht
<b>Primäre Knochenmarkstörungen</b>	
• Polycythämia vera	Normal bis niedrig
<b>Sekundäre Erythrozytose mit entsprechend erhöhter EPO-Produktion</b>	
• Verminderte Sauerstoffsättigung (zunehmende Höhe, Lungenerkrankungen, angeborene Herzkrankheiten, Schlafapnoe-Syndrom, Carboxyhämoglobin)	Erhöht
• Verminderte Sauerstoff-Freisetzung aus oxigeniertem Hämoglobin durch hohe Sauerstoffaffinität des Hämoglobins (z.B. bei Bisphosphoglyceratmutase-Mangel)	Erhöht
<b>Sekundäre Erythrozytose mit unangemessen erhöhter EPO-Produktion</b>	
• Lokalisierte Gewebehypoxie (Nierenarterienstenose, Zystennieren)	Erhöht
• Posttransplantations Erythrozytose (Nierentransplantation)	Erhöht
• Akute Hepatitis	Erhöht
• Epo-produzierende Tumoren (Wilms-Tumor, Nierenkarzinom, Zerebelläre Hämangioblastome, Uterusfibromyom, Leberkrebs)	Erhöht
<b><i>Relative Polyglobulie (normale Erythrozytenanzahl)</i></b>	
• Marginale Erythrozytose (Hb > 95 Perzentile)	Normal
• Polycythaemia hypertonica (Gaisböck-Syndrom)	Normal
• Flüssigkeitsverlust	Normal

### 2.4.1. RELATIVE POLYGLOBULIE (PSEUDOPOLYGLOBULIE)

Die relative Polyglobulie (Pseudopolyglobulie) beruht auf einer Verminderung des Plasmavolumens [58]. Die Veränderung des Zell-Plasma-Verhältnisses ist eine Folge der Dehydratation, die zu einer Hypernatriämie führen kann [59]. Zusammen mit der Erhöhung der Natrium-Konzentration im Blutserum steigt die Blutosmolarität an. Als Folge wird den Zellen und dem extrazellulärraum Wasser entzogen. Die häufigsten Ursachen für den Flüssigkeitsverlust sind [60, 61]:

- Diarrhoen, Erbrechen oder Blutungen im Darmtrakt

- Fieber, Verbrennungen der Haut oder zystische Fibrose
- Osmotische Diurese, Diuretika-Therapie, oder Diabetes insipidus.

Bei der Labordiagnostik deutet ein erhöhter Hämatokritwert eine Polyglobulie an, welche jedoch nur vorgetäuscht ist, da in Wirklichkeit ein Flüssigkeitsmangel und damit eine Dehydratation vorliegt.

#### **2.4.2. ABSOLUTE POLYGLOBULIE**

Der absoluten Polyglobulie liegt eine Vermehrung der Erythrozyten zugrunde und sie tritt als Folge einer gesteigerten hormonellen Stimulation der Erythropoese durch einen erhöhten Erythropoietin- oder Cortisol-Spiegel auf. Wegen seiner vorwiegenden Bedeutung in der Hämatopoese zählt das Hormon Erythropoietin (EPO) zu den so genannten „Erythropoese stimulierenden Agenzien“ (ESA). Die Ausschüttung von EPO wird vor allem durch eine Abnahme der Sauerstoffspannung im Nierengewebe stimuliert [62, 63]. Außerdem können die folgenden Ursachen die EPO Sekretion beeinflussen: das Absinken des renalen Blutflusses; Blutverlust (wenn der Hämatokrit nach kompensatorischer Aufnahme von Flüssigkeit absinkt) und ein verringerter arterieller Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ), was in großer Höhe oder bei Lungenfunktionsstörungen eintritt [58, 64].

Auch Herzkrankheiten können als eine Ursache für die Hypoxie in Frage kommen [65]. Eine gesteigerte Erythropoetinkonzentration bei unverändertem  $pO_2$ -Druck findet sich bei Erythropoetin-produzierenden Nierentumoren, Nierenzysten und Pyelitis, sowie der Tschuwaschien-Polycythämie. Eine Ausnahme bilden die andere Formen der genetisch bedingten Polycythämien (primäre angeborene Polycythämie und Polycythämie vera), die mit physiologischem  $pO_2$ -Druck (Sauerstoffpartialdruck) und normaler bis niedriger Erythropoetinkonzentration einhergehen [58, 66].



### **2.4.3. PRIMÄRE POLYGLOBULIEN**

#### **2.4.3.1. TSCHUWASCHIEN-POLYCYTHÄMIE**

Die Tschuwaschien-Polycythämie ist eine autosomal-rezessive Erbkrankheit. Sie wurde endemisch in der Region der Wolga in der Tschuwaschischen Autonomen Republik der Russischen Föderation [67] und später auch in Mitteleuropa entdeckt [68].

Diese besondere Form der erbliche Polycythämie wird durch eine Mutation im Exon 3 des *VHL*-Gens (Von-Hippel-Lindau) verursacht. Das VHL-Protein reguliert in den peritubulären Fibroblasten der Niere den Abbau des Hypoxie-induzierbaren-Faktors (HIF1), der die Sauerstoffspannung in den Nieren anzeigt. Durch eine homozygote Mutation des *VHL*-Gens entsteht ein VHL-Protein mit reduzierter Aktivität. Dies verursacht über einen verminderten Abbau von HIF1 eine vermehrte Erythropoietin-Ausschüttung, was zu einem deutlichen Anstieg des Hämoglobinwertes durch vermehrte Erythrozytenproduktion führt [69, 70]. Bei den Betroffenen treten Thrombosen und Hämorrhagien, sowie Herz-Kreislaufstörungen, pulmonale Hypertonie, Hämangiom und Krampfadern gehäuft auf [71].

#### **2.4.3.2. PRIMÄRE ANGEBORENE POLYCYTHÄMIE**

Die Primäre familiäre und erbliche Polycythämie (PFCP) ist eine autosomal-dominante, proliferative Erkrankung, die durch Erythrozytose und Überempfindlichkeit der erythroiden Vorläuferzellen auf Erythropoietin (Epo) gekennzeichnet ist [72]. Die Erkrankung wird durch eine Mutation im *EpoR* Gen, das den Erythropoietinrezeptor kodiert, verursacht [73]. Eine Polyglobulie wird dann als PFCP diagnostiziert, wenn eine Überempfindlichkeit der erythroiden Vorläuferzellen des Knochenmarks auf Erythropoietin nachweisbar ist. Die Erkrankung verläuft ohne Splenomegalie, bei niedrigem Serum-EPO-Spiegel und die Hämoglobin-Sauerstoffsättigung ist normal [74].

#### **2.4.3.3. POLYCYTHÄMIA VERA**

Die Polycythämia vera ist eine Erkrankung der blutbildenden Zellen im Knochenmark, welche eine erhöhte Produktion von Erythrozyten verursacht [75]. Sie gehört zu der Gruppe der myeloproliferativen Erkrankungen.

Der Begriff „myeloproliferative Erkrankungen“ wurde von dem amerikanischen Hämatologen William Dameshek im Jahr 1951 geprägt. Auf Grund ihrer pathophysiologischen Verwandtschaft fasste Dameshek vier hämatologische Erkrankungen zusammen: Polycythämia vera (PV), die Chronisch Myeloische Leukämie (CML), die Essentielle Thrombozythämie (ET) und die Osteomyelosklerose (OMS) [76].

Die neueste Version der WHO-Klassifikation aus dem Jahr 2008 hat die chronischen myeloproliferativen Erkrankungen in „myeloproliferative Neoplasien“ (MPN) umbenannt. Hierzu gehören neben den vier klassischen MPN (PV, ET, PMF und CML) die chronische Neutrophilenleukämie (CNL), die chronische Eosinophilenleukämie (CEL) und das hypereosinophile Syndrom (HES), die unklassifizierbaren myeloproliferativen Neoplasien sowie die Mastzellerkrankungen (MCD) [77].

Die PV stellt dabei eine klonale Erkrankung einer multipotenten hämatopoetischen Progenitorzelle dar, in deren Folge es zu einer Hyperproliferation der erythrozytären, granulozytären und megakaryozytären hämatopoetischen Zelllinien kommt. Bei der echten Polycythämie liegt eine absolute Erythrozytenvermehrung vor, während die Erythropoetinkonzentration im Serum normal oder subnormal ist [78]. Erythrozytenvorläufer des Knochenmarks von Patienten mit PV proliferieren in vitro spontan ohne Zusatz von Erythropoetin [79]. Im Knochenmark zeigt sich eine starke erythroide Hyperplasie mit normoblastischer Erythropoese. Die unkontrollierte Blutbildung beschränkt sich nicht nur auf das Knochenmark, sondern expandiert in die Milz und später meist auch in die Leber.

Eine erste molekulare Charakterisierung der PV gelang im Jahr 2005 mit der Entdeckung einer *Jak2*-Mutation (*Jak2*-V617F), die in etwa 90% der PV-Patienten nachweisbar ist [80].

Die Inzidenz von PV beträgt 0,5 bis 2 Fälle unter 100 000 Einwohnern. Das durchschnittliche Alter der Patienten bei der Diagnose liegt zwischen 50 und 60 Jahren, bei 5% der Patienten wird die Krankheit vor dem vierzigsten Lebensjahr diagnostiziert. Männer sind etwas häufiger (im Verhältnis 3:2) betroffen als Frauen [81]. Es wurde aber auch über seltene Fälle einer diagnostizierten PV bei Jugendlichen berichtet [82].

Zu den klinischen Symptomen der PV gehören Kopfschmerzen, Schwäche, Gewichtsverlust, Schwitzen und Pruritus. Im peripheren Blut erhöht sich der Hämatokrit und die Blutviskosität nimmt zu. Infolgedessen erhöht sich das Risiko für thromboembolische Komplikationen im gesamten Gefäßsystem, sowie für Lungenembolien, Herzinfarkt und Schlaganfall. Als Folge der erhöhten Dickflüssigkeit des Blutes treten Beschwerden wie Schwindel, Seh- und Hörstörungen sowie Nasenbluten auf. Störungen der Thrombozytenfunktion verursachen Hämorrhagien, sowie Erythromelalgie und Sehstörungen. Die extramedulläre Hämatopoese kann zu einer Splenomegalie und später zu einer Hepatosplenomegalie mit der Gefahr von Organrupturen und intraperitonealen Blutungen führen. Mit der Steigerung des Gesamtvolumens des Bluts ist oft auch der Blutdruck erhöht. Etwa 15% der Patienten leiden an Juckreiz bei Wärme und nach dem Kontakt mit Wasser (Aquagener Pruritus) [79]. Die häufigste Komplikation der PV und die entsprechende Ursachen sind in der Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Komplikationen der PV [70]

<b>Komplikation</b>	<b>Ursache</b>
Thrombose	erhöhter Hämatokrit
Hämorrhagie	Thrombozytenfunktionsstörung
Hepato-/Splenomegalie	erhöhte Zellproduktion oder extramedulläre Hämatopoese
Aquagener Pruritus	Entzündungsmediatoren und/oder erhöhter Hämatokrit
Hyperurikämie, Gicht, Nierensteine	erhöhter Zellumsatz
Erythromelalgie oder Sehstörungen	Thrombozythämie und/oder Thrombozytenfunktionsstörung
Myelofibrose	Reaktion auf den neoplastischen Klon
Akute Leukämie	Iatrogen oder klonale Evolution

#### **2.4.4. MAUSMODELLE FÜR DIE POLYCYTHÄMIE**

Die bisher bekannten Mutationen, die beim Menschen zur Entstehung von Polycythämien führen, dienten als Vorlage zur Etablierung von genetisch modifizierten Mausmodellen. Es wurden mehrere *JAK2-V617F* mutante Mauslinien produziert, wobei die Mäuse mit dieser Mutation einen der

humanen Polycythämia vera ähnlichen Phänotyp entwickeln [83, 84]. Für die Tschuwaschien-Polycythämie mit der Mutation im *VHL* Gen wurden 2 Mauslinien etabliert. Bei einer dieser Linien ist der Phänotyp durch einen erhöhten Hämatokrit und einen erhöhten Erythropoietinspiegel im Serum gekennzeichnet [85]. Die andere Linie entwickelt einen Phänotyp mit pulmonaler Hypertonie und erhöhtem systolischen pulmonalarteriellen Blutdruck [86]. Außerdem wurde ein Mausmodell mit einem Knock-In eines mutanten humanen Erythropoetin-Rezeptor-Gens (*hEPOR*) etabliert [87]. Alle diese Mausmodelle zeigen einen zu den betroffenen menschlichen Patienten vergleichbaren Phänotyp.

#### **2.4.5. DIFFERENZIALDIAGNOSE DER POLYCYTHÄMIA VERA**

Für die Bestätigung des Vorliegens einer Polycythämie vera ist die Suche nach einer Grundursache besonders wichtig. Die Differenzialdiagnostik der Polycythämie besteht vor allem aus [88]:

- Herz- und Kreislaufuntersuchungen um kardiopulmonale Veränderungen festzustellen.
- Nierenuntersuchungen auf Vergrößerungen, Strukturveränderungen und Tumorbildungen, die zu einer Überproduktion von Erythropoietin führen können.
- Untersuchung auf systemische Hypoxie, die durch Lungenerkrankungen verursacht werden kann.
- morphologische Blutuntersuchungen, der Bestimmung der absoluten Retikulozytenzahl, sowie der arteriellen und venösen Blutgasanalyse (Sauerstoffpartialdruck) und der Blutvolumenbestimmung.
- Knochenmarkhistologie zum Nachweis einer gesteigerten Megakaryopoese im Knochenmark.

#### **2.5. MESENCHYMALE TUMOREN DES GASTROINTESTINALTRAKTS**

Mesenchymale Tumoren sind relativ selten; dabei handelt es sich überwiegend um Gastrointestinale Stromatumoren (GIST) [89]. Die Differentialdiagnostik von mesenchymalen Darmtumoren besteht aus immunhistochemischen Untersuchungen auf Anfärbbarkeit mit einem Kit-spezifischen Antikörper.

Zu den Kit-negativen Tumoren des Gastrointestinaltrakts gehören die Leiomyome, der häufigsten benignen Tumorart unter den nicht zur GIST gehörigen Gastrointestinaltumoren. Diese werden meistens im 5.–6. Lebensjahrzehnt diagnostiziert und befinden sich im oberen Gastrointestinaltrakt, im Rektum und am häufigsten im Bereich des Jejunums [90].

Weitere Tumoren sind die Lipome. Sie entstehen im gesamten Magen-Darm-Trakt, häufig auch im Kolon. Histologisch bestehen sie aus reifem Fettgewebe in der Submukosa [91]. Weitere seltene mesenchymale Tumoren des Gastrointestinaltrakts sind Hämangiome, Granularzelltumoren, Kaposi-Sarkome und Neurinome. Diese sind meist mit AIDS assoziiert [90].

### **2.5.1. GASTROINTESTINALE STROMATUMOREN**

Gastrointestinale Stromatumoren (GIST) sind die häufigsten mesenchymalen Tumoren des Gastrointestinaltraktes [92, 93].

Bis zu den späten 90-er Jahren des vergangenen Jahrhunderts wurden die GIST den glattmuskulären Tumoren zugerechnet und meist als Leiomyome, Leiomyosarkome, Neurofibrome, Schwannome oder als „nicht klassifizierbare Tumoren“ fehldiagnostiziert [94]. 1998 wurde die Expression des Kit Rezeptors an gastrointestinalen Stromatumoren nachgewiesen. Die positive Anfärbarkeit mit anti-CD117(kit) Antikörpern machte es möglich GIST in über 90% der Fälle immunohistochemisch zu identifizieren und von den oben genannten verwandten Tumoren abzugrenzen [95].

Rund 60–70% der Tumoren sind auch für das hämatopoetische Vorläuferzellantigen CD34 positiv [96, 97]. Aufgrund dieser Befunde wurde GIST als eigenständige Tumorart neu definiert und von den glattmuskulären Neoplasien und auch den Tumoren des peripheren Nervensystems abgegrenzt [97, 98].

Die GIST stammen von sogenannten Schrittmacherzellen - den interstitiellen Zellen von Cajal (ICC) - ab [99]. Die erste Beschreibung der ICC von 1893 stammt von dem spanischen Neuroanatomen Santiago Ramon y Cajal. Die Cajal Zellen befinden sich im Plexus myentericus und sind zwischen dem Enterischen Nervensystem und der Darmmuskulatur integriert [100]. Die ICC übernehmen die Vermittlungsfunktion zwischen den autonomen Nerven und

den glatten Muskelzellen des Gastrointestinaltrakts. Dadurch werden die sogenannten „slow waves“ der Darmperistaltik generiert [101]. Die GIST sind zum größten Teil im Magen (60-70%), und zu ca. 20 bis 30 % im Dünndarm und ca. 5% im Anorektum lokalisiert. Seltener haben sie ihren Ursprung im Ösophagus oder im Kolon [102, 103]. Betroffen sind hauptsächlich Patienten der 6. und 7. Lebensdekade und nur 10% aller Betroffenen sind unter 40 Jahren alt [92]. Bei Männern treten diese Tumoren etwas häufiger auf, als bei Frauen. Die Inzidenzraten in verschiedenen Studien werden mit 15 Millionen Fällen pro Jahr angegeben. Deutschlandweit werden ca. 500 bis 1500 Neuerkrankungen pro Jahr gezählt [104].

Bei der Differentialdiagnose müssen GIST histomorphologisch von einer Reihe anderer mesenchymaler Tumoren abgegrenzt werden. Diese umfassen insbesondere Leiomyome und Leiomyosarkome, Schwannome und maligne periphere Nervenscheidentumoren, inflammatorische myofibroblastische Tumoren bzw. inflammatorische Fibrosarkome, inflammatorische fibroide Polypen und Fibromatosen/Desmoidtumoren, gelegentlich aber auch sklerosierende und dedifferenzierte Liposarkome und abdominale solitäre fibröse Tumoren [96, 103]. Mehr als 90% aller GIST Fälle haben spezifische Mutationen in Genen der Rezeptor-Tyrosinkinasen *Kit* oder *Pdgfra* (Platelet-derived Growth Factor Receptor- $\alpha$ ) [105]. Im Onkogen *Kit* sind Mutationen in Exon 11 (juxtamembranöse Domäne, 66 % von allen Fällen), gefolgt von Mutationen in Exon 9 (extrazelluläre Domäne, 13%), im Exon 13 (Kinase-Domäne I, 1,2%) und Exon 17 (Kinase-Domäne II, 0,6%) nachweisbar. Im Gen *Pdgfra* wurden Mutationen in Exon 18 (Kinase-Domäne II, 5,6%), in Exon 12 (juxtamembranöse Domäne, 1,5%) und in Exon 14 (Kinase-Domäne I, <0,5%) lokalisiert. Die restlichen GISTs, die weder eine *Kit*- noch eine *Pdgfra*-Mutation aufweisen, werden als so genannte „wild-type GISTs“ klassifiziert [106-111].

### 2.5.2. MAUSMODELLE FÜR GIST

Verschiedene genetisch modifizierte Mausmodelle werden für die GIST Erkrankung mit verschiedenen ursächlichen Mutationen in *Kit* etabliert [112-115]. Bei keiner der untersuchten Mauslinien wurden Polycythämie oder Megakolon beschrieben.

## 2.6. MEGAKOLON

Unter Megakolon versteht man eine mit chronische Verstopfung einhergehende Dilatation des Dickdarms [116]. Man unterscheidet die primäre und die sekundäre Form des Megakolons.

Das kongenitale Megakolon (oder Hirschsprung-Krankheit) ist eine angeborene Krankheit und wird durch den Mangel an Ganglienzellen („Aganglionose“) im Bereich des Plexus submucosus bzw. myentricus (Auerbach-Plexus) verursacht. Dies führt zu einer Hyperplasie der vorgeschalteten Nervenzellen und fällt durch chronische Verstopfung auf [117].

Dem sekundären Megakolon liegt eine symptomatische Dilatation des Kolon infolge eines distalen stenosierenden Prozesses zugrunde. Es kommt hierbei zu einer Arbeitshypertrophie der Darmwandmuskulatur sowie einer mäßig starken Aktivierung der Enzymaktivitäten in den Ganglienzellen der Darmwand [116]. Als ursächliche Krankheiten können Chagas-Krankheit und ulcerative Kolitis (colitis ulcerosa) auftreten [118].

Das toxische Megakolon ist als akute Dilatation des Kolons durch entzündliche Infiltration und tiefreichende Destruktion bis in die Muskelschichten definiert und kann bei jeder primären und sekundären bakteriellen Kolitis auftreten [118]. Für verschiedene Krankheiten, die mit Störungen der Darmperistaltik einhergehen, wurden bereits mehrere mutanten Mausmodelle etabliert [119-122]. Jedoch ist anzumerken, dass bei keinem dieser Mausmodelle die Entstehung einer Ceacumdilatation beschrieben wurde.

### 3. MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1. VERSUCHSTIERE UND HALTUNGSBEDINGUNGEN

Die dominant mutante Mauslinie MVD013 wurde im Rahmen des Münchener ENU-Maus-Mutagenese-Projekts etabliert und stammt aus der Versuchstierzucht und -haltung des ENU-Screens im Helmholtz Zentrum München. Die Erhaltungszucht der Linie MVD013 fand auf dem genetischen Hintergrund des Mausinzuchtstammes C3HeB/FeJ (C3H) statt. Nach Etablierung der Linie und Zucht über 6 Generationen wurde die Linie durch Kryokonservierung von Spermata mutanter Männchen gesichert und aus der Zucht genommen. Für die weiterführende Charakterisierung wurde die Linie über In-vitro-Fertilisation wiederbelebt und in die Mauslinik verbracht. Die untersuchten Tiere stammten aus der 11. Rückkreuzungsgeneration auf C3H-Wildtypiere (Primärscreen) und einer nachfolgenden weiteren Rückkreuzung auf Wildtypiere beziehungsweise Inzucht von heterozygoten Mutanten.

Die Haltung der untersuchten Tiere erfolgte in der Deutschen Mauslinik (German Mouse Clinic, GMC). Alle Tiere wurden in einem Tierraum unter standardisierten Bedingungen bei einer konstanter Umgebungstemperatur ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ) und Luftfeuchtigkeit ( $50 \pm 10\%$ ) gehalten. Die Austauschrate der Umgebungsluft lag bei 20 Litern pro Stunde. Die Tierhaltungsräume wurden künstlich beleuchtet. Die Dunkelphase dauerte 12 Stunden, die Tagphase begann um 6 Uhr und endete um 18 Uhr ohne Dämmerungsimitation. Alle Tiere wurden in IVC-Racks (Isolated Ventilated Cages, Venti-Racks<sup>TM</sup>, BioZone, Margate, UK) in Makrolonkäfigen des Typs II (Breite 17 cm  $\times$  Tiefe 23 cm  $\times$  Höhe 13,5 cm) in Gruppengrößen von 1-4 Tieren auf Labortiereinstreu (Faser, Größe  $\frac{3}{4}$  S, Rettenmaier & Söhne, Rosenberg, Deutschland) mit freiem Zugang zu pathogenfreiem Futter (Typ 1314, Altromin, Lage, Deutschland) und Wasser gehalten.

Alle untersuchten Tiere der Linie MVD013 wurden in der Deutsche Mauslinik gezüchtet. Die Nachkommen blieben bis zum Alter von 21 Tagen im Elternkäfig, danach wurden die Tiere nach Geschlechtern getrennt abgesetzt. Der Nachwuchs wurde unter Verwendung einer Ohrlochzange mit Zahlen von 1 bis 99 markiert.



Alle Mäuse wurden entsprechend den FELASA Richtlinien gehalten. Der SPF-Hygiestatus (spezifiziert pathogenfrei) der Richtlinien der FELASA wurde eingehalten [123]. Alle durchgeführten Tierversuche fanden mit Genehmigung und unter Aufsicht der Regierung von Oberbayern statt.

### **3.2. ANALYSE DER LEBENSFÄHIGKEIT DER HOMOZYGOT MUTANTEN TIERE**

Um die Lebensfähigkeit der homozygot mutanten Tiere zu prüfen, wurde die Nachkommenschaft von 20 Anpaarungen von heterozygot mutanten Tieren im Alter von 8 bis 12 Wochen analysiert. Die Ergebnisse basieren auf der Phänotypisierung von 62 Würfen anhand des Blutbilds.

### **3.3. KÖRPERGEWICHTSENTWICKLUNG**

Das Körpergewicht der Mäuse wurde mit Hilfe einer Präzisionswaage 440-33 (Kern, Murnau-Westried, Deutschland) auf 0.1 g genau gemessen. Das Körpergewicht der abgesetzten Mäuse wurde vom 21. Lebenstag an wöchentlich bis zum Alter von 15 Lebenswochen protokolliert.

### **3.4. PHÄNOTYPISIERUNG DER MUTANTEN MAUSLINIE MVD013 IM GMC PRIMÄRSCREEN**

Die mutante Mauslinie MVD013 wurde im Jahr 2008 im Primärscreen der GMC phänotypisiert. An 80 Mäusen (aufgeteilt auf 2 Kohorten mit jeweils 10 Tieren pro Gruppe und Geschlecht) wurden die Untersuchungen des in Abbildung 5 dargestellten Workflows durchgeführt. Als Gruppen wurden phänotypisch heterozygot mutante Tiere mit Wildtyp-Wurfgeschwistern als Kontrollen verglichen. Da die ursächliche Mutation in der Linie MVD013 zu Beginn der Untersuchungen in der GMC noch nicht bekannt war, wurde das Blutbild von Nachkommen aus Anpaarungen von phänotypisch heterozygoten Tieren mit Wildtyptieren analysiert, um diese den Gruppen der heterozygot Mutanten oder der Wildtyptiere zuzuordnen. Zur heterozygot mutanten Gruppe wurden Tiere mit einem MCV niedriger als 49 fl, Hämatokrit höher als 50%, Hämoglobin höher als 15 g/dl und einer Erythrozytenzahl von mehr als 11 Mio/ $\mu$ l zugeordnet. Wildtyptiere hingegen waren durch einen MCV größer als

50 fl, Hämatokrit niedriger als 48%, Hämoglobin niedriger als 15 g/dl und einer Erythrozytenzahl von weniger als 10 Mio/ $\mu$ l charakterisiert. Die Tiere, die bei der einmaligen Blutentnahme keine eindeutigen Ergebnisse aufwiesen, wurden von der Untersuchung ausgeschlossen. Aufgrund der vorhergehenden Phänotypisierung der Tiere wurde der Primärscreen, entgegen dem sonst üblichen Verfahren, sie erst im Alter von 14 Wochen gestartet.

In der folgenden Arbeit werden nur die für die Phänotypisierung der Mauslinie MVD013 relevanten Ergebnisse des Primärscreen und die dafür eingesetzten Methoden dargestellt. Der detaillierte Ablauf des Primärscreens in der Deutsche Mauslinik ist in der Literatur [19, 20, 23, 37, 38] ausführlich beschrieben.

		Age [weeks]	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Pipeline 1	<b>Screens</b>	<b>Methods</b>											
	Dysmorphology	anatomical observation											
		DEXA, X-ray											
	Cardiovascular	blood pressure											
	Energy Metabolism	indirect calorimetry											
	Clinical Chemistry	simplified IpGTT											
		blood lipid values (fasted mice)											
	Eye	eye size (LIB)											
	Lung Function	whole body plethysmography											
	Molecular Phenotyping	expression profiling											
Pipeline 2	Behaviour	open field											
		acoustic startle & PPI											
	Neurology	modified SHIRPA, grip strength, rotarod											
	Nociception	hot plate											
	Eye	ophthalmoscopy & slit lamp											
	Clinical Chemistry	clinical-chemical analysis, hematology											
	Immunology, Allergy	FACS analysis of PBCs, Ig conc.											
	Steroid Metabolism	DHEA, testosterone											
	Cardiovascular	ANP, ECG or Echo											
	Pathology	macro & microscopic analysis											

Abbildung 4: Detaillierter Zeitablauf des Primärscreens.

Die erste Untersuchung der Mäuse beginnt im Alter von 9 Wochen. Bis zur 18 Lebenswoche, werden in zwei Pipelines jeweils 40 Tieren (je 10 männliche und weibliche Mutanten und Wildtypiere) in verschiedenen Screens analysiert. Im Anschluss wird die detaillierte pathologische Untersuchung durchgeführt. Die schraffierten Felder zeigen die blutbasierte Analysen an.

### 3.4.1. ENTNAHME UND UNTERSUCHUNG VON BLUTPROBEN

Für die klinisch-chemischen und hämatologischen Untersuchungen wurden den Mäusen unter Isofluran-Inhalationsnarkose Blut entnommen. Mit Hilfe einer Glaskapillare ( $\varnothing$  0.8 mm) wurde der retroorbitale Venenplexus punktiert. Die Kapillare wurde im medialen Augenwinkel eingeführt, leicht nach unten geneigt und in den retrobulbären Venenplexus vorgeschoben [124].

In Rahmen des GMC Primärscreens wurden von den Tieren der Pipeline 2 maximal 500  $\mu$ l Blut in einem mit Lithium-Heparin beschichteten Probengefäß gesammelt, ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zentrifugiert (8000 $\times$ g, 10 min, +8°C). Eine Menge von 130  $\mu$ l des abpipettierten Plasmas wurde für die Messung der klinisch-chemischen Parameter verwendet. Das restliche Plasma wurde für die anderen blutbasierenden Untersuchungen aufgeteilt und die Leukozytenfraktion der Blutzellen per FACS analysiert.

Für die Bestimmung der klinisch-chemischen Parameter von Mäusen nach Futterentzug über Nacht wurde das Blut der Tiere in Pipeline 1 in eisgekühlte Lithium-Heparin beschichtete Probengefäße gesammelt und während der Inkubation für max. 1 Stunde in einem Probenhalter aus Kunststoff auf Eis platziert. Anschließend wurde das Plasma gleich nach dem Zentrifugieren sofort analysiert.

Für die Bestimmung der Blutbildparameter wurden etwa 50  $\mu$ l Blut in einem EDTA beschichteten Probengefäß aufgefangen und innerhalb von 2 Stunden gemessen. Die Proben wurden vor der Analyse mit Hilfe eines Über-Kopf-Mischers (Grant Scientific, NJ, USA) ständig in Bewegung gehalten.

