



Die Modulation der Hämatopoese durch das Enzym Paraoxonase-2

Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von
Lisa Spiecker
geb. am 06.03.1989 in Kirchheimbolanden

Mainz, 2018

Dekan: xxx

1. Berichterstatter: xxx

2. Berichterstatter: xxx

Tag der mündlichen Prüfung: xxx

Meinen Eltern und meinem
Freund Daniel gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	9
Tabellenverzeichnis	13
Abkürzungsverzeichnis.....	14
1 Einleitung	20
1.1 Die Proteinfamilie der Paraoxonasen	20
1.1.1 Paraoxonase-2	21
1.1.1.1 Paraoxonase-2 und Leukämie	26
1.2 Oxidativer Stress	27
1.2.1 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)	28
1.3 Das hämatopoetische System	29
1.3.1 Die Knochenmarksnische.....	31
1.3.2 Hämatopoetische Stammzellen	32
1.3.2.1 Der Einfluss von ROS auf hämatopoetische Stammzellen.....	33
1.3.2.2 Alterung von hämatopoetischen Stammzellen.....	34
1.3.3 Erythropoese.....	35
1.3.4 Lymphatische Organe und Lymphozyten.....	37
1.3.5 Die Regulation der Hämatopoese mittels Transkriptionsfaktoren	38
1.3.5.1 Hämatopoetische Signalwege	39
2 Ziele der Arbeit.....	41
3 Material.....	42
3.1 Chemikalien	42
3.2 Verbrauchsmaterialien	42
3.3 Laborgeräte.....	43
3.4 Reagenzien und Kits.....	43
3.5 Puffer, Lösungen und Medien	44
3.6 Enzyme und Standards	44
3.7 Antikörper für die Durchflusszytometrie	45
3.8 Oligonukleotide	45
3.8.1 Oligonukleotidsequenzen für quantitative real-time PCR.....	45
3.9 Versuchstiere	46
4 Methoden.....	48
4.1 Zellbiologische Arbeitsmethoden.....	48
4.1.1 Isolierung von Knochenmarkzellen und Blut.....	48
4.1.2 Isolierung von Zellen aus Milz und Thymus.....	49
4.1.3 Kryokonservierung und Auftauen muriner Zellen	49

4.1.4	Isolierung und Differenzierung verschiedener Subpopulationen mittels Oberflächenmarkern (FACS)	50
4.1.4.1	Sortieren von Zellen.....	53
4.1.5	Messung reaktiver Sauerstoffspezies in hämatopoetischen Stammzellen mittels Durchflusszytometrie	53
4.1.6	Messung reaktiver Sauerstoffspezies in frisch isolierten Knochenmarkzellen mittels Chemilumineszenz	54
4.1.7	Quantifizierung apoptotischer Zellen mittels Durchflusszytometrie	55
4.1.8	Zellzyklusanalysen an HSPCs mittels Ki-67 und Hoechst	56
4.1.9	Quantifizierung von Doppelstrangbrüchen mittels γ -H2A.X am Durchflusszytometer	57
4.2	Molekularbiologische Arbeitsmethoden	58
4.2.1	RNA Extraktion aus primären Zellen.....	58
4.2.2	Bestimmung des Nukleinsäuregehalts	58
4.2.3	cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	58
4.2.4	Quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR).....	59
4.2.5	Totale RNA-Sequenzierung	60
4.3	Vergleichende Analysen des hämatopoetischen Systems von Wildtyp C57BL/6J- und PON2 ^{-/-} -Mäusen	61
4.3.1	<i>In vivo</i> Biotinylierung zur Messung des Erythrozyten- und Thrombozytenumsatzes	61
4.3.2	Induzieren einer hämolytischen Anämie durch Phenylhydrazin.....	63
4.3.3	Behandlung mit Antioxidantien	64
4.3.4	Knochenmarktransplantationen.....	64
4.3.4.1	Reziproke Knochenmarktransplantation.....	64
4.3.4.2	Kompetitive Knochenmarktransplantation	67
4.3.4.2.1	FACS-Analyse von Mäuseblut auf den Ptp ^{rc} a/b-Chimärismus	68
4.3.4.3	Serielle Knochenmarktransplantation	69
4.3.4.4	<i>Homing</i>	70
4.3.5	Colony Assay.....	70
4.4	Statistik.....	71
5	Ergebnisse	72
5.1	PON2-Defizienz verursacht Modifikationen in den hämatopoetischen Organen Thymus und Milz	72
5.1.1	PON2 ^{-/-} -Mäuse weisen divergente B-Zell- und T-Vorläuferzellzahlen auf sowie eine Splenomegalie in alten Weibchen	73

5.1.2	PON2 ^{-/-} -Mäuse zeigen eine verlangsamte Thymusinvolution und veränderte T-Zell-Reifung	75
5.2	Divergenter PON2-Expressionslevel in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen von jungen und alten WT-Mäusen	78
5.3	Junge PON2 ^{-/-} -Mäuse weisen verschiedenste Modifikationen in der Hämatopoese auf.....	80
5.3.1	Quantitative und morphologische Auffälligkeiten des Knochenmarks und des Blutbildes PON2-defizienter Mäuse	80
5.3.1.1	PON2-Mangel führt zu quantitativen Änderungen in Zellen des Knochenmarks.....	80
5.3.1.2	Das Blutbild PON2-defizienter Mäuse zeigt quantitative und morphologische Veränderungen	84
5.3.1.2.1	Unveränderte myeloid/lymphoid-Verteilung in jungen PON2 ^{-/-} -Mäusen	87
5.3.2	Reziproke Knochenmarktransplantation weist zellspezifische- sowie Mischeffekte nach	88
5.3.3	PON2-Defizienz verursacht oxidativen Stress	94
5.3.3.1	PON2 Defizienz führt zu einem gesteigerten ROS-Level in Knochenmarkszellen	94
5.3.3.2	Gesteigerter Superoxid-Level im Gesamtknochenmark von PON2 ^{-/-} -Mäusen	96
5.3.4	Oxidativer Stress bewirkt weder DNA-Schädigung noch Induktion der Apoptose in HSPCs aus PON2 ^{-/-} -Mäusen	97
5.3.4.1	Keine Korrelation von DNA-Schädigung und erhöhtem ROS-Level in PON2-defizienten LSK-Zellen.....	97
5.3.4.2	PON2-Mangel bewirkt keine Steigerung der Apoptose-Raten in HSCs.....	98
5.3.5	Orale Applikation von NAC führt zu einer Verminderung bzw. Aufhebung verschiedener Modifikationen im hämatopoetischen System PON2-defizienter Mäuse	99
5.3.5.1	HSPCs NAC-behandelter PON2 ^{-/-} -Tiere weisen leicht verringerte ROS-Level auf.....	100
5.3.5.2	Verringerung des ROS-Levels führt zu einer Verminderung bzw. Aufhebung mancher Effekte in Knochenmarkszellen sowie zum Auftreten neuer Effekte	101
5.3.5.3	Senkung des ROS-Levels führt zu Veränderungen des Blutbildes	103
5.3.6	PON2-defiziente Knochenmarkszellen zeigen eine verbesserte Repopulationsfähigkeit in kompetitiven Transplantationen.....	105