---

#### Geräte und Verbrauchsmaterialien

Isofluran Inhalationsgerät	InterMed Penlon Sigma Delta, Abingdon, Großbritannien
Isofluran CP	CP-Pharma, Burgdorf, Deutschland
Glaskapillaren	NeoLab, Heidelberg, Deutschland
ETDA-Röhrchen	KABE Labortechnik, Nümbrecht-Elsenroth, Deutschland
Lithium-Heparin Röhrchen	KABE Labortechnik, Nümbrecht-Elsenroth, Deutschland
Zentrifuge, Biofuge Fresco	Heraeus, Hanau, Deutschland
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Multi-function rotator Grant Bio	Grant Scientific, NJ, USA
Schüttelgerät, Vortex Genie®	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

---

### 3.4.2. BESTIMMUNG DER BLUTBILDPARAMETER

#### 3.4.2.1. AUTOMATISCHES BLUTANALYSEGERÄT ABC-VET

Die Untersuchungen des kleinen Blutbildes wurden in Rahmen des GMC Primärscreens mit Hilfe eines automatischen Blutanalysegerätes ABC-Vet (Animal-Blood-Counter, Scil animal care company, Viernheim Deutschland) durchgeführt. Dabei wurde eine Chipkarte verwendet, die für das Blut von Labormäusen kalibriert und unter der Nummer E0510061402 registriert ist. Das Messprinzip basiert auf Impedanzmessung und Spektralphotometrie. Es wurden 12 µl EDTA-Vollblut verwendet. Es wird der Hämoglobingehalt des hämolysierten Blutes photometrisch gemessen. Der Hämatokrit (HCT) wurde aus dem mittleren Zellvolumen der Erythrozyten (MCV) und der Erythrozytenzahl (RBC) errechnet. Mittleres korpuskuläres Hämoglobin (MCH) und mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC) wurden nach den Formeln  $HGB/RBC$  und  $HGB/HCT$  errechnet. Es wurden die folgenden hämatologischen Parameter bestimmt:

<b>Blutbildparameter</b>		<b>Einheiten</b>
Leukozyten gesamt	WBC	1000/µl
Erythrozyten gesamt	RBC	Mio/µl
Hämatokrit	HCT	%
Hämoglobin	HGB	g/dl
Mittleres Zellvolumen	MCV	fl
Mittleres korpuskuläres Hämoglobin	MCH	mmol/l
Mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration	MCHC	g/dl
Erythrozytenverteilungsbreite	RDW	%
Durchschnittliches Thrombozytenvolumen	MPV	fl

#### 3.4.2.2. AUTOMATISCHES BLUTANALYSEGERÄT SYSMEX XT-2000iV

Das Differentialblutbild und die Zählung und Differenzierung der Reifestufen der Retikulozyten erfolgte mit Hilfe des automatischen Blutanalysegerätes Sysmex XT-2000iV (Sysmex, Norderstedt, Deutschland). Hierzu wurde eine

zusätzliche Kohorte von Mäusen verwendet, die im Rahmen des Sekundärscreens weitergehend charakterisiert wurde.

Die Messungen werden unter Verwendung einer Fluoreszenz-Durchflusszytometrie-Methode in Kombination mit der bewährten Mehrkanalmesstechnologie ermöglicht.

Für die Blutzellanalytik wurden 85 µl EDTA-Vollblut gebraucht. Es wurden die folgenden zusätzlichen hämatologischen Parameter (absolute Anzahl und prozentualer Anteil an der Gesamtleukozyten- bzw. Erythrozytenzahl) bestimmt:

Lymphozyten		LYMPH
Monozyten		MONO
Granulozyten:	Neutrophile Granulozyten	NEUT
	Eosinophile Granulozyten	EO
	Basophile Granulozyten	BASO
Retikulozyten:	Gesamt-Retikulozytenzahl	RET
	Reife Retikulozyten	LFR
	Mittelreife Retikulozyten	MFR
	Unreife Retikulozyten	HFR

### 3.4.3. BESTIMMUNG DER OSMOTISCHEN RESISTENZ DER ERYTHROZYTEN

Die Bestimmung der osmotischen Resistenz der Erythrozyten wurde im Universitätsklinikum Freiburg durch das Team des Zentrums für Klinische Forschung von Prof. Dr. Heike Pahl analysiert.

Für die Bestimmung der osmotischen Fragilität wurden die folgenden Schritte durchgeführt: 12,5µl Vollblut wurde in ein Licium-Heparin beschichtetes Röhrchen (Microvette CB300, Sarstedt) gegeben, mit 100µl NaCl unterschiedlicher Konzentrationen durch vorsichtiges auf- und abpipettieren gemischt und bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Daraufhin wurden die Proben für 15 sec zentrifugiert und anschließend die Extinktion des Überstands bei 540 nm in einem Photometer (Spectramax plus, Molecular Devices) gemessen.

#### **3.4.4. IMMUNOLOGISCHE PHÄNOTYPISIERUNG VON PERIPHEREM BLUT**

In Rahmen des GMC Primärscreens wurde von den Mitarbeitern des Immunologie-Screens die immunologische Phänotypisierung von peripherem Blut der Mauslinie MVD013 durchgeführt.

Die Konzentrationsmessung der Immunglobuline (IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 und IgA) im Plasma erfolgte unter Verwendung eines Bioplex Bead Arrays (MRC Harwell, Oxfordshire, England). Der Rheumafaktor und anti-DNA Antikörper wurden mit Hilfe eines indirekten ELISA (Sunrise, TECAN Schweiz) bestimmt. Leukozytensubpopulationen wurden mit fluoreszenzkonjugierten Antikörpern gefärbt und mittels Durchflusszytometrie (BD LSR II, BD Biosciences, San Jose, USA) quantifiziert.

Die folgenden Zelloberflächenmarker (Cluster of differentiation, CD) sind im Screening für immunologische Parameter enthalten: CD3, CD4, CD8, CD19, CD25, B220, CD5, IgD, CD11b, Gr-1, MHC-Klasse II, Ly6C, CD44, CD62L. Der detaillierte Ablauf des Tests wurde von Helmut Fuchs et al. (2010) beschrieben [38].

Die Analyse und graphische Darstellung der Anteile verschiedener Zelltypen wurden mit Hilfe der Software SPICE 5.1 (BCBB, MD, USA) erarbeitet [125].

#### **3.4.5. KLINISCHE CHEMIE**

Für die Klinische Chemie wurde das automatische Analysegerät Olympus AU400 benutzt. Mit Hilfe des Geräts wurden Elektrolytkonzentrationen, Enzymaktivitäten, sowie Konzentrationen von Substraten und Proteinen im Plasma bestimmt (Tabelle 5-7). Für die Messung von 22 Parametern nach der ersten Blutentnahme in Pipeline 2 des GMC Primärscreens im Alter von 20 Wochen wurden 130 µl Plasma 1:2 mit deionisiertem Wasser verdünnt und analysiert. Für die Messung von 12 Parametern nach einer zweiten Blutentnahme in Alter von 25 Wochen wurde unverdünntes Plasma verwendet. Die Blutentnahme von Mäusen nach Futterentzug über Nacht fand im Alter von 21 Wochen in Pipeline 1 (zweite Kohorte) statt. Das Plasma wurde unverdünnt analysiert.

Tabelle 5: Liste der mit dem Analysegerät Olympus AU400 erfassten klinisch-chemischen Parameter (erste Blutentnahme)

<b>Parameter</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Einheit</b>	<b>Testprinzip</b>
Natrium (Na)	ISE Standart 66313	mmol/L	I.S.E. indirekte Potentiometrie
Kalium (K)	ISE Standart 66313	mmol/L	I.S.E. indirekte Potentiometrie
Kalzium (Ca)	OSR60117	mmol/L	Photometrischer Farbtest
Chlorid (Cl)	ISE Standart 66313	mmol/L	I.S.E. indirekte Potentiometrie
Anorganisches Phosphat (P)	OSR6122	mmol/L	Photometrischer UV-Test
$\alpha$ -Amylase (AMY)	OSR6106	U/L	Kinetischer Farbtest
Alanin-Aminotransferase (ALT)	OSR6107	U/L	Kinetischer UV-Test
Aspartat-Aminotransferase (AST)	OSR6109	U/L	Kinetischer UV-Test
Alkalische Phosphatase (APL)	OSR6004	U/L	Kinetischer Farbtest
Transferrin	OSR6152	g/L	Immunturbidimetrischer Test
Triglyceride (TGL)	OSR61118	mmol/L	Enzymatischer Farbtest
Glukose (GLS)	OSR6121	mmol/L	Enzymatischer UV-Test
Gesamteiweiß (TP)	OSR6132	g/L	Photometrischer Farbtest
Ferritin	OSR61203	$\mu$ g/L	Immunturbidimetrischer Test
Harnstoff (HST)	OSR6134	mmol/L	Kinetischer UV-Test
Laktat-Dehydrogenase (LDH)	OSR6128	U/L	Kinetischer UV-Test
Lactat	OSR6193	mmol/L	Enzymatischer Farbtest
Eisen	OSR6186	$\mu$ mol/L	Photometrischer Farbtest
Kreatinin (enzymatisch)	OSR61204	$\mu$ mol/L	Enzymatischer Test
Cholesterol	OSR6116	mmol/L	Enzymatischer Farbtest
Albumin	OSR6102	g/L	Photometrischer Farbtest
Freie Fettsäuren (NEFA)	999-34691 (Wako)	mEq/L	Enzymatischer Farbtest

Tabelle 6: Liste der mit dem Analysegerät Olympus AU400 gemessenen Plasmaparameter von Mäusen nach Futterentzug über Nacht.

<b>Parameter</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Einheit</b>	<b>Testprinzip</b>
Cholesterol	OSR6116	mmol/L	Enzymatischer Farbtest
Triglyceride (TGL)	OSR61118	mmol/L	Enzymatischer Farbtest
Freie Fettsäuren (NEFA)	999-34691 Waco	mEq/L	Enzymatischer Farbtest
Glukose (GLS)	OSR6121	mmol/L	Enzymatischer UV-Test

Tabelle 7: Liste der mit dem Analysegerät Olympus 400 erfassten klinisch-chemischen Parameter (zweite Blutentnahme)

<b>Parameter</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Einheit</b>	<b>Testprinzip</b>
Natrium (Na)	ISE Standart 66313	mmol/L	I.S.E. indirekte Potentiometrie
Kalium (K)	ISE Standart 66313	mmol/L	I.S.E. indirekte Potentiometrie
Chlorid (Cl)	ISE Standart 66313	mmol/L	I.S.E. indirekte Potentiometrie
Gesamteiweiß (TP)	OSR6132	g/L	Photometrischer Farbtest
Triglyceride (TGL)	OSR61118	mmol/L	Enzymatischer Farbtest
Aspartat-Aminotransferase (ASAT)	OSR6109	U/L	Kinetischer UV-Test
Ferritin	OSR61203	µg/L	Immunturbidimetrischer Test
Transferrin	OSR6152	g/L	Immunturbidimetrischer Test
Eisen	OSR6186	µmol/L	Photometrischer Farbtest
UIBC	OSR61205	µmol/L	Photometrischer Farbtest
Albumin	OSR6102	g/L	Photometrischer Farbtest
Kreatinin (enzymatisch)	OSR61204	µmol/L	Enzymatischer Test

### 3.4.6. INTRAPERITONEALER GLUKOSE TOLERANZ TEST

Für den intraperitonealen Glukose Toleranz Test im Alter von 18 Wochen wurde den Mäusen in Pipeline 1 des GMC Primärscreens für 16 Stunden über Nacht das Futter entzogen. Das Körpergewicht wurde vor und nach dem Futterentzug gemessen. Für die Bestimmung der basalen Glukosekonzentration wurde Blut aus der Schwanzspitze gewonnen und mit dem Accu-Chek Blutzuckermesser (Roche, Mannheim, Deutschland) analysiert. Anschließend wurde sterile 20% Glucoselösung intraperitoneal injiziert. Die Dosis wurde so gewählt, dass 2 g Glukose pro Kilogramm Körpergewicht, bezogen auf das Gewicht der nüchternen Tiere zu Beginn des Tests, verabreicht wurde. Im Zeitabstand von 15, 30, 60 und 120 Minuten nach der Glucoseinjektion wurde die Glucosekonzentration in Blutstropfen, die von der gleichen Wunde entnommen wurden, erneut gemessen. Nach dem Experiment wurden die Tiere wieder in Käfige mit Wasser und Futter zurückgesetzt.



<b>Geräte und Verbrauchsmaterialien</b>	
Blutzuckermesssystem Accu-Chek Aviva	Roche, Mannheim, Deutschland
Accu-Chek Aviva Teststreifen (Kalibrierung: kapillares Vollblut)	Roche, Mannheim, Deutschland
Sterile Glucose-Lösung 20%	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Insulin Spritzen	Terumo Medical, Somerset, NJ, USA
Kanüle 0,45 × 12 mm	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Waage 440-33	Kern, Murnau-Westried, Deutschland

### **3.5. BLUTGASANALYSE**

Die Blutgasparametermessung erfolgte bei Tieren der Sekundärscreenkohorte unter Verwendung eines Blutgasanalysegerätes ABL5 (Radiometer, Willich, Deutschland). Eine Gruppe wurde im Alter von 4 Monaten und eine zweite Gruppe im Alter zwischen 13 und 15 Monaten analysiert. Das Blut wurde nach der in Punkt 3.2.1. beschriebenen Methode entnommen und in eine heparinisierte 85 µl Blutgaskapillare gesammelt. Die Messungen von pH, pO<sub>2</sub> und pCO<sub>2</sub> wurde sofort nach der Blutentnahme durchgeführt. Weitere Parameter wie die O<sub>2</sub> Sättigung, die Hydrogencarbonat-Konzentration (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) und die aktuelle Basenabweichung (ABE) wurden automatisch berechnet.

<b>Geräte und Verbrauchsmaterialien</b>	
Blutgasanalysegerät ABL5	Radiometer, Willich, Deutschland
Blutgaskapillaren 85 µl	KABE Labortechnik, Nümbrecht-Elsenroth, Deutschland

### **3.6. BESTIMMUNG DER ERYTHROPOETINKONZENTRATION**

Die Erythropoetin (EPO)-Konzentration im Serum der Tiere der Sekundärscreen-Kohorte wurde in der Deutschen Mauslinik in Zusammenarbeit mit dem Allergologie Screen mittels eines EPO Testkits gemessen (Quantikine®, Mouse/Rat Epo Immunoassay Kit, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Für den Test wurde Blutplasma verwendet. Das Blut wurde nach der in Punkt 3.4.1. beschriebenen Methode entnommen und in Lithium-Heparin beschichtete Röhrchen gesammelt. Die Proben wurden innerhalb von 30 min nach der Entnahme abzentrifugiert (1000×g, 20 min) und

das Plasma sofort entsprechend dem Kit Protokoll bearbeitet: Das Testprinzip basiert auf der Sandwich-ELISA-Technik. Das Kit enthält Microtiterplatten, deren Wells mit für Maus- und Ratten-EPO spezifischen monoklonalen Antikörpern beschichtet sind. Die Analyse wurde entsprechend den Vorgaben des Herstellers durchgeführt:

- 1) Beschickung der Platte mit je 50  $\mu\text{l}$  Assay Diluent pro Vertiefung, um unspezifischen Bindungen von Proteinen vorzubeugen.
- 2) Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  Standard (3000 – 47 pg/ml), Kontrolle oder Probe in je zwei Vertiefungen als Doppelbestimmung. Die Herstellung der eingesetzten Verdünnungen der Standardlösung ist in Abbildung 6 dargestellt.
- 3) Inkubation der abgedeckten Platte für 2 Stunden bei Raumtemperatur.
- 4) Viermaliges Waschen der Platte mit je 400  $\mu\text{l}$  Waschpuffer pro Vertiefung.
- 5) Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  Epo-Konjugat pro Vertiefung.
- 6) Zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln.
- 7) Viermaliges Waschen der Platte mit je 400  $\mu\text{l}$  Waschpuffer pro Vertiefung.
- 8) Zugabe von je 100  $\mu\text{l}$  Substrat-Lösung (enthält Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin (TMB)). Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln.
- 9) Zugabe von je 100  $\mu\text{l}$  Stopplösung (HCl).

Anschließend wurden die Extinktion der Proben bei 450 nm und 540 nm mit Hilfe des ELISA-Readers (Sunrise, TECAN Schweiz) gemessen. Die Erythropoetinkonzentration wurde anhand der Extinktion der Standards errechnet. Die Werte der gemessenen Proben lagen innerhalb des linearen Bereichs der Standardkurve.

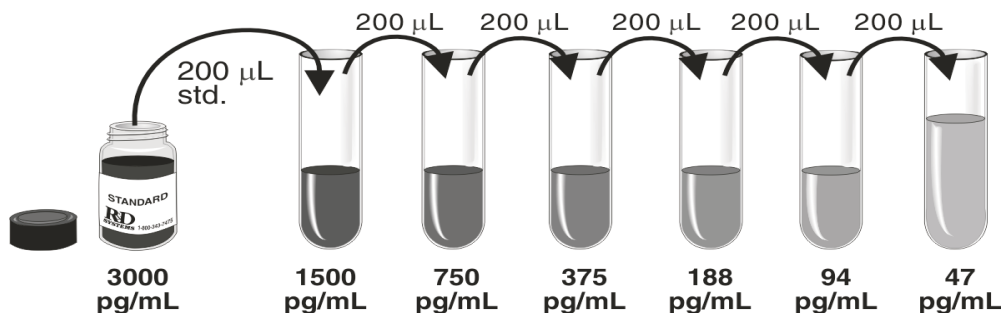


Abbildung 5: Verdünnungsprotokoll der Standardlösungen nach Quantikine®.

Der vorgegebene Standard wurde mit 5 ml von Calibrator Diluent (RD6Z) verdünnt. Die folgenden Schritte wurden entsprechend dem Quantikine® Verdünnungsprotokoll durchgeführt.

### 3.7. PATHOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

### **3.7.1. SEKTION UND MAKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN**

In Rahmen des GMC Primärscreens wurde durch den Pathologiescreen die makroskopische und histologische pathologische Phänotypisierung der mutanten Mauslinie MVD013 durchgeführt. Zusätzlich wurden in Zusammenarbeit mit dem Team des Pathologiescreens gezielt Proben von Tieren des Sekundärscreens in verschiedenen Altersstufen gewonnen und untersucht.

Im Labor des Pathologiescreens wurden die Mäuse mit CO<sub>2</sub> getötet. Die Tiere wurden makroskopisch analysiert, gemessen und gewogen. Genauso wurde mit den Organen Thymus, Leber, Herz und Milz verfahren.

Für die weitere histologische Untersuchung wurden alle Organe in 4% gepuffertem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Zwei-Mikrometer dicke Schnitte von Haut, Herz, Muskel, Lunge, Gehirn, Kleinhirn, Thymus, Milz, Gebärmutterhals, Lymphknoten, Schilddrüse, Nebenschilddrüse, Nebenniere, Magen, Darm, Leber, Bauchspeicheldrüse, Nieren, Geschlechtsorganen und Harnblase wurden angefertigt und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt.

### **3.7.2. HÄMATOXILIN-EOSIN-FÄRBUNG (HE)**

Vor der Hämatoxylin-Eosin Färbung wurden die Schnitte entparaffinisiert und rehydratisiert. Die Entparaffinisierung von Gewebeschnitten wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Entparaffinisierung in Xylol (2×10 min); Rehydratisierung in Ethanol: 100% (2×5 min), 96% (5 min), 70% (5 min). Spülung mit destilliertem Wasser (5 min).

Für die HE-Färbung wurden die Schnitte zuerst für mindestens 4 min in Hämatoxylin-Lösung nach Mayer inkubiert. Danach wurde eine Spülung mit Leitungswasser durchgeführt, bis der Farbumschlag nach blau erfolgt war.

Nach der anschließenden Inkubation der Schnitte in Eosin für 2 min wurde die Spülung mit Leitungswasser wiederholt, bis sich keine Farbe mehr löste. Die Schnitte wurden in einer Ethanolreihe mit zunehmender Ethanolkonzentration dehydriert und mit Eukitt® montiert.

### **3.7.3. IMMUNHISTOCHEMIE (IHC)**

Vor der Immunhistochemie (ICH) wurden die Schnitte ebenfalls entparaffinisiert und rehydratisiert. Die Entparaffinisierung der Gewebeschnitte entspricht dem Protokoll für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Die IHC Färbung wurde im automatisierten Discovery Immunostainer XT® von Roche Ventana (Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz) unter Verwendung der ABC-Methode (Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex) mit Hilfe des Chromogens Diaminobenzidin (DAB) durchgeführt. Die detaillierte Färbungsmethode wurde in der Publikation von S. Kunder (2007) [34] beschrieben.

Es wurde eine immunohistochemische Analyse des Milzgewebes mit einem monoklonalen Antikörper gegen Maus-TER119 (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Der Antikörper TER119 kann für eine positive Selektion von reifen Erythrozyten und erythroiden Vorläuferzellen in Knochenmark, fetaler Leber oder in der Milz verwendet werden.

Eine immunohistochemische Analyse der Darmtumoren wurde mit einem polyklonalen Antikörper aus dem Kaninchen gegen humanes Kit (abcam, Cambridge, USA) durchgeführt.

#### **3.7.4. IMMUNHISTOCHEMIE ANALYSE**

Für das Scannen der immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitte wurde das *dotSlide - Virtual Slide System* (Olympus, dotslide, Münster, Deutschland) mit der dafür entwickelten *OlyVIA Viewer* Bildanalyse Software verwendet. Die Auswertung der positiven Immunfärbung erfolgte mit Hilfe der *Definiens XD1.2.0* Software.

### **3.8. UNTERSUCHUNG DER ZUSAMMENSETZUNG DER KNOCHENMARKSZELLEN, DER APOPTOSERATEN UND DES KOLONIEWACHSTUMS DER HÄMATOPOETISCHEN PROGENITORZELLEN**

Das Koloniewachstum der hämatopoetischen Vorläuferzellen des Knochenmarks wurde im Universitätsklinikum Freiburg durch das Team des Zentrums für Klinische Forschung von Prof. Dr. Heike Pahl analysiert.

Nach der Isolation der hämatopoetischen Stammzellen aus Knochenmark wurden die Zellen in Methylcellulose Medium mit und ohne Erythropoetin kultiviert.

Zur Quantifizierung der erythroiden koloniebildenden Einheiten (CFU-E) wurden die Medien MethoCult® M3234 und M3334 (STEMCELL Technologies, Bergisch Gladbach, Deutschland) verwendet. Für die Bestimmung der sogenannten „burst forming units“ (BFU-E), der koloniebildenden Einheiten der Granulozyten/Makrophagen-Linie (CFU-GM) und der myeloiden Linie CFU-GEMM wurden die Zellen in Medium mit den Stammzellfaktoren Interleukin 3 (IL3) beziehungsweise Interleukin 6 (IL6) in MethoCult® M3434 und M353 (STEMCELL Technologies, Bergisch Gladbach, Deutschland) kultiviert. Die Inkubation dauerte 4-8 Tagen bei einer Temperatur von 37°C. Die CFU-E Kolonien wurden am 4. Tag und die BFU-E, CFU-GM, CFU-GEMM Kolonien am 8. Tag gezählt.

### **3.9. GENOTYPISIERUNG**

#### **3.9.1. KARTIERUNG DER MUTATION**

##### **3.9.1.1. GROBKARTIERUNG DER MUTATION DURCH KOPPLUNGSANALYSE**

Für die Grobkartierungsanalyse (Linkageanalyse) wurde eine Auskreuzung von heterozygoten Mutanten der Linie MVD013 mit dem genetischen Hintergrund C3HeB/FeJ auf Wildtyp-Mäuse des Stammes C57BL/6Jlco und eine anschließende Rückkreuzung der phänotypisch mutanten Hybriden auf C57BL/6Jlco vorgenommen.

Mittels der im Helmholtz Zentrum München durchgeführten Kopplungsanalyse vor Beginn dieser Doktorarbeit wurde geklärt, dass die ursächliche Mutation auf Chromosom 5 im Bereich zwischen den Markern rs13478263 bei 55,53 Mb und rs13478429 bei 103,15 Mb liegt. Der am stärksten gekoppelte Marker war SNP rs29635956 bei 67,85 Mb.

### 3.9.1.2. FEINKARTIERUNG DER MUTATION

Für die Feinkartierung der Mutation auf Chromosom 5 wurden 4 polymorphe Mikrosatellitenmarker verwendet (Tabellen 8 und 9). Die Sequenzen für die Primer wurden den Sequenzen der Datenbank MGI (<http://www.informatics.jax.org/>) entnommen und bei Thermo Fisher Scientific (Ulm, Deutschland) bestellt. Für diese Analyse wurden bereits für die Linkageanalyse verwendete DNA-Proben von Rückkreuzungstieren verwendet. Insgesamt wurden für die Feinkartierung Proben von 71 Tieren, davon 24 heterozygote Mutanten und 47 Wildtypiere, analysiert.

Tabelle 8: PCR-Fragmentlängen für die Mausinzuchtstämme C3H und C57BL/6 für die ausgewählten Mikrosatellitenmarker.

Marker	Allele (bp)	
	C3H	C57BL/6
D5Mit199	108	98
D5Mit197	114	154
D5Mit135	217	241
D5Mit398	122	110

Tabelle 9: Zusammenstellung der zur Feinkartierung auf Chromosom 5 ausgewählten Mikrosatellitenmarker, ihrer Lokalisation und Primersequenzen ([www.informatics.jax.org/](http://www.informatics.jax.org/))

Marker	Position auf Chr 5 (bp)	Vorwärtsprimer (5'-3')	Rückwärtsprimer (5'-3')
D5Mit199	59341879-59341975	tgctgtcattctgtcatatg	ccaaaaccagatttgatgcc
D5Mit197	65040327-65040475	gataatgacatgtagaagtg	agagggttcctccccc
D5Mit135	75211738-75211976	tacacagggaaaggacaggg	gggagatttgattagagcc
D5Mit398	89700063-89700172	ctattctgtctgttacttgcc	tcaggaagaaatgtgcatagaca

### 3.9.1.3. PRIORISIERUNG VON KANDIDATENGENEN

Nach dem Lokalisieren der ursächlichen Mutation wurde der entsprechende chromosomale Abschnitt mit Hilfe der Software PosMed (<http://omicspace.riken.jp/PosMed/>) anhand von eingegebenen Schlüsselwörtern auf Kandidatengene abgesucht. Das Programm bezieht mehr als 17 Millionen medizinische und biologische Dokumente für das Human-, Maus- und Rattengenom in die Recherche ein [126].

Um die Suche zu starten, gibt der Benutzer die Art der Spezies, die Schlüsselwörter und das genomische Intervall ein.

Innerhalb des durch die Feinkartierung begrenzten Bereiches zwischen 59,3 Mb und 89,7 Mb auf Chromosom 5 wurden unter der Verwendung der Schlüsselwörter *Tumor*, *Polycythaemia*, *Hämatopoese* und *GIST* mehrere Kandidatengenen vorgeschlagen (siehe Ergebnisse 4.11.2, Tabelle 19). Nach der weiteren Recherche der Funktionen dieser Gene und der mit Mutationen assoziierten Pathomechanismen sowie der Phänotypen von bereits beschriebenen Mausmutanten, wurden die in Tabelle 10 bezeichneten Gene zur Sequenzierung ausgewählt.

Tabelle 10: Kandidatengene, deren Position und Anzahl der Exone.  
(Transcript IDs <http://www.ensembl.org>)

Gen	Transcript ID	Position auf Chromosom 5	Exone: Anzahl
<i>Kit</i>	ENSMUST00000144270	75970941-76052747	21
<i>Pdgfra</i>	ENSMUST00000000476	75548316-75594229	23
<i>Kdr</i>	ENSMUST00000113516	76328852-76374483	30

Die Primer für die Kandidatengene wurden bei der Firma Metabion (Martinsried, Deutschland) hergestellt und sind im Anhang 1, 2 und 3 gezeigt.

### 3.9.2.1. ISOLATION DER GENOMISCHEN DNA

Genomische DNA wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe des ENU-Screens des Helmholtz Zentrum München extrahiert. Die Schwanzspitzen, mit einer maximal Länge von 0,5 cm, wurden von Mäusen entnommen und in eine Deep Well Plate (DWP) aufgenommen. Die Extraktion wurde mittels eines Freedom Evo® 150 Liquid Handling Roboters (Tecan, Männedorf, Schweiz) und des AGOWA mag maxi DNA Isolation Kits (AGOWA, Berlin, Deutschland) durchgeführt. Diese Methode ist ausführlich in der Dissertation von Matthias Klaften „Ein neuartiges Konzept zur genomweiten Kartierung von ENU-induzierten Mausmutanten im Hochdurchsatz“, 2007 beschrieben.

### 3.9.2.2. POLYMERASE-KETTENREAKTION

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion werden definierte Abschnitte aus geringen DNA-Mengen vervielfältigt. Für die PCR Reaktion wurde ein Mastermix in der Menge 25 µl (pro Reaktion) aus folgenden Bestandteilen angesetzt:

<b>Reagenzien (1×)</b>	<b>Menge (µl)</b>
Q-Solution (Qiagen)	5,0
10× Buffer (Qiagen)	2,5
dNTPs (2,5 mM) (Fermentas)	0,5
Vorwärtsprimer (10 pmol/µl)	1,0
Rückwärtsprimer (10 pmol/µl)	1,0
Tag-Polymerase (Qiagen) (10 U/µl)	0,3
Aqua bidest.	13,7
DNA	1,0

Die Reaktion erfolgte unter standardisierten Bedingungen in einem Thermocycler.