5.3.6.1	Keine Änderung des prozentualen Anteils quieszenter bzw. zyklischer LSK-Zellen und LT-HSCs in PON2-defizienten Mäusen.....	107
5.3.6.2	Die Zielfindungsfähigkeit (<i>homing</i>) der PON2 ^{-/-} -Knochenmarkzellen weist keine Unterschiede zum Wildtyp auf.....	108
5.3.6.3	PON2-defiziente Knochenmarkzellen zeigen keine gesteigerten Differenzierungs-eigenschaften <i>in vitro</i>	110
5.3.7	Modifikation der Erythropoese und potenziell der Thrombopoese durch PON2-Defizienz	111
5.3.7.1	Verlängerte Lebensdauer von Erythrozyten in PON2 ^{-/-} -Mäusen	111
5.3.7.2	PON2-defiziente Mäuse zeigen eine gesteigerte Stress-Erythropoese	112
5.3.7.3	Erhöhter prozentualer Anteil verschiedener Erythrozyten-Entwicklungsstufen im Knochenmark von PON2 ^{-/-} -Mäusen	114
5.3.7.4	PON2 Defizienz führt zu Modifikationen im Zellzyklus von Megakaryozyten/ Erythrozyten Vorläufern (MEPs)	115
5.4	Alte PON2 ^{-/-} -Mäuse weisen verstärkte Modifikationen der Hämatopoese auf.....	116
5.4.1	Während der Alterung kommt es zu vermehrten Auffälligkeiten des Knochenmarks und des Blutbildes PON2-defizienter Mäuse	116
5.4.1.1	Gesteigerte prozentuale Anzahl der LSK-Zellen sowie aller myeloischer Vorläuferzellen in alten PON2-defizienten Mäusen.....	117
5.4.1.2	Das Blutbild alter PON2 ^{-/-} -Mäuse zeigt verschiedene Auffälligkeiten.....	120
5.4.1.2.1	Veränderte my/ly-Verteilung im Blut alter PON2 ^{-/-} -Mäuse weist auf Immunseneszenz hin	122
5.4.1.3	Alte PON2 ^{-/-} -Tiere zeigen eine verringerte Anzahl verschiedener Erythrozyten-Vorläufer im Knochenmark.....	123
5.4.2	Reziproke Transplantation alter Knochenmarkzellen deckt „Verjüngungseffekte“ sowie Mischeffekte und Effekt-Auflösungen auf.....	124
5.4.3	Gesteigerter ROS-Level in HSPCs alter PON2 ^{-/-} -Tiere	130
5.4.4	Oxidativer Stress bewirkt auch in alten PON2-defizienten Tieren keine Induktion der Apoptose oder gesteigerte DNA-Schädigung in HSPCs	131
5.4.4.1	Keine erhöhte Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen in LSK-Zellen alter PON2 ^{-/-} -Tiere.....	131
5.4.4.2	Signifikant verringerte Apoptoseraten in hämatopoetische Stammzellen alter PON2-defizienter Mäuse.....	132
5.4.5	Gesteigerte Überlebensrate von Empfängertieren alter PON2 ^{-/-} -BMCs nach serieller Knochenmarktransplantation.....	133
5.5	Transkriptom-Analysen identifizieren mehr als 300 differentiell exprimierte Gene in PON2 ^{-/-} -LT-HSCs	135

5.5.1	RNA Sequenzierung und Ausrichtung (<i>alignment</i>).....	135
5.5.2	Pathway Analyse unter Verwendung der <i>Ingenuity Pathway Analysis Software</i> (IPA®)	137
6	Diskussion	140
6.1	PON2 reguliert ROS in hämatopoetischen Zellen	140
6.2	PON2 moduliert die genuine HSC-Funktionalität	147
6.3	PON2 modifiziert sowohl die basale Erythropoese und Stress-induzierte Erythropoese als auch die Thrombopoese.....	152
6.4	PON2 ist an der Regulation der Reifung verschiedener Immunzellen in Milz und Thymus beteiligt.....	158
6.5	PON2 ^{-/-} -Mäuse als potenzielles Modell für Stammzellalterung	162
7	Zusammenfassung.....	166
8	Literaturverzeichnis.....	168
9	Publikationen	185
10	Danksagung.....	186
11	Lebenslauf.....	187
12	Anhang	188

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 : Modellierte 3D- Struktur des PON2 Proteins.	21
Abbildung 2 : Der Mechanismus hinter der anti-oxidativen Wirkung der PON2 an der inneren Mitochondrienmembran.	22
Abbildung 3 : PON2 Translokation bei oxidativem Stress.	23
Abbildung 4 : Schematische Darstellung des anti-apoptotischen Mechanismus der Paraoxonase-2.	26
Abbildung 5 : Hierarchisches Modell des murinen hämatopoetischen Systems.	30
Abbildung 6 : Schema altersbedingter Faktoren, die die HSC-Funktion regulieren.	35
Abbildung 7 : Schematische Übersicht der Erythropoese.....	37
Abbildung 8 : Schematische Darstellung des β -geo <i>gene trap</i> Vektors im PON2-Lokus des PON2 ^{-/-} Mausmodells.	47
Abbildung 9 : Schematische Darstellung der <i>in vivo</i> Biotinylierung von Erythrozyten.	62
Abbildung 10 : Schematische Darstellung des Versuchsablaufes während der Induktion einer hämolytischen Anämie durch Phenylhydrazin.	63
Abbildung 11 : Schema der reziproken Knochenmarktransplantation zur Generierung von WT- und PON2 ^{-/-} -Chimären.	65
Abbildung 12 : Der experimentelle Aufbau der kompetitiven Knochenmarktransplantation..	67
Abbildung 13 : Analyse peripherer Leukozyten mittels Durchflusszytometrie.	68
Abbildung 14 : Gemischte Leukozyten-Population	69
Abbildung 15 : <i>Colony forming assay</i>	71
Abbildung 16 : Vergrößerte Milz (Splenomegalie) bei weiblichen, mehr als 9 Monate alten PON2 ^{-/-} -Mäusen	73
Abbildung 17 : Durchschnittliches Milzgewicht von weiblichen und männlichen, jungen und alten PON2 ^{-/-} -Mäusen im Vergleich zu Wildtypen.	74
Abbildung 18 : Befunde aus durchflusszytometrischen Analysen der Milz junger und alter WT- und PON2 ^{-/-} -Mäuse.	75
Abbildung 19 : Durchschnittliches Thymusgewicht von weiblichen und männlichen, jungen und alten PON2 ^{-/-} -Mäusen im Vergleich zu Wildtypen.	76
Abbildung 20 : Immunologische Analysen des Thymus junger und alter Wildtyp- und PON2 ^{-/-} -Mäuse	77
Abbildung 21 : Der PON2-mRNA-Expressionslevel in HSPCs und Leberzellen von WT C57BL/6J Mäusen.....	79