### **Temperaturprofil**

1.	Initiale Denaturierung	94°C	4 min
2.	Denaturierung	94°C	30 sek
3.	Primerhybridisierung	58°C	30 sek
4.	Elongation	72°C	1 min
	Schritt 2-4: 35× Wiederholung		
5.	Terminale Elongation	72°C	5 min
6.	Kühlung	12°C	∞

---

### **Geräte und Verbrauchsmaterialien**

Thermocycler	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Q-Solution	QIAGEN, Hilden, Deutschland
10× Buffer	QIAGEN, Hilden, Deutschland
dNTPs (2,5 mM)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Tag-Polymerase	QIAGEN, Hilden, Deutschland

---

### **3.9.2.3. AGAROSE-GELELEKTROPHORESE**

Die PCR-Produkte wurden mittels der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Für die Herstellung des Gels wurden in einem 500 ml-Erlmeyerkolben 2,5 g Agarose und 250 ml TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht. Die abgekühlte Gelflüssigkeit wurde mit 2 µl Ethidiumbromid (Konzentration 10 mg/ml) versetzt und in die vorbereiteten Gelkammern gegossen. Jeweils 5 µl des PCR-Produkts wurden mit 5 µl Loading Dye gemischt und in die Geltasche



aufgetragen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Gele mit Hilfe eines Gel-Dokumentationssystems unter UV-Licht analysiert.

<b>Geräte und Verbrauchsmaterialien</b>	
Agarose	BioLabProducts, Gödenstorf, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland
Standardmarker 1 Kb	Bio&SELL, Feucht bei Nürnberg, Deutschland
Gelkammern	Thermo Scientific, Novodirect, Kehl, Deutschland
Elektrophoresegeräte	Micro-Bio-Tec-Brand, Gießen, Deutschland
Magnetrührer	IKAMAG® , Staufen, Deutschland
Gel-Dokumentations- system	Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland
Tris Base	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetra- essigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland
Glycerin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland
Xylencyanol	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland

#### **TAE-Puffer:**

4,84 g	Tris Base
1,14 ml	Essigsäure
2,0 ml	EDTA 0,5 M; pH 8,0

#### **Loading Dye**

6 ml	Aqua bidest.
3 ml	Glycerin
1 ml 2,5%	Xylencyanol 2,5%

#### **3.9.2.4. REINIGUNG VON PCR-PRODUKTEN**

PCR-Produkte wurden mithilfe des kommerziellen Reinigungs-Kits Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) gereinigt. Das Prinzip beruht auf der selektiven Bindung von PCR-Produkten ab einer Länge von 100bp an paramagnetische Beads.

Jeweils 20 µl des PCR-Produkts wurden mit jeweils 36 µl der Suspension der magnetischen Beads gemischt und für 5-10 Minuten in eine 96 Well

Magnetplatte gestellt. An die Beads gebundene Amplifikate wurden mit 70% Ethanol 2× gewaschen. Anschließend wurden zu dem getrockneten Inhalt 40 µl destilliertes Wasser gegeben. Die Separierung der PCR-Amplifikate von den magnetischen Beads erfolgte durch Zentrifugieren (2500 rpm, 3 min.)

---

#### Geräte und Verbrauchsmaterialien

Agencourt AMPure XP	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Agencourt SPRIPlate	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

---

#### 3.9.2.5. SEQUENZIERREAKTION (CYCLE-SEQUENCING)

Zur Sequenzierung der aufgereinigten PCR-Amplifikate wurde das ABI PRISM® Big Dye® Cycle-Sequencing Ready Reaktion Kit verwendet. Die Reaktion fußt auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger [127]. Die PCR-Amplifikate wurden jeweils in beiden Richtungen (vorwärts und rückwärts) sequenziert. Nachfolgend ist die Herstellung des Sequenzieransatzes gezeigt.

Reagenzien (1×)	Menge (µl)
Big Dye®	1,0
Lichrosolv	2,0
Sequenzierungspuffer	4,0
Primer	1,0
PCR-Amplifikat	2,0

#### Temperaturprofil

1. Initiale Denaturierung	95°C	1 min
2. Denaturierung	95°C	5 sek
3. Primerhybridisierung	50°C	10 sek
4. Elongation	60°C	4 min
2-4 Schritt: 39× Wiederholung		
5. Kühlung	12°C	∞

---

#### Geräte und Verbrauchsmaterialien

Big Dye®	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Sequenzierungspuffer	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Lichrosolv	Merck, Darmstadt, Deutschland

---

### 3.9.2.6. REINIGUNG DES SEQUENZIERANSATZES MIT CLEAN-SEQ BEADS

Für die Reinigung der Sequenzierprodukte wurde der CleanSEQ beads Kit (Agencourt Bioscience) genutzt. Dafür wurden 10 µl CleanSEQ Beads-Lösung und 42 µl 85% Ethanol zu jeder Probe pipettiert, gemischt und für 5 Minuten in eine 96 Well Magnetplatte gestellt. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt. Mit 100 µl 85% Ethanol wurde das Produkt zweimal gewaschen. Danach wurden die Proben zum Trocknen 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die DNA mit 50 µl LiChrosolv eluiert und nach 5 min Wartezeit abzentrifugiert (2500 rpm, 3 min). Die fertigen Proben (35 µl) wurden in eine Sequenzierungsplatte transferiert.

Die Sequenzierung erfolgte unter Verwendung des Sequenziergerätes ABI 3730 im Genom-Analyse-Zentrum (GAC) des Helmholtz Zentrums München. Die Sequenzen wurde mit der *Sequencing Analysis 5.1* Software ausgewertet.

---

#### Geräte und Verbrauchsmaterialien

Agencourt CleanSEQ	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Agencourt SPRIPlate	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
LiChrosolv®	Merck, Darmstadt, Deutschland

---

### 3.10. STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die statistischen Tests wurden mit Hilfe der Statistiksoftware Sigma Plot (Version 11.0, Jandel Scientific, Tübingen, Deutschland) durchgeführt. Um die untersuchten Gruppen zu charakterisieren, wurden erst die Mittelwerte und Standardabweichungen bestimmt. Anschließend wurde die Signifikanz der Einflüsse der Faktoren Genotyp, Geschlecht und des Interaktionseffekt von Genotyp  $\times$  Geschlecht auf die gemessenen Parameter mittels zweifaktorieller ANOVA bestimmt. Die Einschätzung der Signifikanz von Genotyp-abhängigen Unterschieden innerhalb der einzelnen Geschlechter erfolgte durch Verwendung des Tukey Post-Hoc-Tests.

Für die statistische Multivariantenanalyse von immunologischen Parametern wurde ein Permutationstest der Software SPICE benutzt [125]. Die

Immunglobulinkonzentrationen wurden unter Verwendung der Wilcoxon-Rangsummentest statistisch ausgewertet.

Für den statistischen Vergleich wurden folgende Signifikanzniveaus gewählt:

- \* =  $p < 0,05$
- \*\* =  $p < 0,01$
- \*\*\* =  $p < 0,001$

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1. ANALYSE DER LEBENSFÄHIGKEIT DER HOMOZYGOT MUTANTEN

#### TIERE

Um die Lebensfähigkeit der homozygot mutanten Tiere zu prüfen wurden die Nachkommen von 20 Anpaarungen von heterozygot mutanten Tieren analysiert. Bei zwei dieser Anpaarungen wurden nur totgeborene Nachkommen gefunden.

Von den verbleibenden 18 Anpaarungen wurden insgesamt 266 lebende Nachkommen (135 männliche, 131 weibliche) aus 59 Würfen auf ihren hämatologischen Phänotyp untersucht. Zusätzlich wurden 27 totgeborene Tiere gefunden (Tabelle 11). Die durchschnittliche Anzahl lebender Nachkommen pro Wurf betrug somit 4,5 Tiere.

Nach den Mendelschen Regeln der Vererbung wurde eine Verteilung von heterozygoten Mutanten, homozygoten Mutanten und Wildtyp-Tieren im Verhältnis von 2:1:1 erwartet. Unter den untersuchten Tieren traten keine Individuen auf, die sich hinsichtlich des hämatologischen Befundes deutlich sowohl von den im Primärscreen verwendeten heterozygoten Mutanten als auch den C3H-Wildtyp-Tieren unterschieden. Das Fehlen einer dritten, phänotypisch differenzierbaren Gruppe kann einerseits bedeuten, dass sich heterozygot und homozygot mutante Tiere nicht wesentlich unterscheiden. Andererseits kann ein frühzeitiger Tod homozygot mutanter Tiere vor dem Zeitpunkt der phänotypischen Untersuchung vorliegen. Im Falle einer unbeeinträchtigten Vitalität aller drei Genotypen wurden demzufolge Nachkommen im Verhältnis von 3:1 (Mutanten: Wildtypen) erwartet. Bei der Annahme, dass die Wildtyp-Tiere (n=113) eine 100%ige Überlebensrate haben und 25% der tatsächlichen Nachkommen entsprechen, wäre somit eine Anzahl von insgesamt 339 mutanten Tieren zu erwarten gewesen. Die tatsächliche Anzahl der phänotypischen Mutanten betrug jedoch 153 Tiere. Dies entspricht nur etwa 45% der zu erwartenden Anzahl. Die ermittelte Verteilung zeigte somit eine deutlich verminderte Überlebensrate von mutanten Tieren. Bei vollständiger Lethalität der homozygoten Mäuse wären unter den Nachkommen heterozygot mutante Tiere und Wildtyp-Tiere im Verhältnis von 2:1 zu erwarten. Die beobachtete Verteilung von 153 Mut : 113 WT entspricht

jedoch einem Verhältnis von 1,3:1. Dies spricht für eine verminderte Überlebensrate selbst der heterozygot mutanten Nachkommen aus Verpaarungen von heterozygot mutanten Eltern.

Tabelle 11: Phänotypische Aufteilung von Nachkommen aus 20 Anpaarungen von heterozygot Mutanten im Alter von 8 bis 12 Wochen.

	Wildtypiere			Mutanten		
	Gesamtzahl	Männlich	Weiblich	Gesamtzahl	Männlich	Weiblich
Tatsächliche Anzahl der Tiere	113	58	55	153	77	76
Erwartete Anzahl der Tiere*	113	57	56	339	170	169

\*Ausgehend von der beobachteten Anzahl der Wildtypiere zu erwartende Anzahl von mutanten Tiere bei vollständiger Vitalität nach den Mendelschen Regeln.

In Tabelle 12 ist die phänotypische Aufteilung der Nachkommen aus Anpaarungen zwischen Wildtypieren und heterozygot mutanten Tieren dargestellt. Es wurden insgesamt 601 lebende Nachkommen aus 111 Würfen gezählt. Dies entsprach einer durchschnittlichen Wurfgröße von 5,4 Tieren pro Wurf. Von diesen wurden 529 Tiere im Alter von 8 bis 12 Wochen phänotypisiert. Es wurden deutlich mehr männliche als weibliche Tiere gezählt, während die unterschiedlichen Phänotypen (Mutante und Wildtyp) im zu erwartenden Verhältnis von 1:1 auftraten.

Tabelle 12: Phänotypische Aufteilung von Nachkommen aus der Anpaarungen von Wildtypier und heterozygote Mutante.

	Wildtypiere		Mutanten	
	Männlich	Weiblich	Männlich	Weiblich
Anzahl der Tiere	153	111	150	115

## 4.2. KÖRPERGEWICHTSENTWICKLUNG

Zur Untersuchung der Körpergewichtsentwicklung standen insgesamt 85 Tiere, davon 22 weibliche und 21 männliche Mutanten, sowie 18 weibliche und 24 männliche Wildtypiere, zur Verfügung. Die Messungen wurden von der 3. bis zur 15. Lebenswoche durchgeführt. Die Gewichtsentwicklung ist anhand von

Körpergewichtsmittelwerten in der Tabelle 13 und graphisch in den Abbildungen 6 und 7 dargestellt.

Für die Tiere, deren Gewicht über den gesamten Untersuchungszeitraum regelmäßig gemessen worden war, wurden die Fläche unter der Gewichtskurve (AUC) und die Gewichtszunahme während des Beobachtungszeitraums berechnet. Die AUC Werten wurden nach Geschlecht und Phänotyp gruppiert. Die Signifikanz der Einflüsse der Faktoren Genotyp, Geschlecht und des Interaktionseffekt wurden anhand der ANOVA und die Signifikanz der Genotypunterschiede innerhalb eines Geschlechts mit Hilfe des Tukey Tests bestimmt (Tab 14).

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl die männlichen als auch die weiblichen mutanten Mäuse bei Beginn der Messungen bereits leichter waren als die Wildtyp-Wurfgeschwister. Die Wachstumskurven der beiden Geschlechtsgruppen verliefen während der gesamten Beobachtungszeit in etwa parallel. Die AUC der Gewichtskurve der Wildtyptiere beider Gruppen war signifikant ( $p < 0,001$ ) größer als die der mutanten Tiere. Der Unterschied zwischen den beiden Genotypen hinsichtlich der Gewichtszunahme war nur bei den weiblichen Tieren signifikant ( $p = 0,019$ ). Hier nahmen die mutanten Tiere im Vergleich zu den Kontrollen weniger zu.

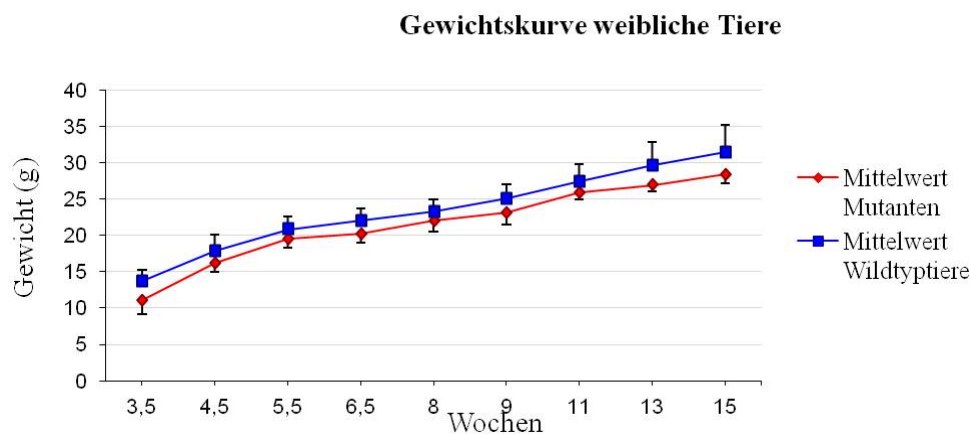


Abbildung 6: Körpergewichtsentwicklung der weibliche mutanten und Wildtypiere von Lebenswoche 3,5. bis 15. Mittelwerte und Standardabweichungen. Anzahl der Tiere:  $n = 7-19$

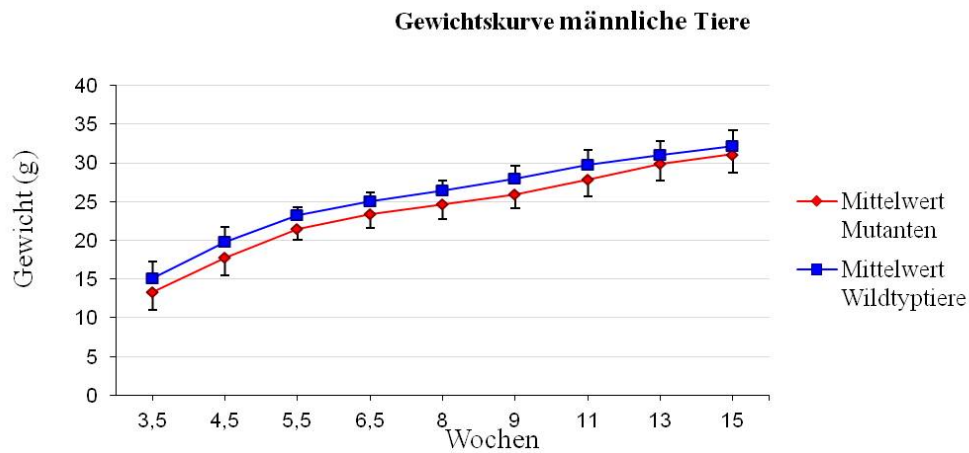


Abbildung 7: Körpergewichtsentwicklung der männlichen Mutanten und Wildtypiere von Lebenswoche 3,5 bis 15. Mittelwerte und Standardabweichungen. Anzahl der Tiere: n=13-30

Tabelle 13: Körpergewichtsentwicklung der Linie MVD013 von Lebenswoche 3,5 bis 15.

Alter (Wochen)	Geschlecht	n	Wildtypiere MW±SD	N	Mutanten MW±SD
3,5	♂	13	15,4±2,6	12	12,3±2,2
3,5	♀	7	13,7±1,4	11	11,1±1,9
4,5	♂	26	19,8±1,9	23	17,8±2,4
4,5	♀	17	18,0±2,1	22	16,1±1,2
5,5	♂	30	23,2±1,1	29	21,1±1,4
5,5	♀	19	20,9±1,7	24	19,4±1,1
6,5	♂	29	24,9±1,2	28	22,9±1,8
6,5	♀	17	22,0±1,6	22	20,2±1,2
8	♂	30	26,3±1,3	29	24,1±1,8
8	♀	19	23,3±1,7	24	21,9±1,4
9	♂	28	27,8±1,6	27	25,4±1,5
9	♀	18	25,0±1,8	24	23,0±1,4
11	♂	23	29,9±1,7	18	28,0±2,0
11	♀	14	27,7±2,4	17	25,8±0,8
13	♂	15	31,1±1,7	14	30,2±1,9
13	♀	7	30,4±3,5	13	26,9±0,8
15	♂	15	32,3±2,0	14	31,3±2,1
15	♀	7	32,2±4,3	9	28,3±1,1

MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; n: Anzahl der Tiere.



Tabelle 14: Statistische Auswertung von Gewichtszunahme der Linie MVD013

		<b>AUC</b>	<b>Gewichtszunahme</b>
		MW±SD	MW±SD
Mutanten	♂ n=21	101,6±7,3	7,6±1,9
Wildtypen	♂ n=24	111,3±5,6	8±1,8
Mutanten	♀ n=22	92,0±5,5	6,8±1,3
Wildtypen	♀ n=18	98,1±8,4	9,0±5,2
Tukey Test ♂		<0,001	n.s.
Tukey Test ♀		0,005	0,019
ANOVA Genotyp		<0,001	0,044
ANOVA Sex		<0,001	n.s.
ANOVA Interaktion		n.s.	n.s.

AUC: Fläche unter einer Kurve (Area under the curve) n.s.: nicht signifikant

### 4.3. HÄMATOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

#### 4.3.1. HÄMATOLOGIE

In Rahmen des Primärscreens wurden im peripheren Blut erwartete Veränderungen nachgewiesen. Die Tabellen mit den gemessenen Werten für hämatologische Parameter aus dieser Untersuchung befinden sich im Anhang (siehe Anhang 4 und 5). Die mutanten Tiere zeigten im Vergleich mit der Kontrollgruppe eine signifikante Vermehrung der roten Blutzellen (RBC) und eine Erhöhung des Hämatokrits. Die Hämoglobinwerte waren ebenfalls erhöht, während mittleres Zellvolumen (MCV), mittleres korpuskuläres Hämoglobin (MCH), mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC) und Erythrozytenverteilungsbreite (RDW) signifikant reduziert waren. Es wurden zusätzlich Unterschiede im weißen Blutbild nachgewiesen: Die mutanten Tiere wiesen erhöhte Leukozytenzahlen (white blood cell count, WBC) im peripheren Blut auf. Außerdem war die Thrombozytenzahl (PLT) pro Mikroliter Blut bei mutanten Tieren signifikant niedriger als bei Wildtypieren (Abbildungen 8-13).

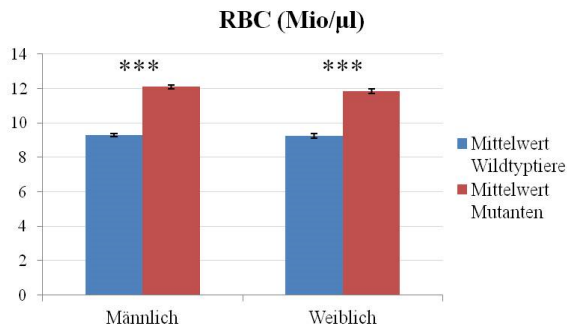


Abbildung 8: Bestimmung der Erythrozytenzahl von Mäusen im Alter von 25 Wochen. Mittelwert $\pm$ Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Anzahl der Tiere: n=10 pro Gruppe. WT: Wildtypiere; Mut: mutante Tiere; Welch-T-test \*\*\*= p<0,001

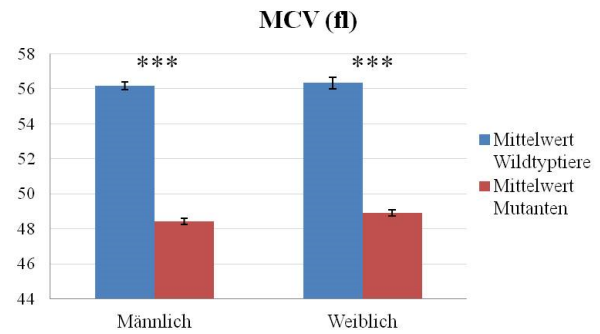


Abbildung 9: Bestimmung des mittleren korpuskulären Volumens von Mäusen im Alter von 25 Wochen. Mittelwert $\pm$ SEM. Anzahl der Tiere: n=10 pro Gruppe. WT: Wildtypiere; Mut: mutante Tiere; Welch-T-test \*\*\*= p<0,001

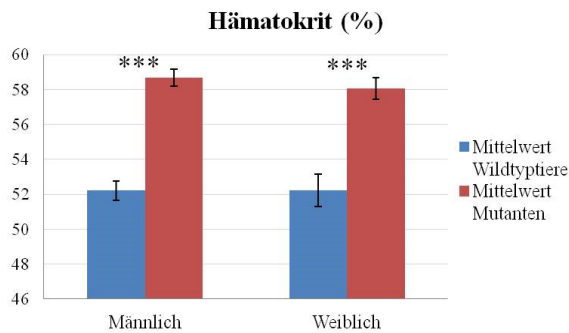


Abbildung 10: Bestimmung des Hämatokrits von Mäusen im Alter von 25 Wochen. Mittelwert $\pm$ SEM. Anzahl der Tiere: n=10 pro Gruppe. WT: Wildtypiere; Mut: mutante Tiere; Welch-T-test \*\*\*= p<0,001

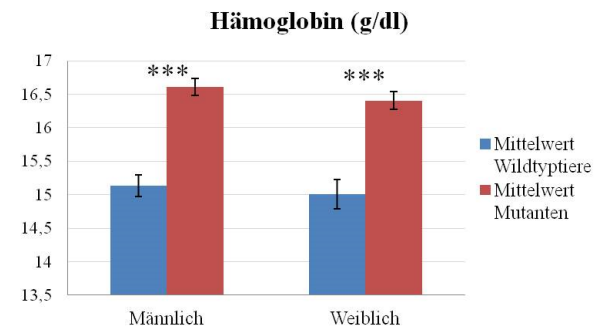


Abbildung 11: Bestimmung der Hämoglobinkonzentration von Mäusen im Alter von 25 Wochen. Mittelwert $\pm$ SEM. Anzahl der Tiere: n=10 pro Gruppe. WT: Wildtypiere; Mut: mutante Tiere; Welch-T-test \*\*\*= p<0,001

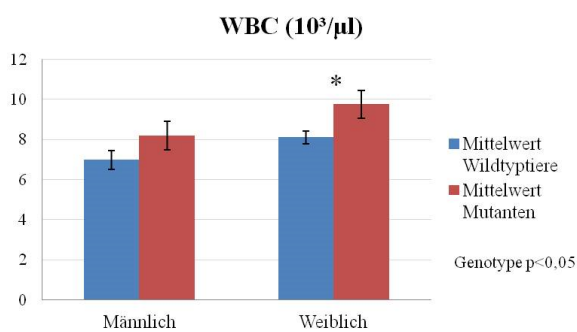


Abbildung 12: Bestimmung der Leukozytenzahl von Mäusen im Alter von 25 Wochen. Mittelwert $\pm$ SEM. Anzahl der Tiere: n=10 pro Gruppe. WT: Wildtypiere; Mut: mutante Tiere; Welch-T-test \* = p<0,05

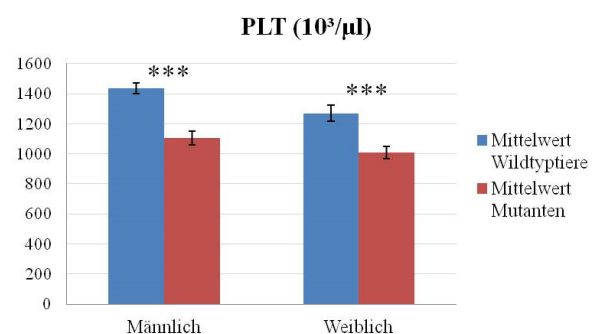


Abbildung 13: Bestimmung der Thrombozytenzahl von Mäusen im Alter von 25 Wochen. Mittelwert $\pm$ SEM. Anzahl der Tiere: n=10 pro Gruppe. WT: Wildtypiere; Mut: mutante Tiere; Welch-T-test \*\*\*= p<0,001

Um zu ermitteln, ob es sich bei der beobachteten Thrombozytopenie nur um eine relative Verminderung aufgrund der hohen Gesamterthrozytenzahl handelte oder eine absolute Verminderung der Thrombozyten vorlag, wurde die Konzentration von PLT pro Mikroliter Plasma unter Einbeziehung des Hämatokritwertes nach folgender Formel berechnet:

$$\text{PLT (10}^3/\mu\text{l Plasma)} = \text{PLT} \times 100 / \text{HCT}$$

Die Ergebnisse zeigen ebenfalls eine Tendenz zur Erniedrigung der Thrombozytenzahl bei den mutanten Tieren ( $p < 0,05$ ), doch der Unterschied zwischen mutanten Tieren und Wildtyptieren ist deutlich geringer und die Werte bleiben bei beiden Gruppen im physiologischen Bereich. Dies spricht für eine relative und nicht absolute Erniedrigung von PLT. Es wurden die folgenden Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung berechnet:

	Männchen Wildtypen	Weibchen Wildtypen	Männchen Mutanten	Weibchen Mutanten
PLT ( $10^3/\mu\text{l}$ von Plasma)	3008,4 $\pm$ 84,97	2659,6 $\pm$ 106,1	2675,7 $\pm$ 108,23	2401,1 $\pm$ 7,31

#### 4.3.2. BESTIMMUNG DER OSMOTISCHEN RESISTENZ DER ERYTHROZYTEN

Die mutanten Tiere wiesen eine erhöhte osmotische Fragilität der Erythrozyten unabhängig vom Alter der getesteten Tiere auf. Die beginnende Hämolyse wurde ab einer Konzentration von 0,5% NaCl beobachtet. Bei der Zugabe einer 0,45%igen NaCl-Lösung wurden ca. 30% der Erythrozyten der mutanten Tiere hämolytisch, während von den Wildtyp-Tieren nur ca. 15% der Erythrozyten beschädigt wurden (Abb. 14).

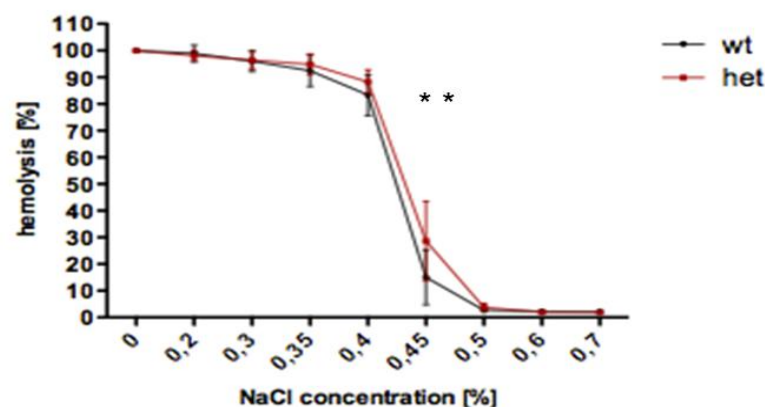


Abbildung 14: Bestimmung der osmotischen Resistenz der Erythrozyten. T-Test \*\*=  $p < 0,01$ ; WT: Wildtypiere; Mut: mutante Tiere; Mittelwert $\pm$ SEM Anzahl der Tieren:  $n=13$

### 4.3.3. UNTERSUCHUNG DER RETIKULOZYTENZAHL UND DES DIFFERENTIALBLUTBILDS

Für die Bestimmung der Anzahl der Retikulozyten und die Untersuchung des Differentialblutbilds wurde das Blut von 41 Tieren im Alter von 4 Monaten analysiert. Die mutanten Tieren beider Geschlechtsgruppen zeigten signifikant höhere absolute Retikulozytenzahlen im Vergleich mit der entsprechenden Gruppe von Kontrolltieren; in Relation zur Erythrozytenzahl war der Anteil der Retikulozyten jedoch nicht nachweisbar unterschiedlich (Abb. 15). Im Differentialblutbild sahen wir eine Eosinophilie, sowie eine deutlich höhere Zahl von neutrophilen Granulozyten bei mutanten Tieren. Es wurde auch eine signifikante Erhöhung der Anzahl basophiler Granulozyten nachgewiesen (Tab. 15). Auf Grund der jedoch immer noch sehr kleinen gesamten Anzahl basophiler Granulozyten im peripheren Blut wurde dieser Unterschied jedoch als nicht relevant bewertet.

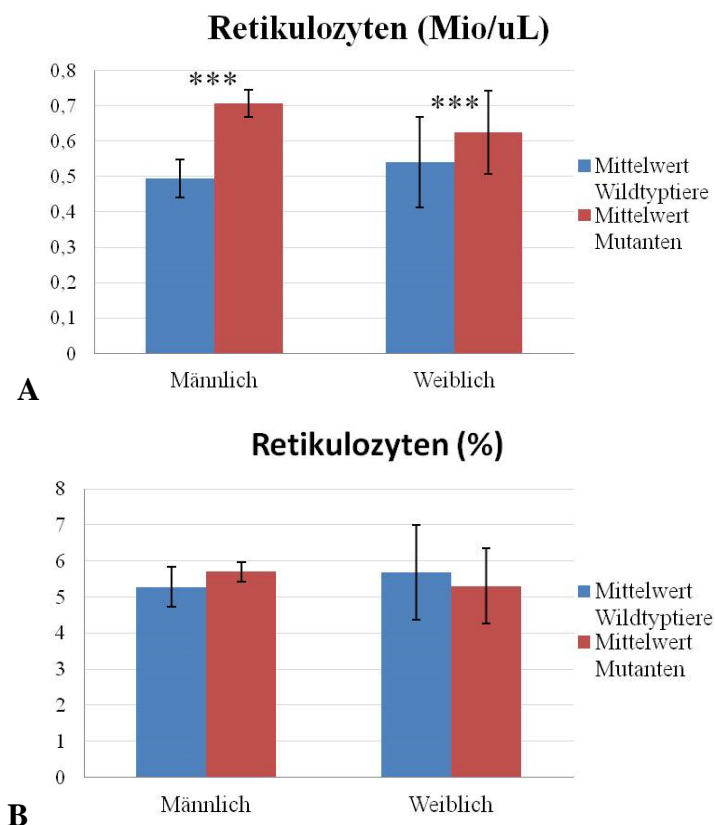


Abbildung 15: (A) Retikulozytenzahl und (B) prozentualer Anteil der Retikulozyten an der Erythrozytenzahl. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; Welsh-T-Test \*\*\*\*=  $p < 0,001$ .

Anzahl der getesteten Tiere: Mut weiblich  $n=11$ , Mut männlich  $n=8$ , WT weiblich  $n=10$ , WT männlich  $n=12$ . WT: Wildtypiere; Mut: mutante Tiere.

Tabelle 15: Differentialblutbild von mutanten MVD013 Tieren und Wildtyp-Kontrollen

	Kontrolltiere		Mutanten		Welsh-T-Test		
	Männlich MW±SD	Weiblich MW±SD	Männlich MW±SD	Weiblich MW±SD	Genotyp  <i>p</i> -Wert	Geschlecht  <i>p</i> -Wert	Interaktion  <i>p</i> -Wert
Anzahl der getesteten Tieren	<b>12</b>	<b>10</b>	<b>8</b>	<b>11</b>			
<b>Neutrophile Granulozyten</b> (10 <sup>3</sup> /uL)	1,12 ± 0,29	1,1 ± 0,22	2,35 ± 0,30	2,33 ± 0,55	<i>p</i> <0,001	n.s.	n.s.
<b>Lymphozyten</b> (10 <sup>3</sup> /uL)	5,17 ± 1,42	4,25 ± 0,89	4,12 ± 0,78	4,65 ± 1,28	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Monozyten</b> (10 <sup>3</sup> /uL)	0,68 ± 0,23	0,87 ± 0,31	0,57 ± 0,111	0,81 ± 0,26	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Eosinophile Granulozyten</b> (10 <sup>3</sup> /uL)	0,06 ± 0,02	0,079 ± 0,015	0,15 ± 0,03	0,19 ± 0,051	<i>p</i> <0,001	n.s.	n.s.
<b>Basophile Granulozyten</b> (10 <sup>3</sup> /uL)	0,003 ± 0,004	0	0,004 ± 0,005	0,0072 ± 0,006	<i>p</i> <0,01	n.s.	n.s.
<b>Retikulozyten</b> (10 <sup>6</sup> /uL)	0,49 ± 0,05	0,54 ± 0,13	0,71 ± 0,04	0,62 ± 0,12	<i>p</i> <0,001	n.s.	n.s.
<b>Retikulozyten(%)</b>	5,28 ± 0,55	5,68 ± 1,31	5,7 ± 0,27	5,31 ± 1,04	n.s.	n.s.	n.s.

MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; n.s.: nicht signifikant.

#### 4.3.4. IMMUNOLOGISCHE PHÄNOTYPISIERUNG VON PERIPHEREM BLUT

Im Primärscreen wurde eine FACS Analyse der Leukozyten-Populationen im peripheren Blut durchgeführt. Bei dieser Analyse wiesen bezogen auf die Gesamtzahl der Leukozyten nur die weiblichen Mutanten einen signifikant erhöhten Anteil an Granulozyten und einen erniedrigten Prozentsatz an Lymphozyten (B-Zellen und T-Zellen) auf (Abb. 16). Die Männchen wiesen keinen signifikanten Unterschied in diesen Parametern auf, zeigten aber die gleiche Tendenz (siehe Anhang 11). Im Sekundärscreen wurde die FACS Analyse der Leukozyten-Populationen im peripheren Blut bei einer zusätzlichen Kohorte wiederholt. Die Unterschiede der weiblichen Tiere im Primärscreen konnten bestätigt werden, und diesmal waren auch bei den Männchen die Unterschiede signifikant.

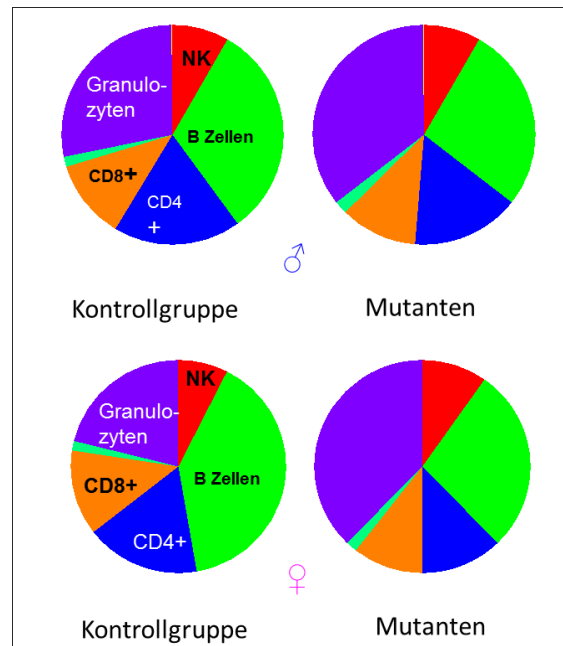


Abbildung 16: FACS-Analyse von Leukozyten-Populationen im peripheren Blut.

Bei der Untersuchung der Antikörperkonzentrationen im Blutplasma wurden signifikant höhere Werte der Antikörper IgA, IgG2a und IgG2b im Plasma der Mutanten beiderlei Geschlechts und nur bei männlichen Mutanten erhöhte Konzentrationen von IgM und IgG1 im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen nachgewiesen. Die weiblichen mutanten Tiere zeigten außerdem eine signifikante Erhöhung von IgG3. (Abb. 17).

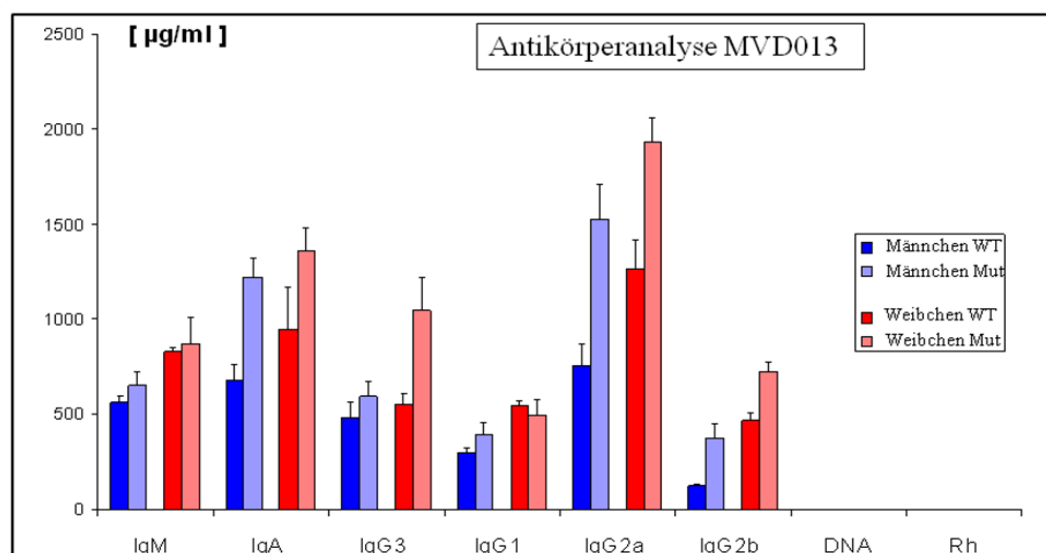


Abbildung 17: Konzentration von Antikörpern verschiedener Isotypen und von Autoantikörpern im Blutplasma von mutanten MVD013 Tieren und Kontrollmäusen Mittelwert $\pm$ SEM. Anzahl der Tiere: n=10.

#### 4.4. KLINISCH-CHEMISCHE PARAMETER

Die klinisch-chemischen Parameter wurden im Rahmen des GMC-Primärscreens gemessen.

Nach Futterentzug über Nacht wurden in fast allen gemessenen Plasmaparametern signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen nachgewiesen. Die mutanten Tiere zeigten deutlich niedrigere Glukosespiegel (Abb. 18), während die Triglycerid- und Cholesterol-Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe zwar signifikant, aber eher mäßig erniedrigt waren (siehe Anhang 6).

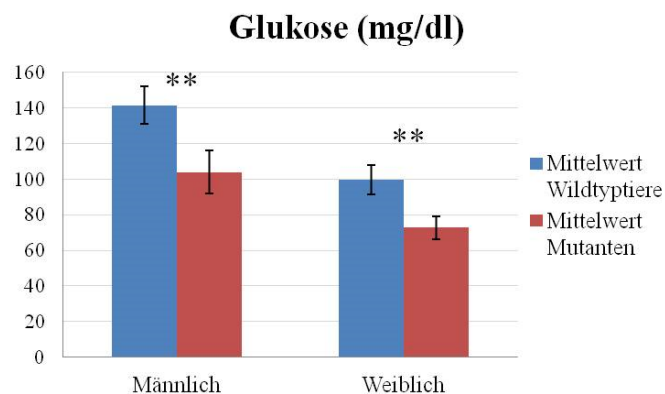


Abbildung 18: Glukosekonzentration im Plasma nach Futterentzug über Nacht. Mittelwert $\pm$ SEM. Anzahl der Tiere: n=10 pro Gruppe. WT: Wildtypiere; Mut: mutante Tiere; Welsh-T-Test \*\*= p<0,01

Bei der ersten Blutentnahme in „Pipeline 2“ identifizierte die Auswertung der klinisch-chemischen Daten mittels ANOVA signifikante Genotypeneffekte für Transferrin, Eisen, Triglyceride, Kreatinin und Kalium. Die mutanten Tiere wiesen im Vergleich zu den Wildtypieren erniedrigte Transferrin-, Eisen- und Triglyceridwerte auf. Die Kreatininkonzentration war deutlich höher als in der Vergleichsgruppe. Die Kalium- und Chloridkonzentrationen sowie die ASAT Aktivität waren signifikant höher bei weiblichen Mutanten im Vergleich zu den weiblichen Kontrollen, während die Albuminkonzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe in beiden Geschlechtern leicht erniedrigt war (Anhang 7).

Bei der zweiten Blutentnahme wurden die Unterschiede in Transferrin, Eisen, Kalium und der Albuminkonzentration bestätigt. Außerdem wurde bei den mutanten Tieren ein signifikant niedrigerer Wert für Gesamteiweiß nachgewiesen. Bei der totalen Eisenbindungskapazität (TIBC) und der ungesättigten Eisenbindungskapazität (UIBC) wurden deutlich verringerte Werte festgestellt. Die errechnete Transferrinsättigung zeigte keine

signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen. Die Unterschiede in den Triglycerid- und Kreatininkonzentrationen und Aspartat-Aminotransferase (ASAT) Aktivität konnten nicht mehr nachgewiesen werden. (Anhang 8, Abb. 19-21)

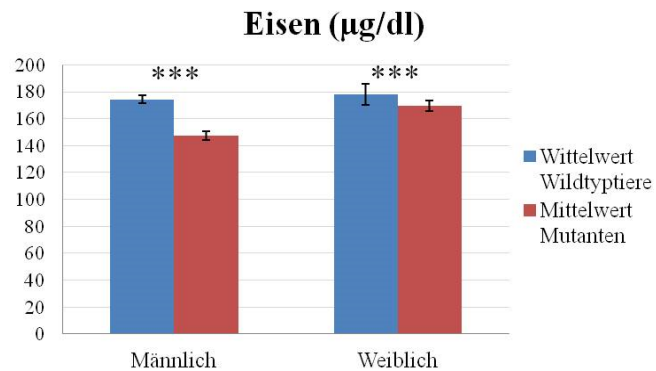


Abbildung 19: Konzentration von Eisen im Plasma bei der zweiten Blutentnahme. Mittelwert±SEM. Anzahl der Tiere: n=10 pro Gruppe. WT: Wildtypiere; Mut: mutante Tiere; Welsh-T-Test \*\*\*= p<0,001

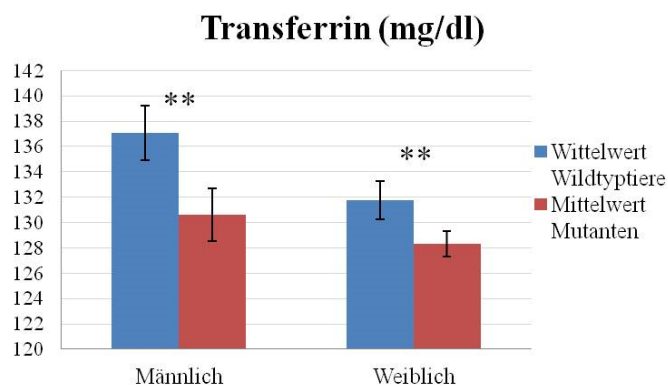


Abbildung 20: Transferrinkonzentration im Plasma bei der zweiten Blutentnahme. Mittelwert±SEM. Anzahl der Tiere: n= 10 pro Gruppe. WT: Wildtypiere; Mut: mutante Tiere; Welsh-T-Test \*\*= p<0,01

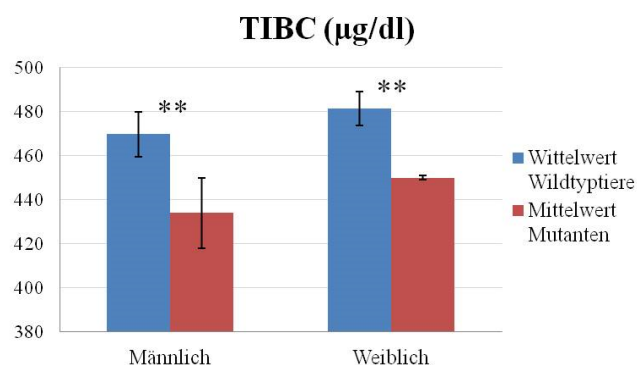


Abbildung 21: Totale Eisen-Bindungskapazität im Plasma bei der zweiten Blutentnahme. Mittelwert±SEM. Anzahl der Tiere: n=10 pro Gruppe. WT: Wildtypiere; Mut: mutante Tiere; Welsh-T-Test \*\*= p<0,01

#### 4.5. INTRAPERITONEALER GLUKOSE TOLERANZ TEST



Der Glukose-Toleranz-Test (GTT) zeigte für beide Geschlechter einen signifikanten Unterschied zwischen den Mutanten und den entsprechenden Kontrollgruppen. Die mutanten Männchen wiesen im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren signifikant niedrigere Glucosespiegel während des gesamten Tests auf. Die weiblichen mutanten Tiere zeigten keinen Genotyp-abhängigen Unterschied im basalen Glucosespiegel und am Ende des Tests, jedoch signifikant niedrigere Glukosewerte zu den übrigen Zeitpunkten (Abb. 22-23).

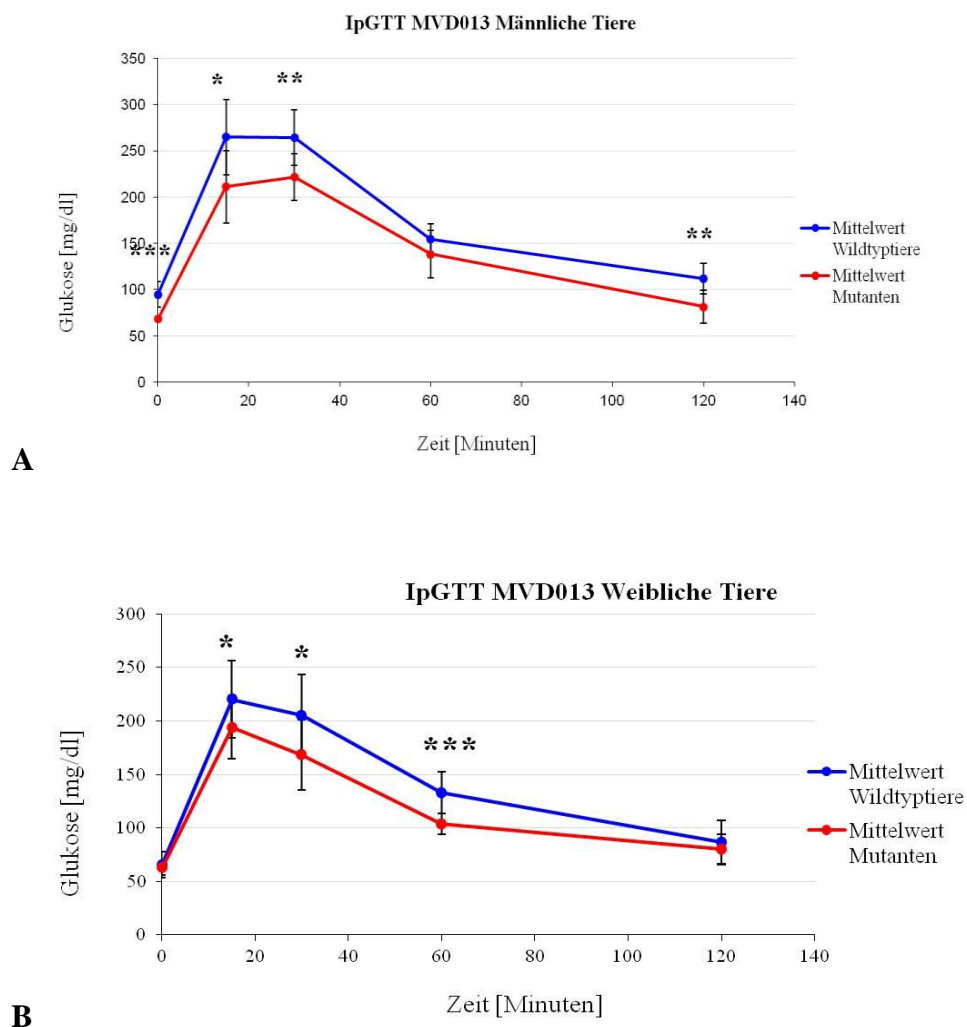


Abbildung 22: Darstellung des Blutglukosespiegels im Verlauf des IpGTT von (A) männlichen und (B) weiblichen heterozygoten Mutanten und Wildtypieren. Mittelwert+SEM. Anzahl der Tiere: n=10 pro Gruppe. wt: Wildtypiere; Mut: mutante Tiere; ANOVA \*\*\*= p<0,001; \*\*= p<0,01; \*= p<0,05

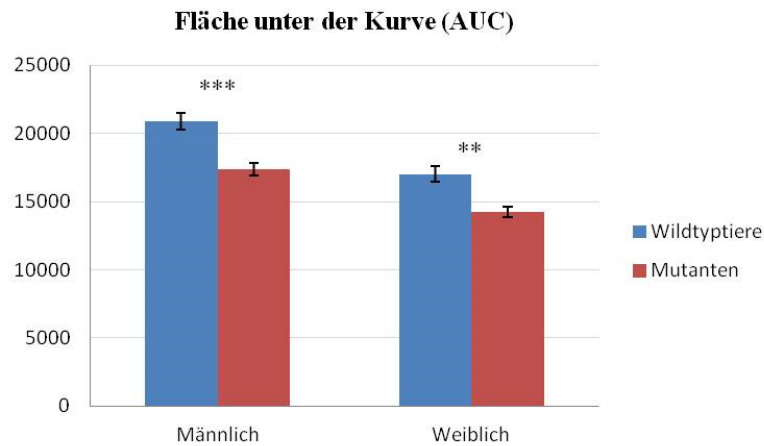


Abbildung 23: Fläche unter der Blutglukose-Kurve inklusive des basalen Glukosespiegels (AUC) im Verlauf des IpGTT. Mittelwert $\pm$ SEM. Anzahl der Tiere: n=10 pro Gruppe. wt: Wildtypiere; Mut: mutante Tiere; Welsh-T-Test \*\*\*=  $p < 0,001$ ; \*\*=  $p < 0,01$

#### 4.6. BLUTGASANALYSE

Um eine kompensatorische Polyglobulie auszuschließen wurden bei Mäusen in zwei Altersgruppen (4 Monate und 13-15 Monate) Blutgasparameter bestimmt. Bei den jüngeren Tieren wurde kein Genotypeneffekt festgestellt. Bei mutanten Tieren der gealterten Gruppe wurden im Vergleich zu den jeweiligen Kontrolltieren signifikant höhere Werte für den Kohlendioxidpartialdruck ( $p\text{CO}_2$ ), die Hydrogencarbonatkonzentration ( $\text{HCO}_3^-$ ) und den aktuellen Basenüberschuss (ABE) gemessen, während im Sauerstoffpartialdruck ( $p\text{O}_2$ ) kein signifikanter Unterschied zwischen mutanten Mäusen und Wildtypieren gefunden wurde. (Anhang 9-10, Abb. 24)

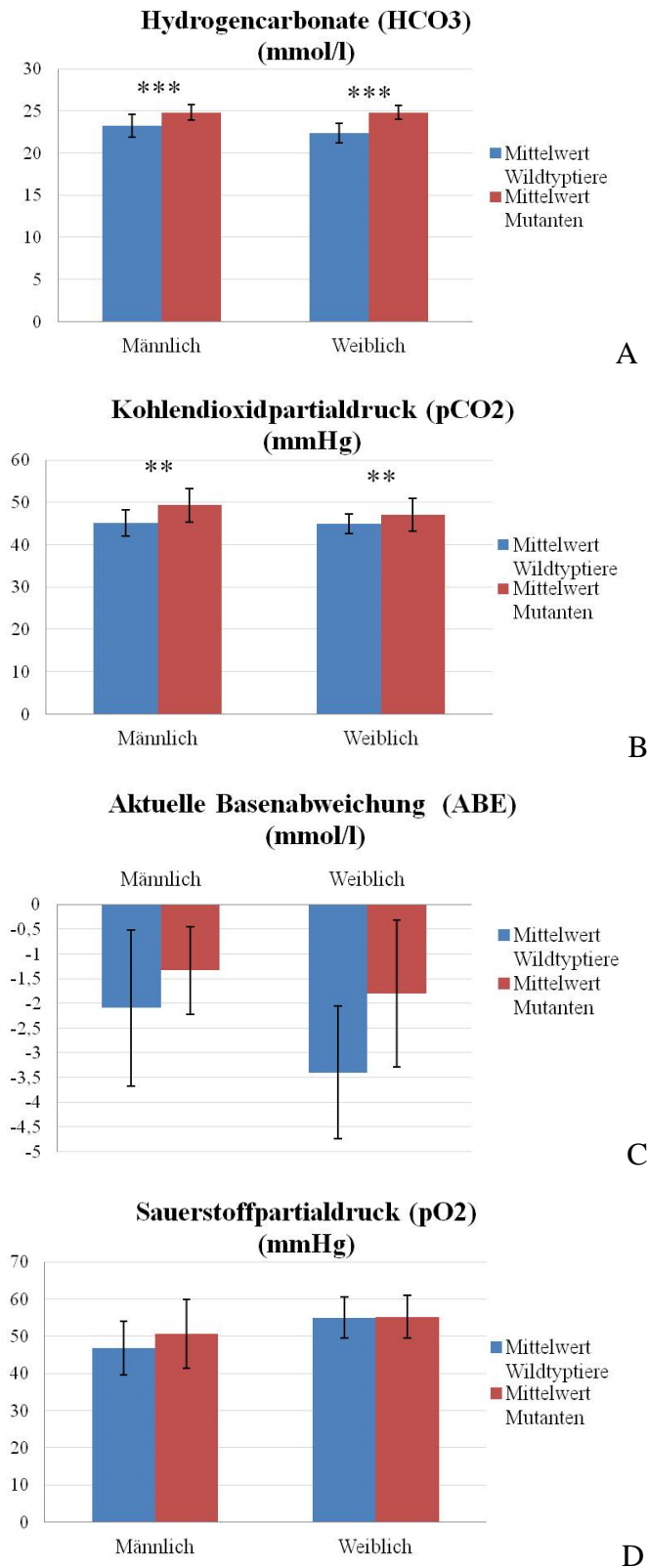


Abbildung 24: Ausgewählte Blutgasparameter von getesteten Mäusen im Alter von 13 bis 15 Monaten. A) Bikarbonatkonzentration, B) Kohlendioxidpartialdruck, C) ABE und D) Sauerstoffpartialdruck im Vergleich von mutanten Tieren und Wildtypieren. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. Anzahl der Tiere: mut weiblich n=5; mut männlich n=12, wt weiblich n=5, wt männlich n=11. Welsh-T-Test \*\*\*= p<0,001, \*\*= p<0,01 WT: Wildtypiere; Mut: mutante Tiere

#### 4.7. SERUM ERYTHROPOETINKONZENTRATION

Für die Analyse wurde das Serum von 24 Tieren im Alter von 5 Monaten (6 Mäuse pro Geschlecht und Phänotyp) verwendet. Bei drei Tieren aus der Wildtypgruppe wurden stark erhöhte Erythropoetinkonzentrationen gemessen. Da die Daten nicht normal verteilt waren, wurde kein parametrischer Test, sondern ein nicht parametrischer Mann-Whitney Rank Sum Test für die statistische Analyse angewendet. Die Ergebnisse zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen Mutanten und Wildtyptieren ( $p=0,1$ ) (Abb 25).

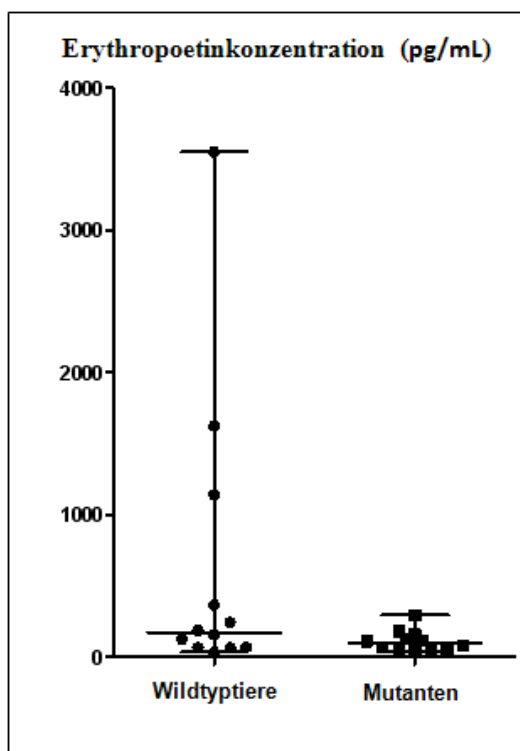


Abbildung 25: Erythropoetinkonzentration im Serum von heterozygot mutante MVD013 Tieren und Wildtyp-Wurfgeschwistern. Die einzelnen Punkte kennzeichnen die Einzelmesswerte, außerdem sind der Median, der minimale und der maximale Wert gekennzeichnet.

#### 4.8. PATHOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

##### 4.8.1. MAKROSKOPISCHE UND HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN IM PRIMÄRSCREEN

Im Rahmen des Primärscreens wurden die vorher bekannten Pathologien, nämlich Tumoren im Magen-Darm-Trakt und das Auftreten eines Megaceacums im Bereich des Blinddarms, bestätigt. Dabei wurden insgesamt 19 Mutanten und 19 Wildtypiere untersucht.

Bei der histologischen Untersuchung wurden Anfangsstadien von mesenchymalen Tumoren im Darm oder Magen bei 18 mutanten Tieren nachgewiesen (Abb. 26). Insgesamt 7 mutante Tiere zeigten ein Megaceacum im Bereich des Blinddarms (Abb. 27). Außerdem wiesen 3 mutante Tiere noduläre, regenerative Hyperplasien und 4 mutante Tiere fokale Nekrosen in der Leber auf.