Abbildung 22 : <i>Gating</i> -Strategie zur durchflusszytometrischen Unterscheidung zwischen den verschiedenen Sub-populationen innerhalb der LSK-Fraktion des Knochenmarks.....	80
Abbildung 23 : Befunde aus Analysen der Zellen innerhalb der LSK-Fraktion von Wildtyp- und PON2 ^{-/-} -Mäusen.	81
Abbildung 24 : <i>Gating</i> -Strategie zur durchflusszytometrischen Unterscheidung zwischen den verschiedenen oligo-potenten Vorläuferzellen innerhalb des Knochenmarks.	82
Abbildung 25 : Befunde aus Analysen der oligopotenten Vorläuferzellen der myeloiden Linie.	83
Abbildung 26 : Befunde aus Analysen weiter ausgereifter Blutzellen innerhalb des Knochenmarks.....	84
Abbildung 27 : Befunde aus Analysen des Blutbildes junger PON2 ^{-/-} -Mäuse verglichen mit gleichaltrigen Wildtypen.	86
Abbildung 28 : Unveränderte myeloid/lymphoid-Verteilung im Blut junger PON2-defizienter Mäuse.	87
Abbildung 29 : Überprüfung des <i>Engraftments</i> in Kontrolltieren und Knochenmark-transplantierten Chimären	89
Abbildung 30 : Befunde aus Analysen der Knochenmarkzellen von kontrolltransplantierten Tieren sowie Chimären.....	91
Abbildung 31 : Befunde aus Analysen des Blutbildes der kontrolltransplantierten Tiere sowie der Chimären.....	93
Abbildung 32 : Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen aus jungen PON2 ^{-/-} -Mäusen weisen gesteigerte basale ROS-Level auf.	95
Abbildung 33 : Differentieller Superoxid-Level in WT- und PON2 ^{-/-} -Knochenmarkzellen ...	96
Abbildung 34 : Histogramm des gamma-H2A.X Fluoreszenzsignals zur Analyse von DNA-Doppelstrangbrüchen in LSK-Zellen.	98
Abbildung 35 : Signifikant verringerte Apoptoserate in LT-HSCs PON2-defizienter Mäuse.	99
Abbildung 36 : Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen NAC-behandelter PON2 ^{-/-} -Mäuse weisen verringerte basale ROS-Level auf.	100
Abbildung 37 : Befunde aus Analysen der Knochenmarkzellen NAC behandelte PON2 ^{-/-} -Tiere im Vergleich zu unbehandelten WT- und PON2 ^{-/-} -Mäusen	102