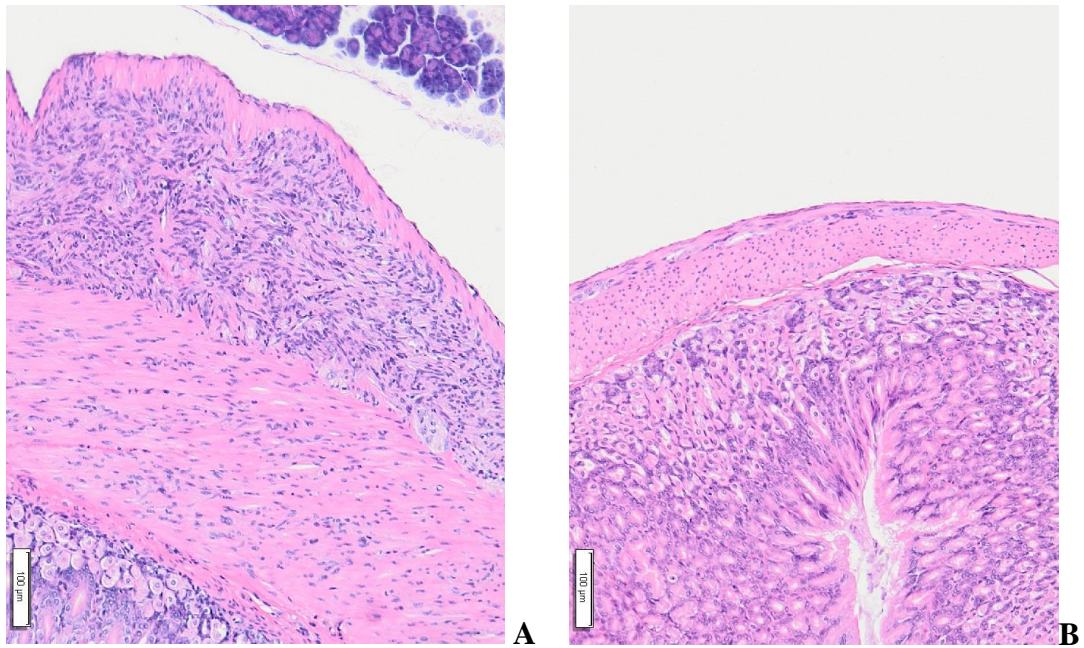


Abbildung 26: (A) Gastrointestinaler Stromatumor im Bereich des Magens bei einer mutanten Maus (0,6 $\times$ ), (B) der Magen einer Wildtypmaus (0,6 $\times$ )

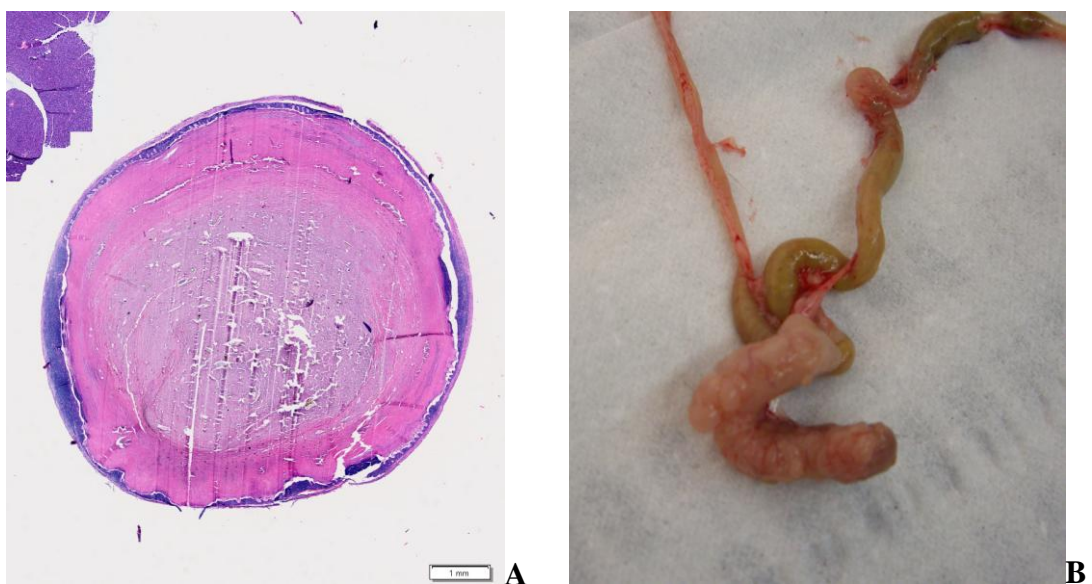


Abbildung 27: Megaceacum mit Darminhalt im Bereich des Blinddarms bei einem mutanten Tier (A) histologische Abbildung (0,6 $\times$ ) (B) makroskopische Abbildung



#### 4.8.2. IMMUNHISTOCHEMISCHE ANALYSE

Das Ergebnis der immunhistochemischen Untersuchung der Milz mit Antikörpern gegen TER119 zeigte keinen signifikanten Unterschied, aber eine deutliche Tendenz zur prozentualen Vermehrung von erythroiden Vorläuferzellen und reifen Erythrozyten im Milzgewebe von mutanten Tieren. Die getesteten Tiere wurden in 3 Gruppen nach Alter und Geschlecht sortiert. (Tab. 16, Abb. 28).

Tabelle 16: Immunhistochemische Analyse des Milzgewebes

Gruppe	Alter (Tage)	Anzahl der getesteten Tieren pro Gruppe	Geschlecht	Wildtypen (%)*	Mutanten (%)*
1	153-158	4	Männlich	43,3	58,3
2	323-386	2	Männlich	59,7	66,4
3	436-437	6	Weiblich	55,8	59,3

\*Mittelwert des Anteils an erythroiden Vorläuferzellen und reifen Erythrozyten an der Gesamtzahl der Splenozyten in immunhistochemisch gefärbten Milzschnitten (%)

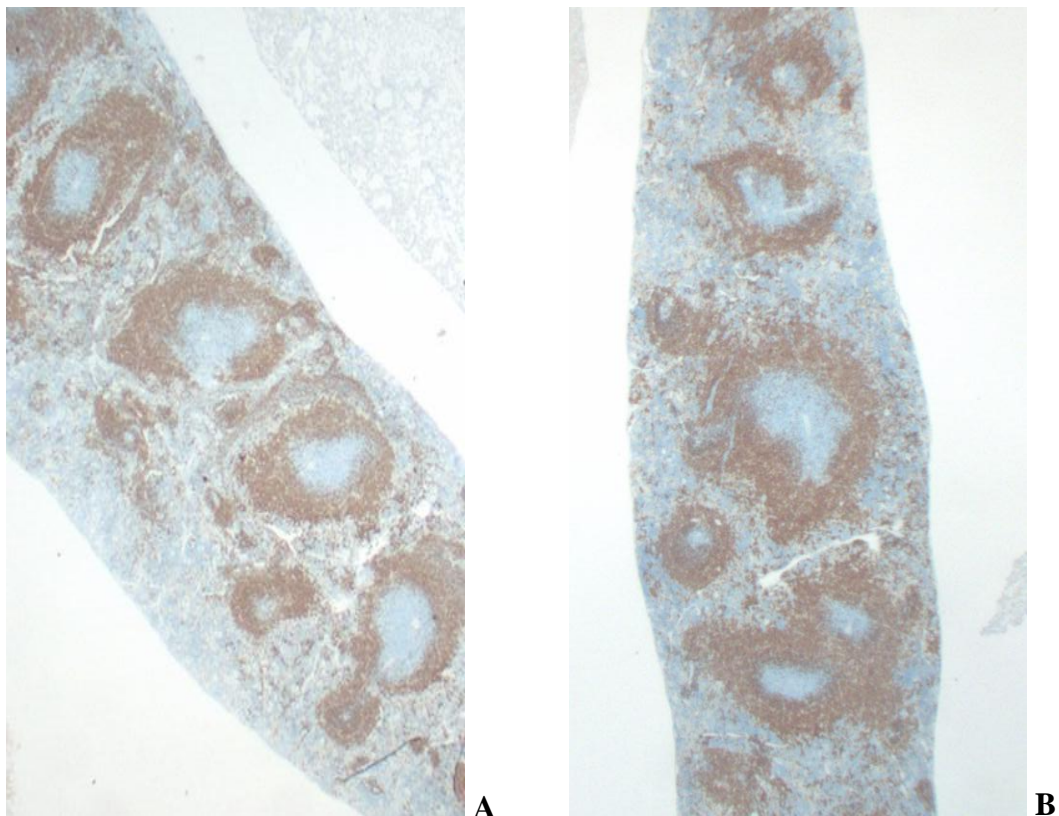


Abbildung 28: Immunhistochemische Färbung des Milzgewebes mit dem Antikörper TER119. (A) mutante Maus (B) Wildtypier

Das Ergebnis der immunhistochemischen Untersuchung der mesenchymalen Tumoren des Magen-Darm-Trakts mit dem Antikörper gegen Kit zeigte eine variable schwache bis moderate Immunreaktivität des Tumorgewebes, während die Zellen des Plexus submucosus eine spezifische positive Anfährbarkeit zeigten.

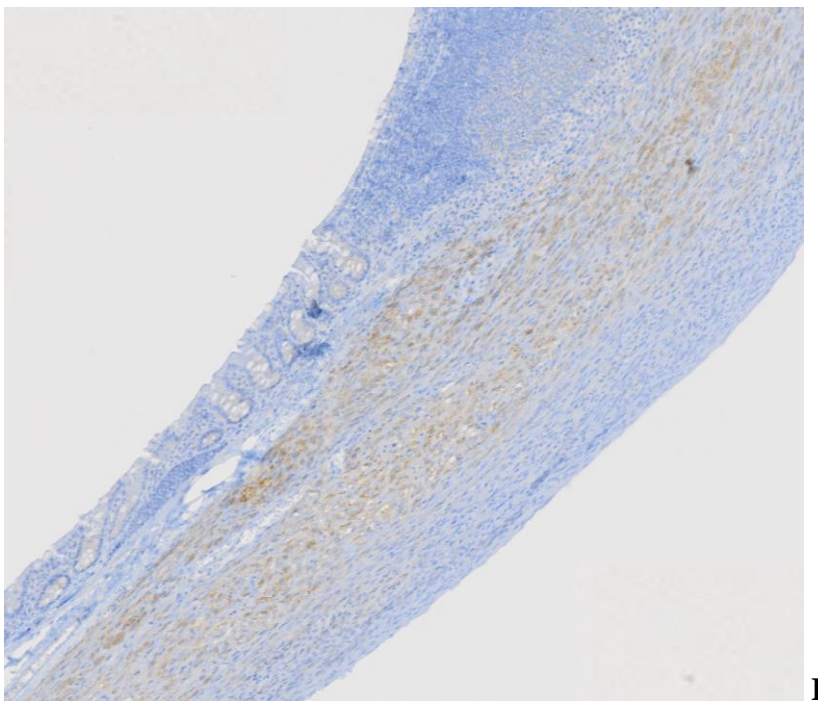
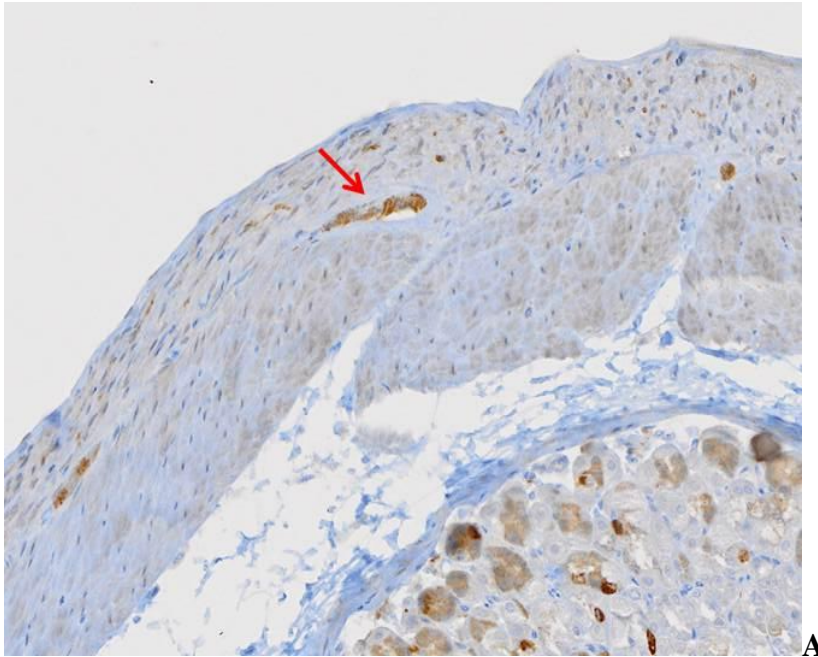


Abbildung 29: Immunhistochemische Färbung des Tumorgewebes heterozygot mutanter Mäuse mit dem Antikörper gegen Kit. (A) Magen einer heterozygot mutanten Maus. Der rote Pfeil kennzeichnet die spezifischer Kit positive Färbung von Zellen des Plexus submucosus (B) moderate Immunreaktivität der Tumorzellen im Darmgewebe

## 4.9. BESTIMMUNG DER ZUSAMMENSETZUNG DER HÄMATOPOETISCHEN STAMMZELLEN

### 4.9.1. BESTIMMUNG DER ANZAHL DER KOLONIEBILDENDEN EINHEITEN DES KNOCHENMARKS ANHAND DES KOLONIEWACHSTUMS IN VITRO

Für die Bestimmung der Zusammensetzung der hämatopoetischen Stammzellen wurden das Knochenmark von weiblichen Tieren zweier Altersgruppen (je 10 Tiere pro Genotyp im Alter von 6 Monaten und je 4 Tiere pro Genotyp im Alter von 12 Monaten) untersucht.

Weder bei den jüngeren Tieren im Alter von sechs Monaten, noch bei den 12 Monate alten Mäusen, wurde ein signifikanter Unterschied zwischen mutanten Tieren und Wildtypmäusen hinsichtlich des Anteils der von noch weitgehend undifferenzierten KSL ( $C-kit^+$ ,  $Sca-1^+$  Zellen ohne spezifische Linien-Marker ( $Lin^-$ )) Zellen gebildeten Kolonien an der Gesamtzahl der  $Lin^-$  Kolonien festgestellt. Zu dieser Population gehören die langfristigen hämatopoetischen Stammzellen (Long-term hematopoietic stem cells LT-HSC), die kurzfristigen hämatopoetischen Stammzellen (Short-term hematopoietic stem cells ST-HSC) und die multipotenten myeloiden Stammzellen (multipotent myeloid stem cell, MPP) (Abbildungen 30 und 31).

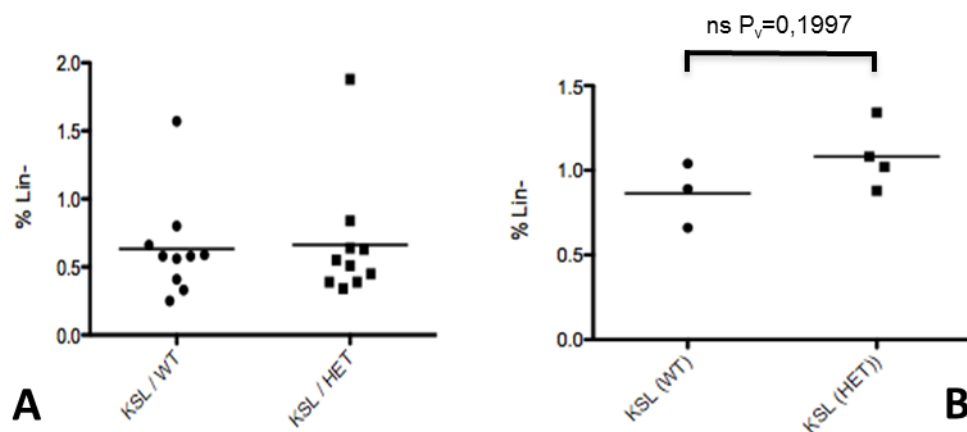


Abbildung 30: Prozentualer Anteil der Kolonien aus Zellen der KSL Population ( $C-kit^+$ ,  $Lin^-$ ,  $Sca-1^+$ ) an der Gesamtzahl der  $Lin^-$  Kolonien (A) im Alter von 6 Monaten und (B) im Alter von 12 Monaten.



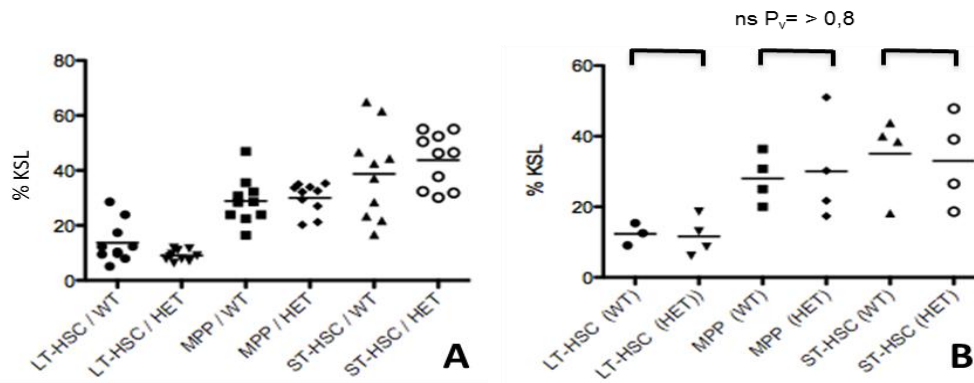


Abbildung 31: Prozentualer Anteil der Kolonien von Stammzellen aus KSL Subpopulationen an der Gesamtzahl der KSL-Kolonien (A) im Alter von 6 Monaten und (B) im Alter von 12 Monaten.

Eine signifikante Vermehrung der Stammzellen bei mutanten Tieren war erst in der Zusammensetzung der weiter differenzierten KL Population ( $\text{Lin}^-$  und  $\text{c-Kit}^+$  Zellen) feststellbar, in welcher die gemeinsamen lymphoiden Vorläuferzellen (common lymphoid progenitors, CLP) nicht mehr identifiziert werden können. Bei gealterten mutanten Tieren (12 Monate), nicht jedoch im Alter von 6 Monaten, war der prozentuale Anteil der KL Populationen an der Gesamtzahl der  $\text{Lin}^-$  Kolonien signifikant erhöht (Abb. 32). Der Anteil der gemeinsamen myeloiden Vorläuferzellen (common myeloid progenitor, CMP) an der KL-Population war in diesem Alter signifikant erniedrigt, während der Anteil der gemeinsamen Megakaryozyten-erythroiden Vorläuferzellen (megakaryocyte-erythroid progenitor, MEP) signifikant erhöht war. Dagegen wurde kein Unterschied hinsichtlich des Anteils der Granulozyten und Makrophagen Vorläuferzellen (granulocyte and macrophage progenitors, GMP) festgestellt (Abb. 33).

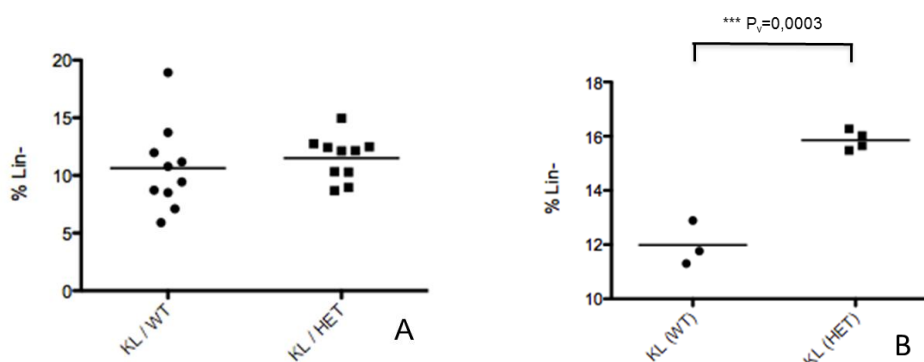


Abbildung 32: Prozentualer Anteil der Kolonien aus Zellen der KL Population ( $\text{C-kit}^+$ ,  $\text{Lin}^-$ ) an der Gesamtzahl der  $\text{Lin}^-$  Kolonien. (A) im Alter von 6 Monaten und (B) im Alter von 12 Monaten.

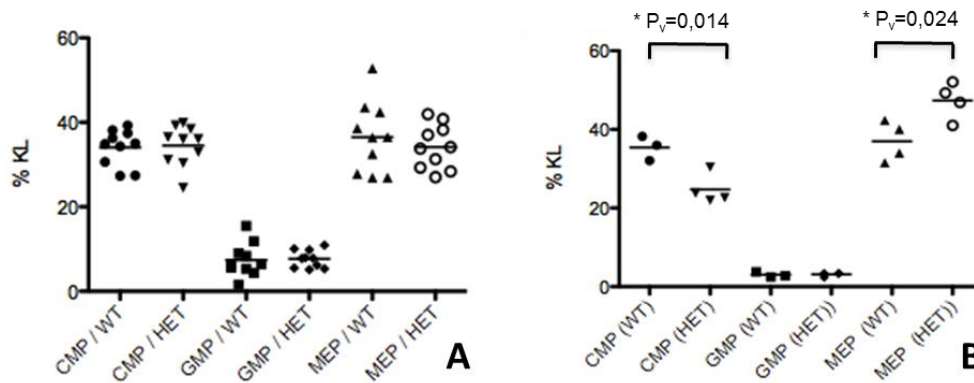


Abbildung 33: Anteil der von CMP, GMP und MEP Zellen stammenden Kolonien an der Gesamtzahl der KL-Kolonien. (A) Tiere im Alter von 6 Monaten; (B) Tiere im Alter von 12 Monaten.

Die mutanten Tiere im Alter von 6 Monaten wiesen eine signifikante Erhöhung der CFU-E Kolonienanzahl (aus gemeinsamen Erythrozyten- und Thrombozyten-Vorläuferzellen) mit und ohne Zugabe von Erythropoetin auf, während die mutanten Tiere aus der älteren Gruppe eine deutliche Tendenz zu einer geringeren Anzahl an CFU-E Kolonien im Vergleich zu den Wildtyptieren zeigten ( $p=0,057$  ohne Epo,  $p=0,103$  mit Epo) (Abb. 34).

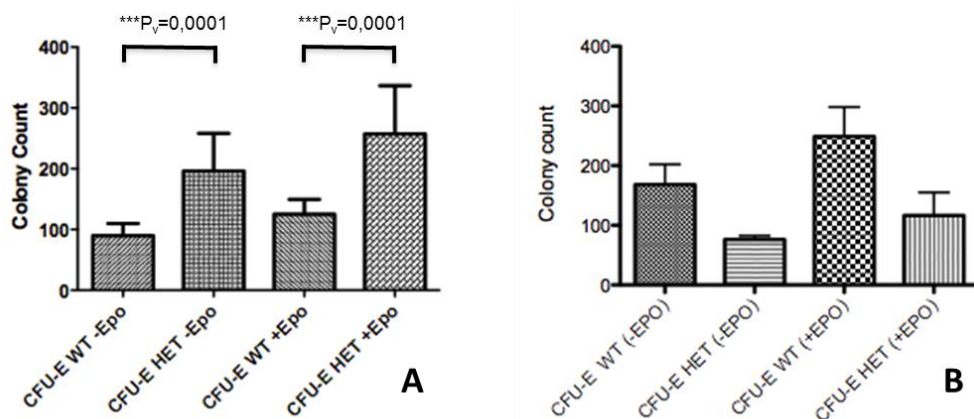


Abbildung 34: Anzahl der aus CFU-E Zellen stammenden Kolonien mit und ohne Erythropoetin Zugabe. (A) Tiere im Alter von 6 Monaten, Anzahl der Tiere:  $n=10$ ; (B) Tiere im Alter von 12 Monaten, Anzahl der Tiere:  $n=4$ . Mittelwert $\pm$ SD

Die Anzahl der aus BFU-E (Erythrozyten-Vorläuferzellen) und CFU-GM (Monozyten- und Granulozyten-Vorläuferzellen) stammenden Kolonien bei mutanten Tieren im Alter von 6 Monaten war zwar tendenziell, jedoch nicht signifikant erhöht. Bei den mit 12 Monaten getesteten Tieren wurde eine signifikante Reduzierung der aus BFU-E und CFU-GM stammenden

Koloniezahlen festgestellt. Die Anzahl der von CFU-GEMM (gemeinsame myeloide Stammzellen) abstammenden Kolonien wies weder bei den jüngeren Tieren, noch in der älteren Gruppe signifikante Unterschiede zwischen Mutanten und Wildtypen auf (Abb. 35).

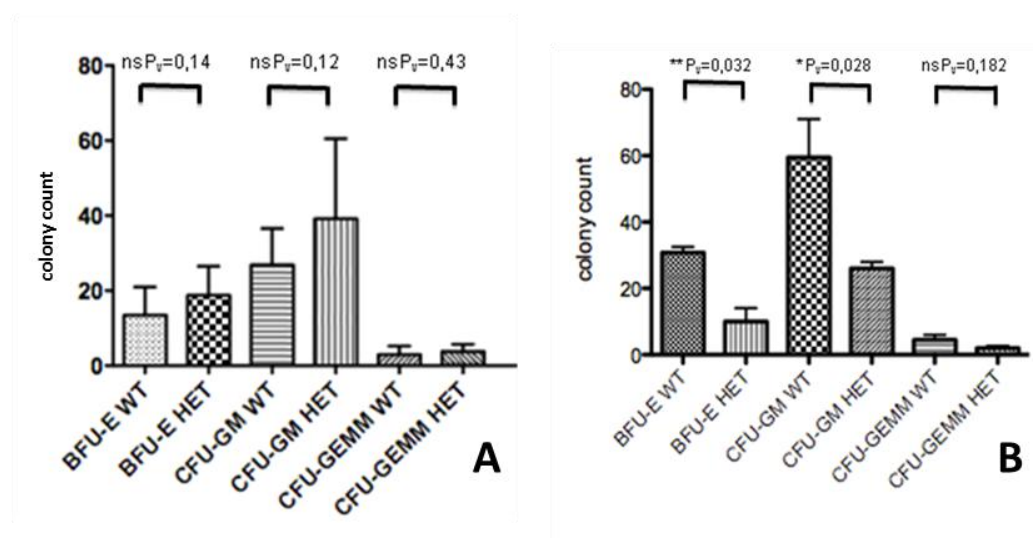


Abbildung 35: Anzahl der aus BFU-E, CFU-GM, CFU-GEMM Zellen stammenden Kolonien mit und ohne Erythropoietin Zugabe. (A) Tiere im Alter von 6 Monaten; Anzahl der Tiere: n=10. (B) Tiere im Alter von 12 Monaten, Anzahl der Tiere: n=4; Mittelwert $\pm$ SEM

Die Lin-negativen KL and KSL Populationen von gealterten mutanten Tieren wiesen im Vergleich zu den Kontrolltieren eine statistisch signifikant höhere Apoptoserate auf. Bei jüngeren Tieren dagegen zeigte der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen an der Gesamtzellzahl keinen signifikanten Unterschied (Abb. 36).

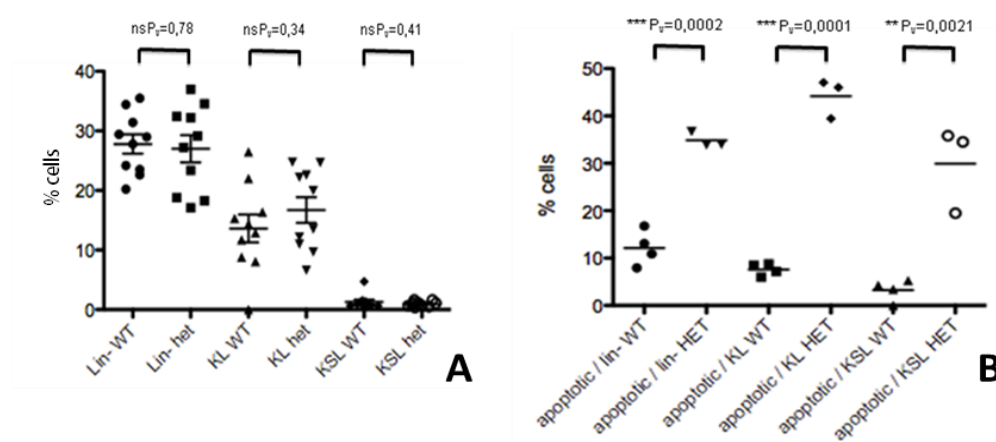


Abbildung 36: Prozentualer Anteil der apoptotischen Zellen in den Lin-negativen KL-, und KLS- Populationen. (A) Tiere im Alter von 6 Monaten; Anzahl der Tiere: n=10. (B) Tiere im Alter von 12 Monaten, Anzahl der Tiere: n=4, Einzelwerte und Mittelwert ( $\pm$ SEM in Abb. A)

Die Gesamtzahl aller Knochenmarkszellen in den Oberschenkelknochen (*Os femoris*) wies eine Tendenz zur Vermehrung bei mutanten Tieren mit 6 Monaten auf und eine signifikante Erhöhung der Zellzahl bei mutanten Tieren mit 12 Monaten im Vergleich zu den entsprechenden Kontrolltieren (Abb. 37).

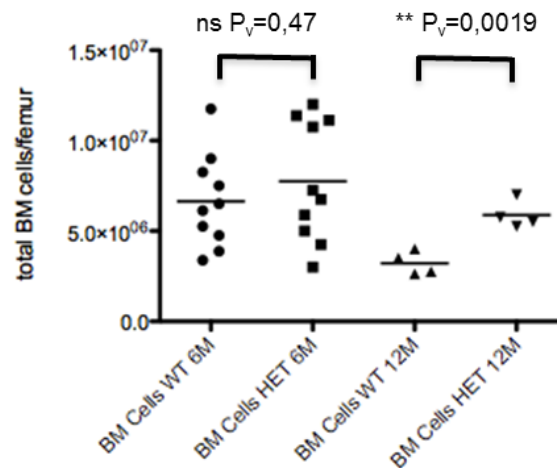


Abbildung 37: Gesamtzahl von Knochenmarkszellen in Oberschenkelknochen (*Os femoris*) bei mutanten und Wildtypen zweier Altersgruppen.

#### 4.9.2. UNTERSUCHUNGEN AN DER MILZ: BESTIMMUNG DER ANZAHL DER KOLONIENBILDENDEN EINHEITEN, DER MEGAKARYOZYTENZAHL UND DES ORGANGEWICHTS

Das Koloniewachstum von erythroiden Vorläuferzellen der Milz im Alter von 6 Monaten zeigte signifikante Unterschiede in der CFU-GM Koloniezahl und eine Tendenz zur Vermehrung von BFU-E Kolonien in mutanten Tieren (Abb. 38).

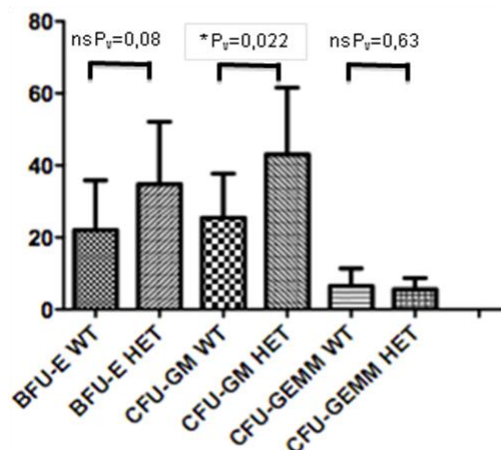


Abbildung 38: Mittelwert der Kolonieanzahl von hämatopoetischen Vorläuferzellen der Milz bei Tieren im Alter von 6 Monaten, Anzahl der Tiere: n=10, Mittelwert±SEM

Die Gesamtzahl der Megakaryozyten im Milzgewebe von 6 Monate alten mutanten Tieren war signifikant höher, als bei Wildtyptieren aus der gleichen Altersgruppe (Abb. 39). Die Tiere im Alter von 12 Monaten wurden nicht untersucht.

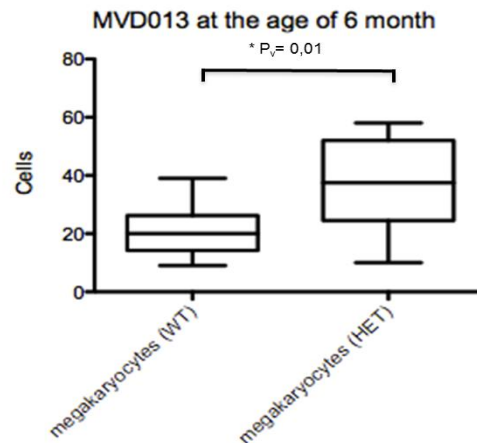


Abbildung 39: Megakaryozytenzahl in der Milz bei Tieren im Alter von 6 Monaten. Boxplot: Mittelwert  $\pm$  2 SD, Minimum und Maximum. Anzahl der Tiere: n=10

Die Ergebnisse der Gewichtsbestimmung der Milz wiesen auf eine leichte Tendenz zu schwereren Milzen bei mutanten Tieren beider Altersgruppen hin (Abb. 40).

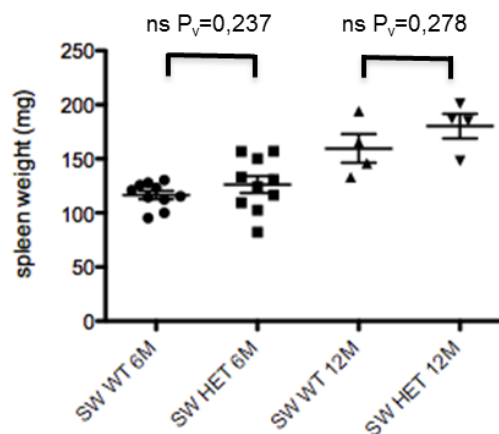


Abbildung 40: Gesamtgewicht der Milz. Vergleich der Wildtypen und mutanten Tiere im Alter von 6 (Anzahl der Tiere: n=10) und 12 Monaten (Anzahl der Tiere: n=4). Einzelwerte und Mittelwert $\pm$ SEM.

## 4.10. GENOTYPISIERUNG

### 4.10.1. FEINKARTIERUNG DER MUTATION

Insgesamt wurden für die Feinkartierung Proben von 71 Tieren, davon 24 Mutanten und 47 Wildtypen, analysiert. Zur Kartierung der ursächlichen Mutation wurden die in Tabelle 9 vorgestellten Mikrosatellitenmarker verwendet. Bei den beiden Mikrosatellitenmarkern D5Mit197 und D5Mit135 waren alle mutanten Tiere heterozygot (C3H / C57BL/6) und alle Wildtiere homozygot (C57BL/6/C57BL/6). Bei den restlichen untersuchten Markern waren genotypisch heterozygote Tiere und homozygote Tiere für das B6-Allel unter den getesteten Tieren beider Phänotypgruppen zu finden. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die gesuchte Mutation im Bereich der Mikrosatellitenmarker D5Mit197 und D5Mit135 (Chr. 5, 59,3-89,7 Mb) lokalisiert ist (Abb. 41).

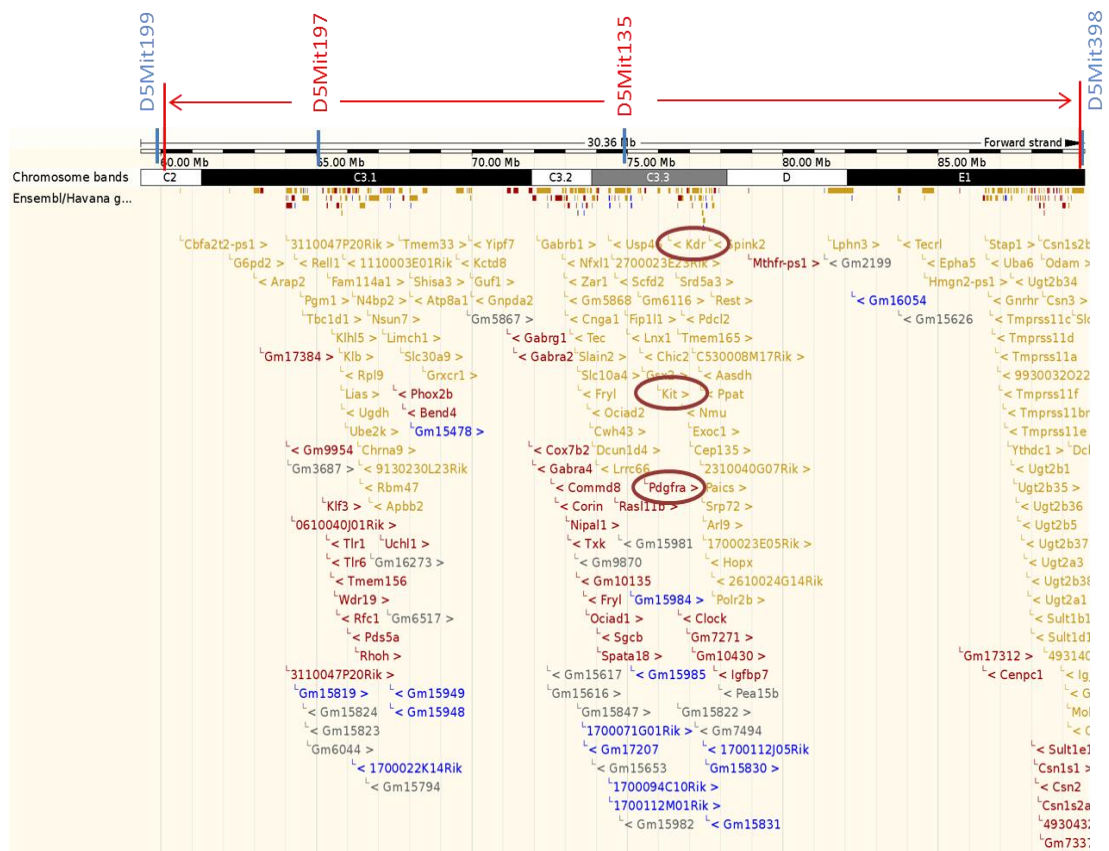


Abbildung 41: Chromosom 5, Bereich zwischen 59,3 und 89,7 Mb. Zusätzlich wurden die Positionen der ausgewählten Mikrosatellitenmarker eingezeichnet und die untersuchten Kandidatengene markiert (<http://www.ensembl.org>).

#### 4.10.2. PRIORISIERUNG UND SEQUENZIERUNG DER KANDIDATENGENE

Mit Hilfe der Software Posmed und anhand der Ergebnisse der Feinkartierung wurde eine Vorauswahl von möglichen Kandidatengenen getroffen (Tabelle 17). Nach Datenbankanalysen und Literaturrecherchen wurden aus diesen vorgeschlagenen Kandidaten die 3 vielversprechendsten Gene ausgewählt:

***Kit*** (auch: *kit oncogene*, *c-Kit*, CD117 oder Stammzellfaktor-Rezeptor) ist ein Protoonkogen und kodiert das Protein Tyrosinkinase KIT aus der Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen. *Kit* spielt eine entscheidende Rolle bei der Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen. Es kommt aber auch in einer Reihe von anderen Zelllinien, wie beispielsweise multipotenten (MPPs) und myeloischen Vorläuferzellen (CMPs) vor. Mutationen des *Kit* Gens spielen eine Rolle bei verschiedenen Krebsformen, nämlich bei Gastrointestinalen Stromatumoren (GIST), Keimzelltumoren, Melanomen und Leukämien [128]. Verschiedene Mutationen in *Kit* wurden auch bei Patienten mit PV nachgewiesen. Bisher ist es doch unklar, ob diese für die Entwicklung des pathologischen Phänotyps relevant sind [129, 130].

***Pdgfra*** (platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide). *Pdgfra* ist ebenfalls eine Rezeptor-Tyrosinkinase. Durch Translokationen wird *Pdgfra* bei myelodysplastischen und myeloproliferativen Erkrankungen sowie beim hypereosinophilen Syndrom und chronischer eosinophiler Leukämie aktiviert [131]. Mutationen dieses Gens spielen eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) [132].

***Kdr*** (auch: *Flk-1*, *Flk1*, *vascular endothelial growth factor receptor-2*, *Vegf receptor-2*, *Vegfr2*, kinase insert domain protein receptor). *Kdr* spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Wachstums der Endothelzellen. Das Gen kodiert einen von zwei Rezeptoren für den vaskulären Endothelwachstumsfaktor. Der Rezeptor wurde als Kinase-Einfügedomäne Rezeptor Typ III bekannt. *Kdr* steht in Verbindung mit Erkrankungen wie der chronischen myeloischen Leukämie (CML), der chronischen myelomonozytären Leukämie (CMML), sowie der akuten myeloischen Leukämie (AML) [133].



Tabelle 17: Priorisieren der Kandidatengene anhand der Software PosMed.

Kandidatengene	Schlüsselworte			
	Polycythämie	Hämatopoese	Tumor	GIST
<i>Kit</i>	63	57	2353	835
<i>Pdgfra</i>	44	32	1801	726
<i>Kdr</i>	56	57	11058	183
<i>Polr2b</i>	18	3	2586	2
<i>Igfbp7</i>	30	2	67	9
<i>Tec</i>	17	19	3399	9
<i>Nmu</i>	7	2	871	1

Die vollständige Sequenzierung des kodierenden Bereichs und der Promoterregionen der Gene *Kit* und *Pdgfra* ergab keine Unterschiede zwischen den untersuchten Mutanten und Wildtypen sowie im Vergleich zur publizierten Sequenz (<http://www.ensembl.org>).

Im *Kdr* Gen wurde ein Doppelpeak im Intronbereich zwischen dem 17. und 18. Exon in der Position 76,347,963 Bp sowohl bei mutanten als auch bei Wildtyptieren gefunden (Abb 42).

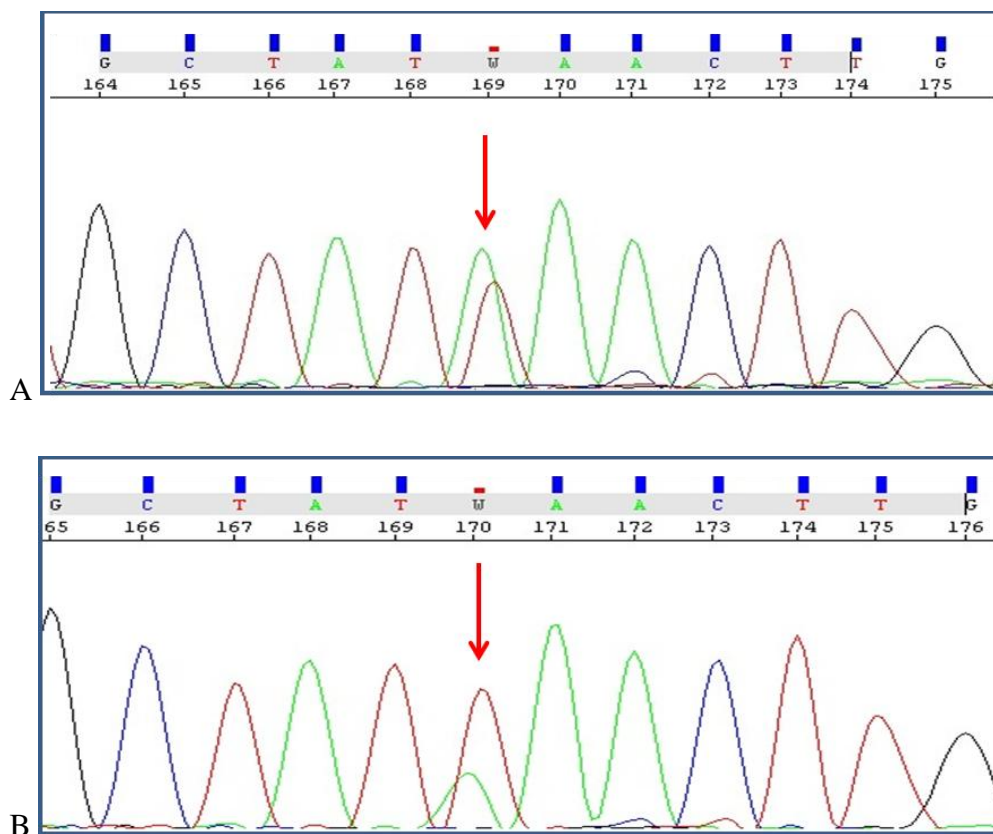


Abbildung 42: Elektropherogramm und Sequenzvergleich des *Kdr* Gens, Exon 17, der rote Pfeil kennzeichnet Position 76,347,963 Bp. (A) Mutantes Tier (B) Wildtypier



## 5. DISKUSSION

Zur phänotypischen und genotypischen Charakterisierung der durch ENU-induzierte Mutagenese erstellten Mauslinie MVD013 wurden Tiere aus der MVD013-Erhaltungszucht durch ein standardisiertes Screening in der Deutschen Mauslinik und zusätzliche Untersuchungen in zahlreichen Kollaborationen vielseitig phänotypisiert. Des Weiteren wurden die Lokalisation der Mutation überprüft und auf einen definierten Bereich des Chromosoms 5 eingegrenzt und drei Kandidatengene in diesem Bereich untersucht.

### 5.1. KLINISCHER PHÄNOTYP

Die Mauslinie MVD013 trägt eine dominant vererbte Mutation. Nach den Mendelschen Regeln der Vererbung ist bei Anpaarung eines heterozygot mutanten Tieres mit einem Wildtypier ein Anteil von 50% der Nachkommen mit dem abnormen Phänotyp zu erwarten. Dies konnte bei unseren Untersuchungen bestätigt werden, da die Nachkommenschaft dieser Anpaarungen zur Hälfte aus phänotypisch mutanten Tieren bestand. Im Gegensatz dazu war bei Verpaarungen von heterozygot mutanten Tieren untereinander der Anteil an phänotypisch mutanten Tieren niedriger als erwartet. Die Anzahl der phänotypisch mutanten Nachkommen lag bei diesen Anpaarungen sogar unter der Zahl, die nach den Mendelschen Regeln bei vollständiger Letalität der homozygoten Tiere und uneingeschränkter Lebensfähigkeit der heterozygot mutanten Nachkommen zu erwarten war. Da wir auch keine zwei eindeutig unterscheidbaren abnormen Phänotypen bei den mutanten Tieren festgestellt haben, sprechen die Ergebnisse für eine vollständige Letalität der homozygot mutanten Tiere und eine niedrigere Überlebensrate von heterozygot mutanten Nachkommen aus Anpaarungen von heterozygot mutanten Elterntieren. Um diese Annahme zu stützen, sind weiteren Untersuchungen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien nötig. Dies wird sinnvollerweise erst nach der Identifizierung der ursächlichen Mutation durchgeführt.

Bei der Untersuchung der Gewichtsentwicklung wurde nachgewiesen, dass schon in der 3. Lebenswoche die mutanten Tiere signifikant leichter sind als

die nicht betroffenen Wurfgeschwister. Die konstante Zunahme im Gewicht bei den Tieren aus beiden Testgruppen deutet auf eine gleichmäßige Körperentwicklung der Mäuse aus beiden Gruppen nach dem Absetzen hin. Entweder sind die neugeborenen mutanten Tiere schon bei der Geburt deutlich leichter als die Wurfgeschwister, oder es findet eine unterschiedliche Gewichtszunahme während der ersten 3 Lebenswochen statt. Auch dieser Punkt ist erst nach der Identifizierung der ursächlichen Mutation abzuklären.

Polycythämia vera (PV) ist durch eine krankhafte Vermehrung der Erythrozyten und in Folge daraus durch eine Erhöhung des Hämatokrits bzw. des Hämoglobins [57, 70] gekennzeichnet. Die mutanten Tiere der Mauslinie MVD013 haben folgende stark ausgeprägte Charakteristik, die dem humanen PV Phänotyp entspricht: eine signifikante Erhöhung der Leukozyten- und Erythrozytenzahl, des Hämatokrits und der Hämoglobinkonzentration, sowie ein stark reduziertes mittleres Zellvolumen der Erythrozyten.

Die Erythrozyten der von PV betroffenen Patienten haben eine erhöhte osmotische Fragilität [134], was auch bei den mutanten Tieren von Mauslinie MVD013 nachgewiesen wurde.

Die Bestimmung der Retikulozytenzahl und die Klassifikation nach dem Reifeindex geben Auskunft über die Aktivität der Erythropoese. Der prozentuale Anteil der Retikulozyten an der Gesamterthrozytenzahl erlaubt eine Aussage über die Lebensdauer der Erythrozyten, während die absolute Anzahl der Retikulozyten eine Aussage über die Leistungsfähigkeit der Erythropoese erlaubt. Bei mutanten MVD013 Tieren wurde eine signifikant höhere Gesamt-Retikulozytenzahl nachgewiesen, während im prozentualen Anteil der Retikulozyten an der Erythrozytenzahl kein Unterschied zwischen mutanten Mäusen und Wildtyptieren festgestellt wurde. Die Ergebnisse weisen somit auf eine normale Lebensdauer der Erythrozyten und auf eine verstärkte Erythropoese hin [135]. Für die PV typisch sind auch eine Granulozytose sowie eine leichte Basophilie und Eosinophilie [136], die ebenfalls anhand einer Analyse des Differentialblutbildes nachgewiesen wurden.

Während des intraperitonealen Glukose Toleranz Tests wurde ein signifikant niedrigerer Blutglukosespiegel bei mutanten Tieren beider Geschlechter gemessen. Die Glucose spielt eine entscheidende Rolle im Stoffwechsel der Erythrozyten, welche ihren Energiebedarf überwiegend durch die Reaktionen

der anaeroben Glykolyse decken [137]. Wegen der vermehrten Anzahl an Erythrozyten im Blut von mutanten Tieren erhöht sich damit der Glukoseverbrauch, was zu einem niedrigeren Glukosespiegel führen kann. Mehrere klinische Studien berichten über Hypoglykämie bei Patienten mit PV [138-140], diese wird nicht nur durch die erhöhte Erythrozytenzahl, sondern auch von einer starken Leukozytose verursacht. Die niedrigen Glukosewerte im Plasma von mutanten Tieren nach Futterentzug über Nacht bestätigen den Befund des intraperitonealen Glukose Toleranz Tests.

Der größte Teil von PV-Patienten hat niedrige Eisenwerte. Die Erklärung dafür liegt in einem gesteigerten Eisenbedarf für die Hämoglobinsynthese aufgrund der verstärkten Erythropoese [141]. Dabei ist die Transferrinsättigung meistens vermindert, während TIBC und UIBC im Fall von PV oft erhöht sind [142].

Auch bei den mutanten Tieren der Mauslinie MVD013 haben wir einen signifikant niedrigeren Eisenspiegel in Serum festgestellt. Da wir aber keine Unterschiede zwischen den mutanten Tieren und Wildtyptieren im Serum-Ferritin-Spiegel gefunden haben, können wir zwar von einem erhöhten Eisenverbrauch ausgehen, nicht jedoch von klinisch manifestem Eisenmangel sprechen. Die signifikant niedrigeren Serum-Transferrin Werte bei den mutanten Mäusen, sowie die aus der Plasma-Eisenkonzentration und den UIBC-Werten berechneten niedrigeren TIBC Werte und die unveränderte Transferrinsättigung bei mutanten Tieren stehen im Gegensatz zum Krankheitsbild bei der humanen PV.

Um eine sekundäre Erythrozytose auszuschließen, wurden eine Blutgasanalyse und die Bestimmung der Konzentration des Erythropoietins im Plasma durchgeführt. Eine verminderte Sauerstoffsättigung des Blutes ist eine der häufigsten Ursachen für sekundäre Polyglobulien [58]. Bei den mutanten Tieren der Linie MVD013 wurde ein physiologischer Sauerstoffpartialdruck nachgewiesen, was gegen eine durch Hypoxie verursachte Polyglobulie spricht [143]. Außerdem weisen die gegenüber den Kontrolltieren leicht erhöhten Werte der mutanten Tiere beim Kohlendioxidpartialdruck ( $p\text{CO}_2$ ), der Hydrogencarbonatkonzentration ( $\text{HCO}_3$ ) und dem Aktuellen Basenüberschuss (ABE) auf eine leichte metabolische Alkalose hin [144].

In der Literatur wurde eine Verbindung zwischen der metabolischen Alkalose und einer vermehrten Gasbildung im Darm bei Patienten mit einem erhöhten

Risiko für die Entwicklung eines toxischen Megakolons beschrieben [145]. Ein vergleichbarer Effekt könnte für das Vorliegen einer Alkalose bei den älteren mutanten Tieren verantwortlich sein, da diese zum Teil ein Megaceacum entwickeln.

Eine weitere Ursache der sekundären Polyglobulie ist eine gesteigerte hormonelle Stimulation der Erythropoese durch einen erhöhten Erythropoietinspiegel. Um dies als Ursache der Polycythämie auszuschließen [78] wurde die Erythropoietinkonzentration bei mutanten Mäusen und normalen Wurfgeschwistern der Linie MVD013 bestimmt. Es wurde keine vermehrte Erythropoietinproduktion in mutanten Tieren nachgewiesen. Aufgrund dieser Ergebnisse gehen wir davon aus, dass die Polycythämie in der Mauslinie MVD013 nicht durch eine hormonelle Stimulation der Erythropoese verursacht wird. Eine Mutation des Erythropoetinrezeptors, welche die Ursache der primären angeborenen Polycythämie des Menschen ist [72], kann bei der Mauslinie MVD013 ausgeschlossen werden, da das entsprechende Gen auf Chromosom 9 lokalisiert ist und somit nicht im Mappingbereich liegt.

Die PV ist eine klonale Erkrankung der hämatopoetischen Stammzellen, die durch eine Hyperplasie der 3 Zellreihen (Leukozyten, Thrombozyten und Erythrozyten) im Knochenmark charakterisiert ist [146]. Im Gegensatz zu den jüngeren Tieren, bei denen die Anzahl der CFU-E Kolonien mit und ohne Erythropoetin Stimulation signifikant höher war, als bei den altersgleichen Wildtyptieren, und die hinsichtlich der Anzahl von CFU-GM und BFU-E Kolonien keine signifikanten Unterschiede zwischen mutanten und Wildtyp-Mäusen aufwiesen, fanden sich bei den älteren mutanten Tieren im Vergleich zu altersgleichen Kontrolltieren erniedrigte Koloniezahlen von CFU-E, CFU-GM und BFU-E im Knochenmark. Vermutlich wurde die Stammzellenproduktion im fortgeschrittenen Alter kompensatorisch herunterreguliert. Die älteren mutante Tiere wiesen außerdem eine sehr stark erhöhte Apoptoserate in allen hämatopoetischen Stammzellenpopulationen ( $KL^+$ ,  $LKS^+$ ,  $Lin^-$ ) auf, während die mutanten Tiere aus der jüngeren Gruppe auch in dieser Hinsicht keinen signifikanten Unterschied zu den Kontrollen zeigten. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen ist die klassische PV durch eine niedrigere Apoptoserate der hämatopoetischen Stammzellen charakterisiert [147]. Im weit fortgeschrittenen Stadium der Polycythämia vera kann jedoch

eine Myelosuppression auftreten, was auch als *Post-Polycythämia vera Myelofibrosis* bezeichnet wird [148]. Das Knochenmarkgewebe wird durch Sklerosierung des Markraums verdrängt, was zur verminderten Produktion von Blutzellen und zur Migration von unreifen Blutzellen ins periphere Blut führt [149]. Die Ergebnisse der Untersuchungen an den hämatopoetischen Knochenmarkstammzellen der vorgestellten Mauslinie zeigen eine verminderte Gesamtzahl der hämatopoetischen Vorläuferzellen bei älteren Mutanten, und dass ein größerer Anteil der Zellen bereits in einem relativ undifferenzierten Stadium abstirbt. Dies kann eventuell auf sekundäre myelosuppressive Prozesse im Knochenmark hinweisen. Wahrscheinlich treten bei den älteren mutanten Tieren (über 1,5 Jahren alt) auch Symptome von sekundärer Anämie auf, was allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wurde.

Trotz einer verminderten Anzahl an myeloischen Vorläuferzellen im Knochenmark der älteren mutanten Tieren blieben die Hämatokritwerte pathologisch erhöht, was eventuell für eine erhöhte Teilungsaktivität der verbliebenen Knochenmarkzellen spricht. Außerdem weisen die immunhistochemischen Untersuchungen des Milzgewebes eine Tendenz zur prozentualen Vermehrung von erythroiden Vorläuferzellen und reifen Erythrozyten in der Milz bei mutanten Tieren auf, was für eine vermehrte Hämatopoese in extramedullären blutbildenden Organen spricht.

Es ist bereits bekannt, dass die interstitiellen Cajal-Zellen eine entscheidende Rolle nicht nur in der Entstehung von gastrointestinalen Stromatumoren [99], sondern auch in der Darmperistaltik spielen [150]. Patienten mit kologener Obstipation (auch Slow-Transit Obstipation), sowie Chagas-Krankheit als auch Hirschsprung-Krankheit zeigen eine verminderte Anzahl von interstitiellen Cajal-Zellen im Darmgewebe [151, 152]. Cajal-Zellen exprimieren den Tyrosin-Kinase Rezeptor Kit und weisen eine positive immunhistochemische Anfärbbarkeit mit anti-CD117(kit)-Antikörpern auf [153]. Bei betroffenen Patienten mit verminderter Darmperistaltik wurde auch eine verminderte Kit mRNA- und Protein-Expression im Kolongewebe nachgewiesen. Außerdem berichtet eine Studie von Tong WD *et al.* von einigen Fällen, in denen eine *Kit* Mutation bei Patienten mit *Slow-Transit Obstipation* nachgewiesen wurde [154]. Auch eine Studie von Huizinga DJ *et al.* weist auf eine gestörte Entwicklung der Cajal-Zellen als Ursache einer verminderten Darmperistaltik

bei Patienten mit *Kit* Mutationen hin [155]. Die Ergebnisse von mehreren Experimenten mit Knochenmarktransplantationen im Mausmodell beweisen die Migration von Zellen aus dem Knochenmark (Bone Marrow-Derived Cells, BMDC) in das Darmgewebe [156]. Die Forschungsgruppe von Liu D. *et al.* hat die Migration von BMDC in den *Plexus myentericus* und die spätere Differenzierung von diesen zu Cajal-Zellen in einem Mausmodell nachgewiesen [157]. Die mutanten Tiere der Mauslinie MVD013 entwickeln eine massive Erweiterung des Caecums, welches mit verhärteten, zusammengepressten Futtermassen gefüllt ist. Die Ursache dafür kann in einer Störung der Darmperistaltik aufgrund einer gestörten Funktion der Cajal-Zellen liegen. Da die beobachteten mesenchymalen Tumoren partiell *Kit* exprimieren, spricht vieles dafür, dass es sich um gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) handelt. Da diese Art von Tumoren sich ebenfalls aus den Cajal-Zellen entwickelt, könnten diese Neoplasien für eine Dysfunktion des *Plexus myentericus* verantwortlich sein.

## 5.2. GENETISCHE CHARAKTERISIERUNG

Aufgrund der phänotypischen Aufteilung der Nachkommen aus Anpaarungen von heterozygot mutanten Tieren mit Wildtyp-Tieren kann man auf eine monogene dominante Vererbung des Phänotyps schließen. Nach den Ergebnissen der Untersuchungen zur Kartierung der Mutation ist davon auszugehen, dass die ursächliche Mutation auf Chromosom 5 zwischen 59,3-89,7 Mb lokalisiert ist. Ausgehend vom klinischen Phänotyp wurden potenzielle Kandidatengene in dieser Region untersucht. Die ausgewählte Kandidatengene (*Kit*, *Kdr* und *Pdgfra*) sind in den Geweben, die Veränderungen zeigen, stark exprimiert, und es wurde nachgewiesen, dass diese Tyrosin-Kinase Rezeptoren eine wichtige Rolle in der Regulation der Proliferation und Zelldifferenzierung spielen [158]. Es wurde beschrieben, dass Mutationen in diesen Genen vergleichbare Phänotypen verursachen können [129, 159, 160]. Dennoch konnte in den phänotypisch mutanten Tieren keine Mutation in den kodierenden Bereichen dieser Gene nachgewiesen werden. Der einzige SNP Polymorphismus, der in unseren Tieren im Vergleich zu den publizierten Sequenzen gefunden wurde, lag im Intronbereich und war sowohl bei mutanten Mäusen als auch bei Wildtyp-Tieren nachweisbar.

Trotz des negativen Sequenzierungsergebnisses für die drei Kandidatengene spricht vieles dafür, dass die Mutation einen Einfluss auf entsprechende Signalwege hat. Weiterführende Untersuchungen wie z.B. Expressionsanalysen der schon untersuchten Gene, sowie die Sequenzierung von weiteren Kandidatengenen sind erforderlich. Für einen umfassenden Überblick über die Genomsequenz im gesamten Mappingbereich könnten sog. *Next Generation Sequencing* Technologien genutzt werden. Dabei ist zu bedenken, dass ein *Exome-Sequencing* möglicherweise nicht ausreicht, da auch Mutationen in nicht kodierenden Genomabschnitten krankhafte Veränderungen auslösen können [161].

### 5.3. FAZIT UND AUSBLICK

Aus der vorhandenen Literatur kann man schließen, dass es Zusammenhänge zwischen der Funktionalität der Knochenmarkstammzellen, der Entstehung myeloproliferativen Erkrankungen und gastrointestinaler Stromatumoren sowie Störungen in der Darmperistaltik gibt. Meines Wissens wurde bis jetzt jedoch kein Mausmodell mit gleichzeitig auftretenden GIST und Polycythämia vera Symptomen beschrieben und auch kein vergleichbarer Fall bei einem humanen Patienten. Die mutanten Tiere aus der Mauslinie MVD013 zeigen phänotypische Aspekte aller zuvor genannten Erkrankungen, was auf eine gemeinsame genetische Ursache für die auftretende Symptomatik hindeutet. Die mutante Mauslinie MVD013 ist somit ein vielversprechendes Mausmodell für die Untersuchung der pathogenetischen Zusammenhänge dieser Krankheitskomplexe.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

### **Genetische und phänotypische Charakterisierung eines Mausmodells für erbliche Polycythämie.**

Im Rahmen des Münchener ENU-Mausmutagenese-Projekts wurde durch chemische Mutagenese die dominante mutante Mauslinie MVD013 erzeugt. Die Linie wurde an Hand einer erhöhten Zahl und eines verringerten Volumens der Erythrozyten etabliert. Außerdem zeigten einzelne ältere mutante Tiere dieser Linie zusätzliche pathologische Veränderungen wie Darmtumoren und Megakolon. Ziel der Arbeit war es, Untersuchungen zur Identifizierung der ursächlichen Mutation in der Mauslinie MVD013 durchzuführen und die pathologischen Auswirkungen zu charakterisieren, um so ihre Eignung als Tiermodell für Polycythämie und Tumorerkrankungen zu evaluieren.