Abbildung 38 : Befunde aus Analysen des Blutbildes NAC behandelter PON2 ^{-/-} -Tiere im Vergleich zu unbehandelten Mäusen.....	104
Abbildung 39 : Repopulationsfähigkeit PON2-defizienter HSCs im Vergleich zu WT- HSCs.....	106
Abbildung 40 : <i>Gating</i> -Strategie zur durchflusszytometrischen Unterscheidung der Zellzyklusphasen mittels Hoechst und Ki-67.....	107
Abbildung 41 : Zellzyklusanalysen an HSPCs aus WT- und PON2 ^{-/-} -Mäusen.	108
Abbildung 42 : Zielfindungsfähigkeit PON2-defizienter Knochenmarkzellen im Vergleich zum Wildtyp.	109
Abbildung 43 : <i>Colony forming assays</i> mit PON2 ^{-/-} - und WT-Knochenmarkzellen.	110
Abbildung 44 : Die Lebensdauer von Erythrozyten und Thrombozyten.	112
Abbildung 45 : Prozentuale Erythrozytenzahl im Blut von PON2 ^{-/-} -und WT-Mäusen während der Induktion einer hämolytischen Anämie durch Phenylhydrazin.	114
Abbildung 46 : Befunde aus der Analyse der verschiedenen Erythrozyten-Entwicklungs- stufen im Knochenmark von WT- und PON2 ^{-/-} -Mäusen.	115
Abbildung 47 : Zellzyklusanalysen an Megakaryozyten/Erythrozyten Vorläufern aus WT- und PON2 ^{-/-} -Mäusen.	116
Abbildung 48 : Befunde aus Analysen der Knochenmarkzellen aus alten WT- und PON2 ^{-/-} -Tieren.....	119
Abbildung 49 : Befunde aus Analysen des Blutbildes alter PON2 ^{-/-} -Mäuse verglichen mit gleichaltrigen Wildtypen.	121
Abbildung 50 : Veränderte myeloid/lymphoid-Verteilung im Blut alter PON2 ^{-/-} -Mäuse im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtypen.	122
Abbildung 51 : Befunde aus der Analyse der verschiedenen Erythrozyten-Entwicklungs- stufen im Knochenmark von alten WT- und PON2 ^{-/-} -Mäusen.	123
Abbildung 52 : Überprüfung des <i>Engraftments</i> in Kontrolltieren und Chimären, trans- plantiert mit Zellen aus alten Knochenmarkspendern.	125
Abbildung 53 : Befunde aus Analysen der Knochenmarkzellen von Kontrolltieren sowie Chimären, transplantiert mit Zellen aus alten Knochenmarkspendern.	127
Abbildung 54 : Befunde aus Analysen des Blutbildes der Kontrolltiere sowie der reziproken Chimären, transplantiert mit Zellen aus alten Knochenmarkspendern.	129
Abbildung 55 : Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen aus alten PON2 ^{-/-} -Mäusen weisen numerisch gesteigerte basale ROS-Level auf.	130

Abbildung 56 : Histogramm des gamma-H2A.X Fluoreszenzsignals zur Analyse von DNA-Doppelstrangbrüchen in LSK-Zellen aus alten Mäusen.....	132
Abbildung 57 : Veränderte Apoptoserate in LT- und ST-HSCs alter PON2 ^{-/-} -Mäuse.	133
Abbildung 58 : Überlebensrate der Empfängertiere im Verlauf der ersten und zweiten Transplantation der Knochen-markzellen aus mehr als 9 Monate alten WT- und PON2 ^{-/-} -Spendertieren.	134
Abbildung 59 : Expressionsmuster der LT-HSCs von PON2 <i>knock-out</i> (ko 1-6) und Wildtyp-Mäusen (control 1-6).....	136
Abbildung 60 : Vulkan-Plot (<i>volcano plot</i>) erstellt mit den Daten der RNA-Sequenzierung von WT- und PON2 ^{-/-} -LT-HSCs.	137
Abbildung 61 : Vergleich der Erythrozyten-Lebensdauer in Foxo3 ^{-/-} - und PON2 ^{-/-} -Mäusen sowie Wildtypen.....	155
Abbildung 62 : Repräsentative Histologie der Milz mehr als 9 Monate alter WT- und PON2 ^{-/-} -Tiere.....	159
Abbildung 63 : Entwicklung der Antigen-aktivierten B-Zelle zur Plasmazelle oder B- Gedächtniszelle	160