Mittels der durchgeführten Grob- und Feinkartierungen wurde die Lage der ursächlichen Mutation auf Chromosom 5, 59,3-89,7 Mb eingegrenzt. Durch Sequenzanalyse der Kandidatengene *Kit*, *Pdgfra* und *Kdr* konnte keine Mutation im kodierenden Bereich dieser Gene nachgewiesen werden.

Die mutante Mauslinie MVD013 wurde im Jahr 2008 im Primärscreen der Deutsche Mauslinik untersucht. Zusammen mit den zusätzlichen sekundären Untersuchungen wurde eine umfassende Phänotypbeschreibung der Mauslinie MVD013 erstellt. Die hämatologische Analyse zeigt ein der humanen Polycythämia vera entsprechendes Blutbild, mit leichter Abweichung vom typischen PV Befund in Richtung Thrombozytopenie. Die klinisch-chemischen Untersuchungen ergaben deutlich erniedrigte Glukosespiegel und Eisenkonzentrationen im Plasma der mutanten Tiere. Die Ergebnisse der Analyse zusätzlicher Parameter des Eisenstoffwechsels und die Ergebnissen des intraperitonealen Glukosetoleranztests deuten auf einen erhöhten Eisen- und Glukoseverbrauch bei mutanten Tieren hin. Anhand der Analyse der Blutgasparameter und der Erythropoetinkonzentration im Serum wurde das Vorliegen einer sekundären Erythrozytose ausgeschlossen. Die Untersuchungen der hämatopoetischen Vorläuferzellen geben einen Hinweis auf myelosuppressive Prozesse im Knochenmark der gealterten mutanten Tiere, was mit Symptomen der humanen Post-Polycythämia vera



Myelofibrosis vergleichbar ist. Die mutanten Tiere der Linie MVD013 entwickeln gastrointestinale Stromatumoren in Magen und Darm sowie eine Dilatation (Megaceacum) im Bereich des Blinddarms.

Somit kann die dominant mutante Mauslinie MVD013 als ein vielversprechendes Mausmodell für Polycythämia vera, gastrointestinale Stromatumoren und pathologische Veränderungen mit Störungen der Darmperistaltik dienen.

## 7. SUMMARY

### **Genetic and phenotypic characterization of a mouse model for inherited polycythaemia.**

MVD013, a mutant mouse line showing a dominantly inherited polycythemia phenotype in the peripheral blood cell count, was established within the Munich ENU mouse mutagenesis project by the Clinical Chemistry Screen. Additionally, gastrointestinal tumors and the development of a Megaceacum were observed in individual aged mutant mice.

The aim of this project was to characterizing the mutant phenotype of this mouse line and to conduct investigations to identify the causative mutation, in order to evaluate the usefulness of MVD013 mice as a model of polycythemia and other types of cancer.

SNP analysis and additional fine mapping showed the highest possibility of the mutation to be located on chromosome 5 between 59,3 and 89,7 Mb. We sequenced the most promising candidate genes *Kdr*, *Kit* and *Pdgfra*. The latter two genes are associated with gastro-intestinal stromal tumors (GIST) and myeloproliferative disorders. *Kdr* coding for the vascular endothelial growth factor receptor is essential for the differentiation of hematopoietic precursors and is associated with several kinds of cancers. Our results show that these three genes do not have a mutation in the coding part of the gene and in promoter regions of the *Kit* or *Pdgfra* gene.

Based on a comprehensive phenotypic characterization of this mouse line in a primary screen conducted 2008 by the German Mouse Clinic, and a variety of additional investigation, a comprehensive description of the mutant phenotype has been generated. Concerning the haematological parameters MVD013 mutant mice show similar symptoms like human patients suffering from Polycythemia vera (PV), with the exception of a platelet count tending towards thrombocytopenia, what is usually not seen in human PV-patients. The results obtained from clinical-chemical plasma analysis indicated decreased plasma glucose and iron levels in mutant animals. Together with the data of the IpGTT and additional measures of further iron-metabolism-related parameters, these results indicate an increased glucose and iron consumption in mutant MVD013

mice. A secondary erythrocytosis due to Erythropoietin-stimulation was excluded by additional analyses such as measurement of erythropoietin level in plasma and blood gas analysis. Further the results suggest an increased iron and glucose consumption in mutant mice, and the development of Gastrointestinal stromal tumors (GIST) in association with an impaired intestinal motility leading to Megacecum-development.

This mouse line might represent a model that can be used to elucidate regulatory mechanisms that playing a role in the development of GISTs, peristaltic dysfunction or polycythemia in humans.

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Rüllicke, T., Transgene, Transgenese, Transgene Tiere: Methoden Der Nichthomologen Dna-Rekombination. 2001.
2. Waterston, R.H., et al., Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 2002. 420(6915): p. 520-62.
3. Wagner, S., et al., [Characterization of ENU-mutant mice. Animal models for human diseases using morphological and molecular methods]. *Pathologe*. 31 Suppl 2: p. 147-52.
4. Hrabe de Angelis, M. and R. Balling, Large scale ENU screens in the mouse: genetics meets genomics. *Mutat Res*, 1998. 400(1-2): p. 25-32.
5. S. Wagner, J.C.-W., M. Rosemann, L. Becker, M. Tost, P. Silva-Buttkus, T. Klein-Rodewald, H. Fuchs, F. Neff, M. Hrabé de Angelis, I. Esposito, Charakterisierung von ENU-Mausmutanten. 2010.
6. Favor, J., et al., A dose-response analysis of ethylnitrosourea-induced recessive specific-locus mutations in treated spermatogonia of the mouse. *Mutat Res*, 1990. 231(1): p. 47-54.
7. Russell, W.L., et al., Specific-locus test shows ethylnitrosourea to be the most potent mutagen in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. 76(11): p. 5818-9.
8. Hrabe de Angelis, M. and M. Strivens, Large-scale production of mouse phenotypes: the search for animal models for inherited diseases in humans. *Brief Bioinform*, 2001. 2(2): p. 170-80.
9. Justice, M.J., et al., Mouse ENU mutagenesis. *Hum Mol Genet*, 1999. 8(10): p. 1955-63.
10. Shibuya, T. and K. Morimoto, A review of the genotoxicity of 1-ethyl-1-nitrosourea. *Mutat Res*, 1993. 297(1): p. 3-38.
11. Rathkolb, B., et al., Large-scale N-ethyl-N-nitrosourea mutagenesis of mice--from phenotypes to genes. *Exp Physiol*, 2000. 85(6): p. 635-44.
12. Rathkolb, B.K., O.; Balling, R.; Hrabe de Angelis, M.; Wolf, E., Discovery and functional characterization of new genes by large scale ENU mutagenesis in mice. 1999.

13. Aigner, B., et al., Generation of ENU-induced mouse mutants with hypocholesterolemia: novel tools for dissecting plasma lipoprotein homeostasis. *Lipids*, 2007. 42(8): p. 731-7.
14. Mohr, M., et al., Hypercholesterolemia in ENU-induced mouse mutants. *J Lipid Res*, 2004. 45(11): p. 2132-7.
15. Aigner, B., et al., N-ethyl-N-nitrosourea mutagenesis produced a small number of mice with altered plasma electrolyte levels. *J Biomed Sci*, 2009. 16: p. 53.
16. Rathkolb, B., et al., The clinical-chemical screen in the Munich ENU Mouse Mutagenesis Project: screening for clinically relevant phenotypes. *Mamm Genome*, 2000. 11(7): p. 543-6.
17. Cordes, S.P., N-ethyl-N-nitrosourea mutagenesis: boarding the mouse mutant express. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2005. 69(3): p. 426-39.
18. Brown, M.J. and K.A. Murray, Phenotyping of genetically engineered mice: humane, ethical, environmental, and husbandry issues. *ILAR J*, 2006. 47(2): p. 118-23.
19. Gailus-Durner, V., et al., Introducing the German Mouse Clinic: open access platform for standardized phenotyping. *Nat Methods*, 2005. 2(6): p. 403-4.
20. Gailus-Durner, V., et al., Systemic first-line phenotyping. *Methods Mol Biol*, 2009. 530: p. 463-509.
21. Fuchs, H., et al., Screening for dysmorphological abnormalities--a powerful tool to isolate new mouse mutants. *Mamm Genome*, 2000. 11(7): p. 528-30.
22. Fuchs, H., et al., Phenotypic characterization of mouse models for bone-related diseases in the German Mouse Clinic. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2008. 8(1): p. 13-4.
23. Brown, S.D., P. Chambon, and M.H. de Angelis, EMPReSS: standardized phenotype screens for functional annotation of the mouse genome. *Nat Genet*, 2005. 37(11): p. 1155.
24. Schneider, I., et al., Systematic, standardized and comprehensive neurological phenotyping of inbred mice strains in the German Mouse Clinic. *J Neurosci Methods*, 2006. 157(1): p. 82-90.

25. Favor, J., A comparison of the dominant cataract and recessive specific-locus mutation rates induced by treatment of male mice with ethylnitrosourea. *Mutat Res*, 1983. 110(2): p. 367-82.
26. Puk, O., et al., Variations of eye size parameters among different strains of mice. *Mamm Genome*, 2006. 17(8): p. 851-7.
27. Klempt, M., et al., Genotype-specific environmental impact on the variance of blood values in inbred and F1 hybrid mice. *Mamm Genome*, 2006. 17(2): p. 93-102.
28. Alessandrini, F., et al., ENU mouse mutagenesis: generation of mouse mutants with aberrant plasma IgE levels. *Int Arch Allergy Immunol*, 2001. 124(1-3): p. 25-8.
29. Schoensiegel, F., et al., Atrial natriuretic peptide and osteopontin are useful markers of cardiac disorders in mice. *Comp Med*, 2007. 57(6): p. 546-53.
30. Hoelter, S.M., et al., "Sighted C3H" mice--a tool for analysing the influence of vision on mouse behaviour? *Front Biosci*, 2008. 13: p. 5810-23.
31. Barrantes Idel, B., et al., Generation and characterization of dickkopf3 mutant mice. *Mol Cell Biol*, 2006. 26(6): p. 2317-26.
32. Horsch, M., et al., Systematic gene expression profiling of mouse model series reveals coexpressed genes. *Proteomics*, 2008. 8(6): p. 1248-56.
33. Meyer, C.W., et al., Power matters in closing the phenotyping gap. *Naturwissenschaften*, 2007. 94(5): p. 401-6.
34. Kunder, S., et al., A comprehensive antibody panel for immunohistochemical analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded hematopoietic neoplasms of mice: analysis of mouse specific and human antibodies cross-reactive with murine tissue. *Toxicol Pathol*, 2007. 35(3): p. 366-75.
35. Mossbrugger, I., et al., Standardized morphological phenotyping of mouse models of human diseases within the German Mouse Clinic. *Verh Dtsch Ges Pathol*, 2007. 91: p. 98-103.
36. Gates, H., A.M. Mallon, and S.D. Brown, High-throughput mouse phenotyping. *Methods*.

37. Fuchs, H., et al., The German Mouse Clinic: a platform for systemic phenotype analysis of mouse models. *Curr Pharm Biotechnol*, 2009. 10(2): p. 236-43.
38. Fuchs, H., et al., Mouse phenotyping. *Methods*. 53(2): p. 120-35.
39. Kemter, E., et al., Mutation of the Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter NKCC2 in mice is associated with severe polyuria and a urea-selective concentrating defect without hyperreninemia. *Am J Physiol Renal Physiol*. 298(6): p. F1405-15.
40. Soker, T., et al., Pleiotropic effects in Eya3 knockout mice. *BMC Dev Biol*, 2008. 8: p. 118.
41. Mikkola, H.K. and S.H. Orkin, The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development*, 2006. 133(19): p. 3733-44.
42. Godin, I. and A. Cumano, The hare and the tortoise: an embryonic haematopoietic race. *Nat Rev Immunol*, 2002. 2(8): p. 593-604.
43. Ghiaur, G., et al., Rac1 is essential for intraembryonic hematopoiesis and for the initial seeding of fetal liver with definitive hematopoietic progenitor cells. *Blood*, 2008. 111(7): p. 3313-21.
44. Johnson, G.R. and M.A. Moore, Role of stem cell migration in initiation of mouse foetal liver haemopoiesis. *Nature*, 1975. 258(5537): p. 726-8.
45. Moore, M.A. and D. Metcalf, Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *Br J Haematol*, 1970. 18(3): p. 279-96.
46. Palis, J., et al., Spatial and temporal emergence of high proliferative potential hematopoietic precursors during murine embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(8): p. 4528-33.
47. Gekas, C., et al., The placenta is a niche for hematopoietic stem cells. *Dev Cell*, 2005. 8(3): p. 365-75.
48. Cancelas, J.A., et al., Rac GTPases differentially integrate signals regulating hematopoietic stem cell localization. *Nat Med*, 2005. 11(8): p. 886-91.
49. Siqueira, R.C., et al., Possible mechanisms of retinal function recovery with the use of cell therapy with bone marrow-derived stem cells. *Arq Bras Oftalmol*. 73(5): p. 474-9.

50. Vahlensieck, M. and H.M. Schmidt, [The normal bone marrow and its variations in MRT]. *Radiologe*, 2000. 40(8): p. 688-93.
51. Sieburg, H.B., et al., The hematopoietic stem compartment consists of a limited number of discrete stem cell subsets. *Blood*, 2006. 107(6): p. 2311-6.
52. Muller-Sieburg, C.E., et al., Myeloid-biased hematopoietic stem cells have extensive self-renewal capacity but generate diminished lymphoid progeny with impaired IL-7 responsiveness. *Blood*, 2004. 103(11): p. 4111-8.
53. Jürgen Schölmerich, S.B., H. Drexler, M. Hallek, W. Hiddemann, W.H. Hörl, H. Klein, M. Landthaler, K. Lenz und K. Mann, et al. Jürgen Schölmerich, S. Burdach, H. Drexler, M. Hallek, W. Hiddemann, W.H. Hörl, H. Klein, M. Landthaler, K. Lenz und K. Mann, et al., *Medizinische Therapie 2005|2006* 2005: p. 271-274.
54. Reinhard Andreesen, H.H., *Klinische Hämatologie*. 2009. 344: p. 65-66.
55. Ulf Dettmer, M.F., Eva Kächler, Andreas Sönnichsen, *Intensivkurs Biochemie: StudentConsult*. Auflage: 1 ed2005, München: Elsevier GmbH; . 393-396.
56. Ulf Dettmer, M.F., Eva Kächler, Andreas Sönnichsen, *Intensivkurs Biochemie*. 2005: p. 393-394.
57. Kohler, D. and D. Dellweg, [Polycythemia]. *Dtsch Med Wochenschr*. 135(46): p. 2300-3.
58. Cazzola, M., Serum erythropoietin concentration as a diagnostic tool for polycythemia vera. *Haematologica*, 2004. 89(10): p. 1159-60.
59. Modi, N., Avoiding hypernatraemic dehydration in healthy term infants. *Arch Dis Child*, 2007. 92(6): p. 474-5.
60. Bianchetti, M.G., G.D. Simonetti, and A. Bettinelli, Body fluids and salt metabolism - Part I. *Ital J Pediatr*, 2009. 35(1): p. 36.
61. Peruzzo, M., et al., Body fluids and salt metabolism - part II. *Ital J Pediatr*. 36(1): p. 78.
62. Halperin, M.L., et al., Properties permitting the renal cortex to be the oxygen sensor for the release of erythropoietin: clinical implications. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2006. 1(5): p. 1049-53.



63. Chasis, J.A. and N. Mohandas, Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis. *Blood*, 2008. 112(3): p. 470-8.
64. Schuler, B., et al., Optimal hematocrit for maximal exercise performance in acute and chronic erythropoietin-treated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(1): p. 419-23.
65. Corno, A.F., et al., Chronic hypoxia: a model for cyanotic congenital heart defects. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 2002. 124(1): p. 105-12.
66. Sokol, L., et al., Primary familial polycythemia: a frameshift mutation in the erythropoietin receptor gene and increased sensitivity of erythroid progenitors to erythropoietin. *Blood*, 1995. 86(1): p. 15-22.
67. Sergeeva, A., et al., Congenital polycythemia in Chuvashia. *Blood*, 1997. 89(6): p. 2148-54.
68. Perrotta, S., et al., Von Hippel-Lindau-dependent polycythemia is endemic on the island of Ischia: identification of a novel cluster. *Blood*, 2006. 107(2): p. 514-9.
69. Ang, S.O., et al., Disruption of oxygen homeostasis underlies congenital Chuvash polycythemia. *Nat Genet*, 2002. 32(4): p. 614-21.
70. Siegel, F.P. and P.E. Petrides, Congenital and acquired polycythemias. *Dtsch Arztebl Int*, 2008. 105(4): p. 62-8.
71. Niu, X., et al., Altered cytokine profiles in patients with Chuvash polycythemia. *Am J Hematol*, 2009. 84(2): p. 74-8.
72. Huang, L.J., Y.M. Shen, and G.B. Bulut, Advances in understanding the pathogenesis of primary familial and congenital polycythaemia. *British journal of haematology*, 2010. 148(6): p. 844-52.
73. de la Chapelle, A., et al., Familial erythrocytosis genetically linked to erythropoietin receptor gene. *Lancet*, 1993. 341(8837): p. 82-4.
74. Prchal, J.T., Pathogenetic mechanisms of polycythemia vera and congenital polycythemic disorders. *Seminars in hematology*, 2001. 38(1 Suppl 2): p. 10-20.
75. Klippel, S., et al., Quantification of PRV-1 mRNA distinguishes polycythemia vera from secondary erythrocytosis. *Blood*, 2003. 102(10): p. 3569-74.

76. Dameshek, W., Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood*, 1951. 6(4): p. 372-5.
77. Helmut Löffler, T.H., Hämatologische Erkrankungen. 2010: p. 93-96.
78. Pahl, H.L., Towards a molecular understanding of polycythemia rubra vera. *Eur J Biochem*, 2000. 267(12): p. 3395-401.
79. Siegel, F.P.P., Petro E., Angeborene und erworbene Polyzythämien. *Dtsch Arztebl*, 2008.
80. James, C., The JAK2V617F mutation in polycythemia vera and other myeloproliferative disorders: one mutation for three diseases? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2008: p. 69-75.
81. Polycythemia vera: the natural history of 1213 patients followed for 20 years. Gruppo Italiano Studio Policitemia. *Ann Intern Med*, 1995. 123(9): p. 656-64.
82. Bilgrami, S. and B.R. Greenberg, Polycythemia rubra vera. *Semin Oncol*, 1995. 22(4): p. 307-26.
83. Mullally, A., et al., Physiological Jak2V617F expression causes a lethal myeloproliferative neoplasm with differential effects on hematopoietic stem and progenitor cells. *Cancer Cell*, 2010. 17(6): p. 584-96.
84. Akada, H., et al., Conditional expression of heterozygous or homozygous Jak2V617F from its endogenous promoter induces a polycythemia vera-like disease. *Blood*, 2010. 115(17): p. 3589-97.
85. Hickey, M.M., et al., von Hippel-Lindau mutation in mice recapitulates Chuvash polycythemia via hypoxia-inducible factor-2alpha signaling and splenic erythropoiesis. *The Journal of clinical investigation*, 2007. 117(12): p. 3879-89.
86. Hickey, M.M., et al., The von Hippel-Lindau Chuvash mutation promotes pulmonary hypertension and fibrosis in mice. *The Journal of clinical investigation*, 2010. 120(3): p. 827-39.
87. Divoky, V., et al., Mouse model of congenital polycythemia: Homologous replacement of murine gene by mutant human erythropoietin receptor gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001. 98(3): p. 986-91.
88. Ernst G. Grünbaum, E.S., *Klinik der Hundekrankheiten*. 2006. 1232 Seiten: p. 1043-1047.

89. Joensuu, H., et al., Management of malignant gastrointestinal stromal tumours. *The lancet oncology*, 2002. 3(11): p. 655-64.
90. Wittekind, M.N.C., Epidemiologie, Pathologie, Stadieneinteilung gastrointestinaler mesenchymaler und endokriner Tumoren. *Chirurgische Gastroenterologie*, 2007. 23: p. 108-112.
91. Gill, S.S., D.M. Heuman, and A.A. Mihas, Small intestinal neoplasms. *Journal of clinical gastroenterology*, 2001. 33(4): p. 267-82.
92. Yucel, A.F., et al., Gastrointestinal Stromal Tumors with Unusual Localization: Report of Three Cases with a Brief Literature Review. *Case Rep Gastroenterol*. 4(2): p. 250-260.
93. Macias-Garcia, F., et al., Gastrointestinal stromal tumors (GISTs) of the colon. *Rev Esp Enferm Dig*. 102(6): p. 388-90.
94. Appelman, H.D., Mesenchymal tumors of the gut: historical perspectives, new approaches, new results, and does it make any difference? *Monogr Pathol*, 1990(31): p. 220-46.
95. Hirota, S., et al., Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science*, 1998. 279(5350): p. 577-80.
96. Mechtersheimer, G., et al., [Gastrointestinal stromal tumors. A morphologic and molecular genetic independent tumor entity with new therapeutic perspectives]. *Pathologe*, 2003. 24(3): p. 182-91.
97. Sarlomo-Rikala, M., et al., CD117: a sensitive marker for gastrointestinal stromal tumors that is more specific than CD34. *Mod Pathol*, 1998. 11(8): p. 728-34.
98. Miettinen, M., L.H. Sobin, and M. Sarlomo-Rikala, Immunohistochemical spectrum of GISTs at different sites and their differential diagnosis with a reference to CD117 (KIT). *Mod Pathol*, 2000. 13(10): p. 1134-42.
99. Kindblom, L.G., et al., Gastrointestinal pacemaker cell tumor (GIPACT): gastrointestinal stromal tumors show phenotypic characteristics of the interstitial cells of Cajal. *Am J Pathol*, 1998. 152(5): p. 1259-69.
100. Takaki, M., Gut pacemaker cells: the interstitial cells of Cajal (ICC). *J Smooth Muscle Res*, 2003. 39(5): p. 137-61.

101. Robinson, T.L., et al., Gastrointestinal stromal tumors may originate from a subset of CD34-positive interstitial cells of Cajal. *Am J Pathol*, 2000. 156(4): p. 1157-63.
102. Emory, T.S., et al., Prognosis of gastrointestinal smooth-muscle (stromal) tumors: dependence on anatomic site. *Am J Surg Pathol*, 1999. 23(1): p. 82-7.
103. Miettinen, M. and J. Lasota, Gastrointestinal stromal tumors--definition, clinical, histological, immunohistochemical, and molecular genetic features and differential diagnosis. *Virchows Arch*, 2001. 438(1): p. 1-12.
104. Jost, D., et al., [Morphology of gastrointestinal stromal tumors in advanced stages of the disease: baseline findings before chemotherapy with imatinib]. *Rofo*, 2003. 175(6): p. 791-8.
105. Joensuu, H., Gastrointestinal stromal tumor (GIST). *Ann Oncol*, 2006. 17 Suppl 10: p. x280-6.
106. Corless, C.L., J.A. Fletcher, and M.C. Heinrich, Biology of gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol*, 2004. 22(18): p. 3813-25.
107. Rubin, B.P., M.C. Heinrich, and C.L. Corless, Gastrointestinal stromal tumour. *Lancet*, 2007. 369(9574): p. 1731-41.
108. Rubin, B.P., et al., KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res*, 2001. 61(22): p. 8118-21.
109. Wardelmann, E., et al., c-kit mutations in gastrointestinal stromal tumors occur preferentially in the spindle rather than in the epithelioid cell variant. *Mod Pathol*, 2002. 15(2): p. 125-36.
110. Tornillo, L. and L.M. Terracciano, An update on molecular genetics of gastrointestinal stromal tumours. *J Clin Pathol*, 2006. 59(6): p. 557-63.
111. Battochio, A., et al., Detection of c-KIT and PDGFRA gene mutations in gastrointestinal stromal tumors: comparison of DHPLC and DNA sequencing methods using a single population-based cohort. *Am J Clin Pathol*. 133(1): p. 149-55.
112. Rubin, B.P., et al., A knock-in mouse model of gastrointestinal stromal tumor harboring kit K641E. *Cancer research*, 2005. 65(15): p. 6631-9.

113. Cullinane, C., et al., An in vivo tumor model exploiting metabolic response as a biomarker for targeted drug development. *Cancer research*, 2005. 65(21): p. 9633-6.
114. Sommer, G., et al., Gastrointestinal stromal tumors in a mouse model by targeted mutation of the Kit receptor tyrosine kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003. 100(11): p. 6706-11.
115. Rossi, F., et al., Oncogenic Kit signaling and therapeutic intervention in a mouse model of gastrointestinal stromal tumor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006. 103(34): p. 12843-8.
116. Meier-Ruge, W., *Das Megacolon Virchows Archiv*, 1968. 344: p. 67-85.
117. Moore, S.W., Hirschsprung's disease and the brain. *Pediatric surgery international*, 2011. 27(4): p. 347-52.
118. U. Schweigart, H.F., W. Schepp, N. Lehn, K. Becker und M. Classen, *Toxisches Megakolon nach Helicobacter-pylori- Eradikationstherapie Springer-Verlag*, 1997. 38: p. 352–354.
119. Lelievre, V., et al., Gastrointestinal dysfunction in mice with a targeted mutation in the gene encoding vasoactive intestinal polypeptide: a model for the study of intestinal ileus and Hirschsprung's disease. *Peptides*, 2007. 28(9): p. 1688-99.
120. Carniti, C., et al., The Ret(C620R) mutation affects renal and enteric development in a mouse model of Hirschsprung's disease. *The American journal of pathology*, 2006. 168(4): p. 1262-75.
121. Owens, S.E., et al., Genome-wide linkage identifies novel modifier loci of aganglionosis in the Sox10Dom model of Hirschsprung disease. *Human molecular genetics*, 2005. 14(11): p. 1549-58.
122. Li, J.C., et al., The development of colon innervation in trisomy 16 mice and Hirschsprung's disease. *World journal of gastroenterology : WJG*, 2001. 7(1): p. 16-21.
123. V. Kraft, A.A.D., H. M. Blanchet, R. Boot, A. K. Hansen, A. Hem, H. van Herck, I. Kunstyr, G. Milite, J. R. Needham, W. Nicklas, A. Perrot, C. Rehbinder, Y. Richard, G. De Vroey., *Recommendations for the*

- health monitoring of mouse, rat, hamster, guineapig and rabbit breeding colonies. 1994.
124. van Herck, H., et al., Orbital sinus blood sampling in rats as performed by different animal technicians: the influence of technique and expertise. *Lab Anim*, 1998. 32(4): p. 377-86.
  125. Roederer, M., J.L. Nozzi, and M.C. Nason, SPICE: Exploration and analysis of post-cytometric complex multivariate datasets. *Cytometry A*. 79(2): p. 167-74.
  126. Yoshida, Y., et al., PosMed (Positional Medline): prioritizing genes with an artificial neural network comprising medical documents to accelerate positional cloning. *Nucleic Acids Res*, 2009. 37(Web Server issue): p. W147-52.
  127. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977. 74(12): p. 5463-7.
  128. Ruan, H.B., N. Zhang, and X. Gao, Identification of a novel point mutation of mouse proto-oncogene c-kit through N-ethyl-N-nitrosourea mutagenesis. *Genetics*, 2005. 169(2): p. 819-31.
  129. Shakah, H.R., et al., Screening patients with polycythemia vera for c-Kit mutations. *Leukemia & lymphoma*, 2009. 50(1): p. 127-9.
  130. Fontalba, A., et al., Identification of c-Kit gene mutations in patients with polycythemia vera. *Leukemia research*, 2006. 30(10): p. 1325-6.
  131. Huang, Q., et al., PDGFRA rearrangement leading to hyper-eosinophilia, T-lymphoblastic lymphoma, myeloproliferative neoplasm and precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K*, 2011. 25(2): p. 371-5.
  132. Jung, S.H., et al., Expression of DOG1, PDGFRA, and p16 in Gastrointestinal Stromal Tumors. *Gut and liver*, 2011. 5(2): p. 171-80.
  133. Cortezzi, A., et al., Endothelial precursors and mature endothelial cells are increased in the peripheral blood of myelodysplastic syndromes. *Leukemia & lymphoma*, 2005. 46(9): p. 1345-51.

134. Ben-David, A. and S. Gavendo, Osmotic fragility changes of ACD blood units from polycythemic donors. *Transfusion*, 1973. 13(5): p. 320-3.
135. Piva, E., et al., Automated reticulocyte counting: state of the art and clinical applications in the evaluation of erythropoiesis. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC*, 2010. 48(10): p. 1369-80.
136. Pieri, L., et al., The JAK2V617 mutation induces constitutive activation and agonist hypersensitivity in basophils from patients with polycythemia vera. *Haematologica*, 2009. 94(11): p. 1537-45.
137. Blum, K.U., *Der Stoffwechsel menschlicher Erythrozyten 1965: Medicine & Public Health, Hematology, Oncology.*
138. Arem, R., et al., Polycythemia rubra vera and artifactual hypoglycemia. *Archives of internal medicine*, 1982. 142(12): p. 2199-201.
139. Billington, C.J., et al., Artifactual hypoglycemia associated with polycythemia vera. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 1983. 249(6): p. 774-5.
140. Otto, K.G., Are Mpl glycosylation defects in polycythemia vera secondary to artifactual hypoglycemia? *Blood*, 2000. 95(7): p. 2452.
141. Schachner, E., et al., Iron absorption in patients with polycythemia vera: a comparative study using the whole-body counter and the ferrous sulfate absorption test. *European journal of nuclear medicine*, 1978. 3(2): p. 125-7.
142. Kwapisz, J., E. Zekanowska, and J. Jasiniewska, Decreased serum prohepcidin concentration in patients with polycythemia vera. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 2009. 10(11): p. 791-5.
143. Axel Rüfer, A.T., André Tichellic, Walter A. Wuillemina, *Myeloproliferative Syndrome: Polycythaemia vera, essentielle Thrombozythämie, Osteomyelofibrose. Schweiz Med Forum*, 2003.
144. Schaefer, R.M.K., Markus, *Störungen des Säure-Basen-Haushalts: Rationale Diagnostik und ökonomische Therapie. Deutsches Ärzteblatt*, 2005. 26: p. 1896-1899.
145. Caprilli, R., et al., Early recognition of toxic megacolon. *Journal of clinical gastroenterology*, 1987. 9(2): p. 160-4.

146. Dai, C.H., et al., Polycythemia vera blood burst-forming units-erythroid are hypersensitive to interleukin-3. *The Journal of clinical investigation*, 1991. 87(2): p. 391-6.
147. Bai, J., et al., Endogenous erythroid colony assay in patients with polycythemia vera and its clinical significance. *Chinese medical journal*, 2004. 117(5): p. 668-72.
148. Tefferi, A., Myelofibrosis with myeloid metaplasia. *The New England journal of medicine*, 2000. 342(17): p. 1255-65.
149. Passamonti, F., et al., A dynamic prognostic model to predict survival in post-polycythemia vera myelofibrosis. *Blood*, 2008. 111(7): p. 3383-7.
150. Lyford, G.L., et al., Pan-colonic decrease in interstitial cells of Cajal in patients with slow transit constipation. *Gut*, 2002. 51(4): p. 496-501.
151. Garrity, M.M., et al., Diagnostic challenges of motility disorders: optimal detection of CD117+ interstitial cells of Cajal. *Histopathology*, 2009. 54(3): p. 286-94.
152. Hagger, R., et al., A deficiency of interstitial cells of Cajal in Chagasic megacolon. *Journal of the autonomic nervous system*, 2000. 80(1-2): p. 108-11.
153. Tong, W.D., et al., Expression of c-kit messenger ribonucleic acid and c-kit protein in sigmoid colon of patients with slow transit constipation. *International journal of colorectal disease*, 2005. 20(4): p. 363-7.
154. Tong, W.D., et al., Analysis of the c-kit gene in patients with slow transit constipation. *Gut*, 2006. 55(8): p. 1207-8.
155. Huizinga, J.D., et al., W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature*, 1995. 373(6512): p. 347-9.
156. Leung, Y., et al., Hematopoietic cell transplantation for Crohn's disease; is it time? *World journal of gastroenterology : WJG*, 2006. 12(41): p. 6665-73.
157. Liu, D., et al., Bone marrow derivation of interstitial cells of cajal in small intestine following intestinal injury. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2010. 2010: p. 164986.



158. Robinson, D.R., Y.M. Wu, and S.F. Lin, The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene*, 2000. 19(49): p. 5548-57.
159. Emile, J.F., et al., Frequencies of KIT and PDGFRA mutations in the MolecGIST prospective population-based study differ from those of advanced GISTs. *Medical oncology*, 2011.
160. Oppliger Leibundgut, E., et al., Hematopoietic and endothelial progenitor cell trafficking in patients with myeloproliferative diseases. *Haematologica*, 2006. 91(11): p. 1465-72.
161. Lopez-Saavedra, A. and L.A. Herrera, The role of alternative mRNA splicing in chromosome instability. *Mutation research*, 2010. 705(3): p. 246-51.

## 9. ANHANG

### Anhang 1: Oligonukleotide für den *Kit* Gen

<b>Exon</b>	<b>Vorwärtsprimer (5'-3')</b>	<b>Rückwärtsprimer (5'-3')</b>
Exon 1	agcttattgcagcccca	tctgtctgccgctcttt
Exon 2(1)	ccacagtcgagatggaac	caaccatttcattgaaataggctt
Exon 2(2)	ctgacgtgcattgatccc	tgtggtttggtcacctctg
Exon 3(1)	ctgtctaaacaaacaagctcacia	tgatgggatgccagcc
Exon 3(2)	cgagtgtgatgggaaatct	ccctaggctaagtggaaagga
Exon 4	cgtcagggccgtattcc	ccacagcccgtgatagg
Exon 5	aggaaagatcctgaatataaattatatgt	cctctcactattgcccga
Exon 6	gtggatactgactgctgtctta	gaaggttgcggggagag
Exon 7	ctctctacaggagttgattattg	aggagcccggcgattta
Exon 8	ggttggtcagccaactgat	cctccctctgcattttaagc
Exon 9	gcttaccagcgtgaagcc	cctaaacaccctaaattggat
Exon 10	gctgctggctcacaatc	cccaggaagagaacaattcaa
Exon 11	tcagcgggtgacacatc	gcttctcgtggaaagcc
Exon 12	ttggtcttcccactgacatga	tattagataaactggtggtgggtaca
Exon 13	tttgctaaaatacatcactttccct	gataaccagagagatggcaac
Exon 14	ttgctatacctaacattgtcttctatc	caacagctgactgtttatgc
Exon 15	ttctgacacgggtctcg	ttaagctgctctggctagt
Exon 16	ctctccttaccactaagggtt	gatgccgtgctcctctc
Exon 17	tgaaatgaatggctgttgct	gcaccctgggtagactc
Exon 18	cttgaatttctgtgttccg	gtgagggcatcttgggt
Exon 19	cccacatggacactgatttg	tatcagaagaaaaggcttggag
Exon 20	aaccaggagtgacaaacaat	cctagagtaaggagaaaggat
Exon 21(1)	accaagccgctgtattt	ctgtttacagtaggagctactt
Exon 21(2)	aggtccgaactgtatgtat	ccttgattccaatgctactc
Exon 21(3)	acaactgacctggtttctc	ttcaaacagcctcagttctc
Exon 21(4)	aacaagccttccatgtca	aggtctaatgaatgggtctac
Exon 21(5)	tttatttggagtctctctgtattt	ctgacatccatattaacagctatt
Exon 21(6)	tgtctttgtattcctaagtacttc	caacactttctgattgagtga

Anhang 2: Oligonukleotide für den *Pdgfra* Gen

<b>Exon</b>	<b>Vorwärtsprimer (5'-3')</b>	<b>Rückwärtsprimer (5'-3')</b>
Exon 1	gatggctgtttgtagtttct	tcagggaccttcttgagaaca
Exon 2	acatgcttccactgacgga	ttctgttggttcatctcg
Exon 3	ttcatataagccgccactgt	tgaatccctcgtgtttatgc
Exon 4	tggtggtgaagctaacgatg	cagaggtcagccacgttga
Exon 5	caaagtccaggctccgtaga	atgccaaactcgcctgatt
Exon 6	cctctacactcacaacccta	tcaatctcgacgaagcctt
Exon 7	tccacggtaccactgttct	cgtcaggctgcaatgttatc
Exon 8	gaggctatgagtacaccttc	tacccaaggctctggcttct
Exon 9	ccaggctggagttgttctgt	gaggaagaatcgcaatacaa
Exon 10	gtgaacaagcaccataaaacg	caggaagaccagtgttcaa
Exon 11	gccctagttcatttttctgc	ccacctatggaattacaaa
Exon 12	tttctgggtccagtcactt	aagtcctaattctgtcccagat
Exon 13	aaaacacccaccagctgta	cagaaagcactttgccatt
Exon 14	gcctctggcttccatgtgta	gcaggtggatttcttggtc
Exon 15	cggcttattgcaggaacttt	tggtgctggcctaggatct
Exon 16	ccaagccctgatacctct	ctacctgcatcccggttc
Exon 17	gatctttgggcaagcttctg	tgagtcaactcccagccta
Exon 18	atcatggactgggtggtctt	ttaccaaacagcaacccta
Exon 19	gcatacacacgggcatacac	ggggtaaacctgtggagtga
Exon 20	agaccgctatggcaagtctg	aggcagagctcagagtgagtg
Exon 21	tggeatgatggtcgattcta	cacaatccgtgtcctccttt
Exon 22	aaggttggggtggagagagt	ctggaatgatgcacctgttg
Exon 23(1)	gccctgtttggtttgtgt	tcgggaactttctctcca
Exon 23(2)	gcctcctcgggataacctt	cggttccagtaccttccaaa
Exon 23(3)	tgcttcttcttcttggaa	gccttggattaggagactg
Exon 23(4)	gcaaacactagagagcaga	attgtggtctcagggtttgc
Exon 23(5)	gateccgccatacctactt	cagccaagcctggaaactta
Exon 23(6)	ccatgcaggaaggctactgt	acatggcagagaatgccaat
Exon 23(7)	agctccatattcggtgaga	ccaactcatggtgtcatgc
Exon 23(8)	ttgcacagcctctgttgg	ggaggccagaaagaaaaca
Exon 23(9)	ccacactcagcaggatata	taactgtcctgtggggaata
Exon 23(10)	aatgtggtctgccaacctgt	gagagagggtgggtggaat

Anhang 3: Oligonukleotide für den *Kdr* Gen

<b>Exon</b>	<b>Vorwärtsprimer (5'-3')</b>	<b>Rückwärtsprimer (5'-3')</b>
Exon 1(1)	tcgctagtgtgtagccg	aggcacagactccttctc
Exon 1(2)	cgcctctgtgactctttg	caaggaggagggtctcta
Exon 2	gtttatggaaggccttctatt	cagtaaacaatgagtcctttcac
Exon 3	ccattgatattcttctggaatacttt	acattggaagcagacgg
Exon 4	ctttctgctaataattcactaggag	tatggaaatggatgcagtgact
Exon 5	aatatttgtgtctctctgtttgcta	tcacgtagaaagctactctttattgtat
Exon 6	tagatttctttccatcttactttctgttt	agtactcaggtttgagttg
Exon 7	gacgtgaacattactagactctg	cagtgtattatcaagaagatggctg
Exon 8	ggaacttggcatttatgagaacc	caatgctttgcttttattccagta
Exon 9	gcactacctctgggatt	tggcagaggagacactga
Exon 10	aagcaatcgggcagttc	cgatggcaagtgaacagag
Exon 11	tcttgacatgctgcgct	gagataagaattagagagagaatcaaaact
Exon 12	tggcttgggtctgtacg	cccacctctaaagagttctcta
Exon 13(1)	gtgcatgcaccaacttaagtta	ccattcagtttcaaaagagcatc
Exon 13(2)	ggggaatcactcacac	cacactgcatttaaggcattg
Exon 14	gtttgagccgtgggcttta	ttctacaaccagagaaatagacaagt
Exon 15	ccatcagaaaataaagcaagaat	gagaccatctgatgagccta
Exon 16	ctgttgatcactcaaacatgtct	aaggacagaggaggaaat
Exon 17	ccaacaagaggccgtg	aacttatatcaagttaatagcagttgaca
Exon 18	acagtgtgacaatcaaagtgtat	agaaagagaaacataatgatttccct
Exon 19	gcaatgggcacacttaatagtt	gaggagccagagcagata
Exon 20	tcctttctcaattacactctgtca	caacatggccagtgtctc
Exon 21	tgattcagaggaatttgacat	ttcctacgagaacgcgtgtta
Exon 22	ctcatctctgtcctctgc	tgaccgaagagaaggttt
Exon 23	gtgtagtgacttatcacagctatt	atagccacaaagttcgcc
Exon 24	tgggatctcatgcctcg	tcacgtactgttcccaacc
Exon 25	cccacaatgctctgttcttacc	tccttagtgggaagagttgtga
Exon 26	aaccggtgtctcgattg	ctgaggcctgtttgtagaag
Exon 27	gaaggacagcagccataac	ggggatgctggctatct
Exon 28	caaatataaccaccaccaatacaaa	cacccaagtattatctttatgacta
Exon 29	gcacactcactgtgtcat	cgtattgaaatattcttcttagtaggc
Exon 30(1)	cattcgcttgcgtttct	cctccaaaaatgaaaatcaaatgtg
Exon 30(2)	gttctttccaccaccg	gcatcctccacaaagcc
Exon 30(3)	ggccgagctctgtctacc	gatgaggaaggagcaagc
Exon 30(4)	gccccaggaaggaaatg	aaatctggctagtgtattctgga
Exon 30(5)	gcagaaaaatcttaattggttggtt	acataaactgatacaaaagtggtg
Exon 30(6)	aaaacgttatattatataatgaactttg	tggagctgtgtgataagatga





Anhang 6: Die klinischchemischen Parameter von Plasma von nach dem Futterentzug über Nacht

Gruppe	Kontrollgruppe (A)				Mutanten (B)				ANOVA					
	Männchen		Weibchen		Männchen		Weibchen		Männchen		Weibchen		Interaktion	
	MW±SEM	n	MW±SEM	n	MW±SEM	n	MW±SEM	n	p - Wert	p - Wert	p - Wert	p - Wert	p - Wert	p - Wert
<b>Anzahl der getesteten Tieren</b>	8	10	10	10	10	10	10	10						
<b>Cholesterol [mg/dl]</b>	182,8 ± 2,87	129,3 ± 4,04	168,9 ± 3,57	109 ± 7,98					<b>p&lt;0,01</b>	<b>p&lt;0,05</b>	<b>p&lt;0,001</b>	<b>p&lt;0,001</b>		n.s.
<b>Triglyceride [mg/dl]</b>	197 ± 18,5	254 ± 21,8	166 ± 10,9	195 ± 23,9					n.s.	n.s.	<b>p&lt;0,05</b>	<b>p&lt;0,05</b>		n.s.
<b>NEFA [mmol/l]</b>	1,8 ± 0,2	2,7 ± 0,13	2,1 ± 0,06	2,3 ± 0,16					n.s.	n.s.	n.s.	<b>p&lt;0,001</b>		<b>p&lt;0,05</b>
<b>Glucose [mg/dl]</b>	141,6 ± 10,5	99,8 ± 8,3	104 ± 11,9	72,7 ± 6,4					<b>p&lt;0,05</b>	<b>p&lt;0,05</b>	<b>p&lt;0,01</b>	<b>p&lt;0,001</b>		n.s.

Anhang 7: Die klinischchemischen Parameter von der ersten Blutentnahme

Gruppe	Kontrollgruppe						Mutanten						ANOVA	
	(A)			(B)			A-B			A-B				ANOVA
	Männchen	Weibchen		Männchen	Weibchen		Männchen	Weibchen		Männchen	Weibchen			
MW±SEM	MW±SEM		MW±SEM	MW±SEM		MW±SEM	MW±SEM		MW±SEM	MW±SEM				
Anzahl der getesteten Tieren	11	9		9	11									
Natrium [mmol/l]	154,7 ± 6,83	149,6 ± 1,33		150,9 ± 1,45	148,9 ± 1,64		n.s.	n.s.		148,9 ± 1,64	148,9 ± 1,64		p<0,01	n.s.
Kalium [mmol/l]	4,76 ± 0,28	3,84 ± 0,24		4,75 ± 0,23	4,27 ± 0,39		n.s.	p<0,01		4,27 ± 0,39	4,27 ± 0,39		p<0,001	n.s.
Kalzium [mmol/l]	2,35 ± 0,13	2,27 ± 0,05		2,29 ± 0,07	2,27 ± 0,11		n.s.	n.s.		2,27 ± 0,11	2,27 ± 0,11		n.s.	n.s.
Chlorid [mmol/l]	115,8 ± 4,72	111,2 ± 1,74		114,8 ± 1,43	113,9 ± 2,02		n.s.	p<0,01		113,9 ± 2,02	113,9 ± 2,02		p<0,01	p<0,05
Anorg. Phosphat [mmol/l]	1,73 ± 0,36	1,58 ± 0,29		1,76 ± 0,17	1,56 ± 0,27		n.s.	n.s.		1,56 ± 0,27	1,56 ± 0,27		p=0,066	n.s.
Gesamtweiß [g/dl]	5,71 ± 0,37	5,36 ± 0,17		5,49 ± 0,15	5,4 ± 0,18		n.s.	n.s.		5,4 ± 0,18	5,4 ± 0,18		p<0,01	p=0,056
Albumin [g/dl]	2,891 ± 0,207	2,911 ± 0,105		2,711 ± 0,105	2,891 ± 0,104		p<0,05	n.s.		2,891 ± 0,104	2,891 ± 0,104		p=0,051	p=0,051
Kreatinin [mg/dl]	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,01		0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01		n.s.	n.s.		0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01		p<0,05	n.s.
Harnstoff [mg/dl]	56,9 ± 5,48	51,2 ± 6,16		56 ± 5,33	46,3 ± 7,94		n.s.	n.s.		46,3 ± 7,94	46,3 ± 7,94		n.s.	n.s.
Cholesterol [mg/dl]	170,4 ± 17,82	110,7 ± 10,45		164,7 ± 14,22	107,4 ± 9,86		n.s.	n.s.		107,4 ± 9,86	107,4 ± 9,86		p<0,001	n.s.
Triglyceride [mg/dl]	318 ± 76,8	255 ± 92,4		241 ± 63,1	189 ± 71,2		p<0,05	n.s.		189 ± 71,2	189 ± 71,2		p<0,05	n.s.
NEFA [mmol/l]	2,1 ± 0,33	1,8 ± 0,44		2,1 ± 0,25	1,7 ± 0,3		n.s.	n.s.		1,7 ± 0,3	1,7 ± 0,3		p<0,01	n.s.
LDH [U/l]	181,5 ± 47,36	221,9 ± 41,45		195,8 ± 58,9	256,4 ± 62,83		n.s.	n.s.		256,4 ± 62,83	256,4 ± 62,83		p<0,01	n.s.
ALAT [U/l]	30 ± 12,55	29,8 ± 11,11		26,7 ± 3,74	26,9 ± 10,52		n.s.	n.s.		26,9 ± 10,52	26,9 ± 10,52		n.s.	n.s.
ASAT [U/l]	42,7 ± 11,43	55,6 ± 7,6		42 ± 4,9	72,2 ± 21,17		n.s.	p<0,05		72,2 ± 21,17	72,2 ± 21,17		p<0,001	p<0,05
AP [U/l]	91,5 ± 9,8	127,8 ± 18,34		87,3 ± 7	119,6 ± 16,34		n.s.	n.s.		119,6 ± 16,34	119,6 ± 16,34		p<0,001	n.s.
$\alpha$ -Amylase [U/l]	612 ± 62,4	496 ± 41,2		605 ± 57,4	509 ± 32,9		n.s.	n.s.		509 ± 32,9	509 ± 32,9		p<0,001	n.s.
Glucose [mg/dl]	180,2 ± 32,3	167,9 ± 21,5		170,5 ± 30,3	167,8 ± 27,3		n.s.	n.s.		167,8 ± 27,3	167,8 ± 27,3		n.s.	n.s.
Ferritin [ng/ml]	20,5 ± 6,12	26,6 ± 4,7		20,2 ± 5,51	23,3 ± 9,62		n.s.	n.s.		23,3 ± 9,62	23,3 ± 9,62		p=0,053	n.s.
Transferrin [mg/dl]	164,1 ± 11,41	154,2 ± 8,36		149,5 ± 4,95	147,4 ± 3,4		p<0,01	p<0,05		147,4 ± 3,4	147,4 ± 3,4		p<0,001	p<0,05
Eisen [µg/dl]	174,1 ± 18,5	184,5 ± 36,11		165,1 ± 25,46	140,4 ± 41,2		n.s.	p<0,05		140,4 ± 41,2	140,4 ± 41,2		n.s.	n.s.



Anhang 8: Die klinischchemischen Parameter von der zweiten Blutentnahme

Gruppe	Kontrollgruppe										Mutanten				ANOVA	
	(A)					(B)					A~B		A~B			
	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen	Anzahl der getesteten Tieren	MW±SEM	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen	MW±SEM	Männchen	Weibchen	p - Wert		Geschlecht
<b>Geschlecht</b>																
<b>Anzahl der getesteten Tieren</b>	11	9	9	9	11											
<b>Albumin [g/dl]</b>	2,8 ± 0,126	2,622 ± 0,12	2,6 ± 0,141	2,455 ± 0,129										<b>p&lt;0,001</b>	<b>p&lt;0,001</b>	n.s.
<b>Creatinine [mg/dl]</b>	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,07 ± 0,01										n.s.	<b>p&lt;0,001</b>	n.s.
<b>Triglycerides [mg/dl]</b>	306 ± 67,8	251 ± 60,2	288 ± 54,4	220 ± 44,9										n.s.	<b>p&lt;0,01</b>	n.s.
<b>ASAT [U/l]</b>	45,5 ± 31,75	40,9 ± 12,61	41,6 ± 7,6	80,7 ± 81,43										n.s.	n.s.	n.s.
<b>TIBC [µg/dl]</b>	469,8 ± 34,28	481,5 ± 22,72	434,1 ± 47,74	450,2 ± 25,14										n.s.	<b>p&lt;0,01</b>	n.s.
<b>Trf_Sat [%]</b>	37 ± 2,5	37 ± 4,9	34 ± 4,4	38 ± 2,3										n.s.	n.s.	n.s.
<b>UIBC [µmol/l]</b>	52,9 ± 5,6	54,3 ± 5,1	51,3 ± 8,9	50,2 ± 3,5										n.s.	n.s.	n.s.
<b>Ferritin [ng/ml]</b>	18,2 ± 3,81	21,5 ± 3,07	16,5 ± 4,23	19,5 ± 3,19										n.s.	<b>p&lt;0,01</b>	n.s.
<b>Transferrin [mg/dl]</b>	137,1 ± 7,1	131,8 ± 4,55	130,6 ± 6,2	128,3 ± 3,27										<b>p&lt;0,05</b>	<b>p&lt;0,05</b>	n.s.
<b>Eisen [µg/dl]</b>	174,4 ± 9,7	178,3 ± 23,51	147,4 ± 10,14	169,6 ± 13,37										<b>p&lt;0,001</b>	<b>p&lt;0,01</b>	n.s.

Anhang 9: Die Blutgaswerte von getesteten Tieren im Alter von ca. 4 Monaten.

Gruppe	Kontrollgruppe				Mutanten				ANOVA	
	Männchen		Weibchen		Männchen		Weibchen		Geschlecht	Interaktion
	MW±SEM	MW±SEM	MW±SEM	MW±SEM	MW±SEM	MW±SEM	MW±SEM	MW±SEM		
	7	6	6	6	6	6	6	6	<i>p</i> - Wert	<i>p</i> - Wert
pH	7,33 ± 0,02	7,3 ± 0,02	7,32 ± 0,01	7,26 ± 0,02	n.s.	0,016	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
pCO2	45 ± 1,3	40 ± 2,8	44 ± 1,5	45 ± 1,1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
pO2	55,7 ± 5,13	70,5 ± 11,41	68,2 ± 12,09	72,3 ± 13,76	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
sO2	84,1 ± 3,09	89 ± 2,38	88,5 ± 4,4	85,8 ± 4,06	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
HCO3-	23 ± 0,65	18,83 ± 0,83	21,83 ± 0,87	19,5 ± 0,62	n.s.	<0,001	n.s.	<0,001	n.s.	n.s.
ABE	-1,7 ± 0,63	-4 ± 1,23	-2,1 ± 0,78	-4,2 ± 1,25	n.s.	<0,001	n.s.	<0,001	n.s.	n.s.

Anhang 10: Die Blutgaswerte von getesteten Tieren im Alter von ca. 13-15 Monaten.

Gruppe	Kontrollgruppe				Mutanten				ANOVA	
	Männchen		Weibchen		Männchen		Weibchen		Geschlecht	Interaktion
	MW±SEM	MW±SEM	MW±SEM	MW±SEM	MW±SEM	MW±SEM	MW±SEM	MW±SEM		
	11	5	12	5	12	5	5	5	<i>p</i> - Wert	<i>p</i> - Wert
pH	7,34 ± 0,01	7,32 ± 0,02	7,33 ± 0,01	7,33 ± 0,02	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
pCO2	45 ± 0,9	45 ± 1	49 ± 1,1	47 ± 1,7	0,024	n.s.	0,024	n.s.	n.s.	n.s.
pO2	46,8 ± 2,31	55 ± 2,47	50,7 ± 2,67	55,2 ± 2,58	n.s.	0,04	n.s.	0,04	n.s.	n.s.
sO2	80,2 ± 2,96	85,2 ± 1,39	81,1 ± 1,84	85,6 ± 1,4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
HCO3-	23,27 ± 0,41	22,4 ± 0,51	24,83 ± 0,27	24,2 ± 0,37	<0,001	n.s.	<0,001	n.s.	n.s.	n.s.
ABE	-2,1 ± 0,48	-1,7 ± 0,63	-1,3 ± 0,26	-0,9 ± 0,43	0,024	n.s.	0,024	n.s.	n.s.	n.s.



## 10. DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich hier ganz herzlich bei meiner Betreuerin Frau Dr. Birgit Rathkolb bedanken. Nicht nur, dass Sie mich für dieses Thema gefunden hat, sondern vor allem für die intensive und persönliche Betreuung während der vier Arbeitsjahre und besonders bei der Zeit und Kraft kostenden Anfertigung dieser Doktorarbeit. Die Gewissheit, jederzeit Hilfe und Rat zu bekommen, war bei der Erstellung der Arbeit unverzichtbar. Ein stets offenes Ohr und der freundschaftliche, persönliche Umgang machten die gesamte Zusammenarbeit zu einer Freude und einem positiven Erlebnis. Vielen Dank dafür Birgit!

Als nächstes bedanke ich mich ganz besonders bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Eckhard Wolf für die zur Verfügungsstellung des Dissertationsthemas.

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank an Herrn Prof. Dr. Martin Hrabé de Angelis für die zur Verfügung gestellte wissenschaftliche Basis, die finanzielle Unterstützung und die Bereitstellung der Infrastruktur für dieses Projekt ausdrücken.

Mein bester Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Dr. Bernhard Aigner, der es mir ermöglicht hat, einen Teil dieser Arbeit in seinem Labor durchzuführen. Ganz herzlich möchte ich mich auch für die stetige Unterstützung und die kompetenten Korrekturen dieser Arbeit bedanken.

Für die gewährte Unterstützung richte ich meinen besonderen Dank an alle ehemaligen und jetzigen Mitarbeiter des Moorversuchsguts Oberschleißheim. Im besonderen geht dieser Dank an Herrn Dr. Nikolai Klymiuk, Frau Dr. Christina Landbrecht, Frau Dr. Petra Prückl, Herrn Dr. agr. Wolfgang Voss, Kristin Rößger und Tatjana Kremer für die angenehme Arbeitsatmosphäre, freundliche Beratung und praktische Hilfe in der Laborarbeit.

Danken möchte ich auch Frau Prof. Dr. Pahl für die Durchführung von Knochenmarkuntersuchungen an Tieren der vorgestellten Mauslinie und die Hilfestellung bei der Interpretation der erhaltenen Daten. Ohne ihre Erfahrung im Bereich der Hämatologie wären diese Untersuchungen nicht möglich gewesen.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei allen Technischen Assistenten und Mitarbeitern des IEG-Institutes und der Deutschen Mauslinik, die an der Phänotypisierung der Mauslinie MVD013 mitgewirkt haben. Insbesondere geht ein großes Dankeschön an unsere technische Assistentin Frau Elfi Holupirek. Wegen deiner Unterstützung, ausgezeichneten Zeit- und Arbeitsplanung wurde die Arbeit im Labor besonders angenehm und produktiv.

Für die weiteren, erfolgreich durchgeführten, sekundären Untersuchungen an den Mäusen, geht mein Dank an Frau Dr. Julia Calzada-Wack, Frau Dr. Monica Tost, Herrn Dr. Juan Antonio Aguilar Pimentel, Herrn Dr. Thure Adler und Frau Dr. Marion Horsch.

Dem ganzen Team von Frau Dr. Sibylle Wagner bin ich zu großem Dank verpflichtet. Ohne die zahlreichen praktischen und intellektuellen Hilfestellungen bei meinen molekularbiologischen Untersuchungen würde ich wahrscheinlich heute noch vergeblich pipettieren. Mein besonderer Dank geht an Andreas Mayer, Tommy Fuchs und Annemieke Looienga.

Für seine freundliche Hilfsbereitschaft möchte ich mich auch bei Michael Schulz bedanken. Das Nebeneinander-Arbeiten hat mir jederzeit großen Spaß gemacht. Für die praktische und wissenschaftliche Beratung möchte ich mich auch gerne bei Herrn Christian Cohrs bedanken.

Ebenso danke ich den Mauslinik Koordinationsteam Herrn Dr. Helmut Fuchs, Frau Dr. Valérie Gailus-Durner und Frau Dr. Beatrix Naton für ihre organisatorische Unterstützung. Außerdem möchte ich den Tierpflegern der GMC herzlich für die kompetente Versorgung meiner Versuchstiere, das freundliche Entgegenkommen und das gute unkomplizierte Arbeitsklima danken.

Mein herzlicher Dank geht an meine unmittelbaren Mitarbeiter und Bürogefährten Dr. Lore Becker, Dr. Jan Rozman, Dr. Claudia Stöger und Melanie Kahle für eine freundliche und spaßvolle Arbeitsatmosphäre in unserem kuscheligen Büroleben.

Meinen Freunden möchte ich ganz herzlich für die alltägliche Unterstützung danken. Ein besonders freundlichen Dank an Irina Treise, für eine wertvolle und inspirierende Freundschaft, welche auf der Basis unserer Zusammenarbeit entstanden ist.

Meinen WG Mitbewohner danke ich für die kostbare Zeit im Wilhelmshof 6, welche nie aus meiner Erinnerung verschwinden wird. Mayuko Kurome, Sudhir Kumar, Rekka Kumar, Jan Maxa und Markus Neuditschko – ich werde euch vermissen.

Schließlich vielen Dank an meine Eltern für jegliche Unterstützung in diesen vier Jahren, weil sie immer an mich glaubten und mir auch in schwierigen Zeiten stets zur Seite standen.

Schlussendlich möchte ich meinen Mann einen ganz besonderen Dank sagen, da er einen wesentlichen Anteil am erfolgreichen Abschluss der Arbeit hat. Deine Liebe, Unterstützung und der Glaube an meine Kraft waren für mich die wichtigsten Motivationsfaktoren während der ganzen Doktorarbeitszeit.