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 : Chemikalien.....	42
Tabelle 2 : Verbrauchsmaterialien.	42
Tabelle 3 : Laborgeräte.....	43
Tabelle 4 : Reagenzien und Kits.....	43
Tabelle 5 : Puffer, Lösungen & Medien.	44
Tabelle 6 : Enzyme und Standards.	44
Tabelle 7 : Antikörper für Durchflusszytometrie.	45
Tabelle 8 : Murine Primer-Sequenzen für qRT-PCR Analysen.	46
Tabelle 9 : Murine <i>TaqMan</i> Sonden-Sequenzen für qRT-PCR Analysen.	46
Tabelle 10 : Mausmodelle mit kurzer Beschreibung und Quelle.	46
Tabelle 11 : Antikörper für FACS-Färbungen von Milz-, Thymus- und Knochenmark- zellen	50
Tabelle 12 : Übersicht der Antikörper-Kombinationen zur durchflusszytometrischen Analyse der Milz-, Thymus- und Knochenmarkzellen.	51
Tabelle 13 : Antikörper für die <i>lineage</i> -negativ-Selektion.....	52
Tabelle 14 : Antikörper zur Unterscheidung der verschiedenen Stammzell- und Vorläuferzell- Subpopulationen.....	52
Tabelle 15 : Verwendete AK für den Mastermix zur Oberflächenfärbung der HSPCs für die Zellzyklusanalyse; ange-setzt in PBS.....	56
Tabelle 16 : Reaktionsansatz und Reaktionsprofil der cDNA-Synthese mit dem <i>High Capacity cDNA Reverse Transkription Kit</i>	59
Tabelle 17 : Reaktionsansatz und Reaktionsprofil der cDNA-Synthese mit dem <i>Super ScriptTM VILOTM Master Mix</i>	59
Tabelle 18 : Reaktionsansatz und Reaktionsprofil der <i>TaqMan</i> qRT-PCR.	60
Tabelle 19 : Bewertungsschema für die Beurteilung des Gesundheitszustands der Bestrahlungskontrolle und der Knochenmark-transplantierten Tiere.	66
Tabelle 20 : Übersicht der 3 wichtigsten Netzwerke, erstellt mithilfe der Ingenuity Software.	138
Tabelle 21 : <i>Targets</i> von besonderem Interesse.....	139
Tabelle 22 : Mittels DESeq2 identifizierte differentiell exprimierte Gene	188

Abkürzungsverzeichnis

3OC12	N-3-Oxododecanoyl-Homoserinlacton
5-FU	5-Fluorouracil
Abb.	Abbildung
AHSP	<i>alpha hemoglobin stabilizing protein</i>
AK	Antikörper
ALL	akute lymphatische Leukämie
ATM	Serin-Proteinkinase <i>ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BC(s)	Blutzelle(n) (<i>blood cell(s)</i>)
BFU-E	<i>burst-forming unit erythrocytes</i>
BM	Knochenmark (<i>bone marrow</i>)
BMC(s)	Knochenmarkzelle(n) (<i>bone marrow cell(s)</i>)
Bmi1	<i>Polycomb complex protein BMI-1</i>
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CAT	Katalase
Casp2	Caspase-2
CD	<i>cluster of differentiation</i>
Cdkn1a	<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor</i>
cDNA	komplementäre DNA
CFU-E	<i>colony-forming unit erythrocytes</i>
CFU-G	<i>colony-forming unit granulocyte</i>
CFU-GEMM	<i>colony-forming unit granulocyte/erythroid/macrophage/megakaryocyte</i>
CFU-GM	<i>colony-forming unit granulocyte/macrophage</i>
CFU-M	<i>colony-forming unit macrophage</i>
CHOP	<i>C/EBP homologous protein</i>
Cl	Chlorid
CLP	lymphatische Vorläuferzelle (<i>common lymphocyte progenitor</i>)
cm	Zentimeter
CML	Chronische myeloische Leukämie

CMP	myeloische Vorläuferzelle (<i>common myeloid progenitor</i>)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CXCR4	<i>CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4</i>
CYP450	Cytochrom P450
Cyt <i>c</i>	Cytochrom <i>c</i>
d.h.	das heißt
Da	Dalton
DiI	1,1'-Diiodoctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyaninperchlora
DMEM	standardisiertes Nährmedium (<i>dulbecco's modified eagle medium</i>)
DMNQ	2,3-Dimethoxy-1,4-naphthoquinon
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>ethylene diamine tetraacetic acid</i>)
EPO	Erythropoetin
EpoR	Erythropoetin Rezeptor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	lat. et alii (und andere)
evtl.	eventuell
FACS	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FCS	Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fl	Femtoliter
FOG1	<i>friend of gata1</i>
FoxO	Forkhead-Box-Protein O
g	Gramm
Gadd45a	<i>Growth Arrest and DNA Damage Inducible Alpha</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GATA-1	<i>GATA-binding factor 1</i> , auch <i>erythroid transcription factor</i> genannt
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (<i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i>)
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
ggf.	Gegebenenfalls

GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (<i>Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>)
GMP	Granulozyten/Makrophagen Vorläufer (<i>granulocyte/macrophage progenitor</i>)
GP1BB	<i>Glycoprotein Ib Platelet Beta Subunit</i> , auch als CD42c bekannt
GPX4	Glutathionperoxidase-4
GSK-3 β	Glykogensynthase-Kinase 3 β
Gy	Gray
h	Stunde/n
H ₂ O dest.	destilliertes Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ DCFDA	<i>dichlorodihydrofluorescein diacetate</i>
Hb	Hämoglobin
HCT	Hämatokrit
HDL	Lipoprotein hoher Dichte (<i>high density lipoprotein</i>)
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HIF1	Hypoxie-induzierter Faktor 1
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPCs	hämatopoetische Vorläuferzellen (<i>hematopoietic progenitor cells</i>)
HSC	hämatopoetische Stammzellen (<i>hematopoietic stem cells</i>)
HSPCs	hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen (<i>hematopoietic stem and progenitor cells</i>)
HTLV-I	<i>Human T-cell leukemia virus type I</i>
HWZ	Halbwertszeit
<i>i.p.</i>	intraperitoneal
<i>i.v.</i>	intravenös
IF	Immunfluoreszenz
IFN α	Interferon-alpha
IgG	Immunglobulin G
IL-12p70	Interleukin-12p70
IL3	Interleukin-3, auch <i>Multipotential Colony Stimulating Factor</i> genannt
IL-6	Interleukin-6
IR	Insulinrezeptor, codiert durch das Gen InsR
JAK	<i>Janus protein tyrosine kinase</i>

JNK	c-Jun-Kinase
k	Kilo
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
KLF1	<i>Erythroid Krueppel-Like Transcription Factor</i>
l	Liter
LDL	<i>low density lipoprotein particles</i>
LFA-1	<i>lymphocyte function-associated antigen 1</i>
LT	<i>long-term</i>
Lsg.	Lösung
LSK	lin ⁻ , scar ⁺ , ckit ⁺
L-012	8-amino-5-chloro-7-phenyl-pyrido[3,4-d]pyridazine-1,4(2H,3H)dione
M	Molar
m	Meter bzw. Milli
μ	Mikro
MALT	Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe
MCH	mittlere korpuskuläre Hämoglobin (<i>mean corpuscular hemoglobin</i>)
MCHC	mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (<i>mean corpuscular hemoglobin concentration</i>)
MCV	mittleres Erythrozytenvolumen (<i>mean corpuscular volume</i>)
MEP	Megakaryozyten/Erythrozyten Vorläufer (<i>megakaryocyte/erythroid progenitor</i>)
mg	Milligramm
min	Minute(n)
mind.	Mindestens
Mkrn2	Makorin Ring Finger Protein 2
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
mm	Millimeter
mM	Millimol
MMP	<i>membrane type 1 (MT1)-matrix metalloproteinase</i>
MnSOD	mitochondriale Superoxiddismutase
MPP	multipotente Vorläuferzelle(n) (<i>multipotent progenitor</i>)
MPV	mittleres Thrombozytenvolumen (<i>mean platelet volume</i>)

mRNA	<i>messenger</i> -Ribonukleinsäure
my/ly	myeloid/lymphoid
n	Nano
NAC	N-Acetylcystein
NADPHox	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat-Oxidase
nm	Nanometer
ns	nicht signifikant
Nrf	NF-E2- <i>related factor</i>
O ₂ *-	Superoxid
o.Ä.	oder Ähnliches
OH*	Hydroxyl-Radikal
p53	Protein p53
p45NF-E2	<i>nuclear factor erythroid-derived 2 p45</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
PLAGL2	Zinkfinger-Protein PLAGL2
PLT	<i>platelet count</i>
PO	Paraoxon
PON	Paraoxonase
PON2-iso1	Paraoxonase-2 Isoform 1
PON2-iso2	Paraoxonase-2 Isoform 2
Pro-B	B-Zell-Vorläufer
Pro-DC	Vorläufer dendritischer Zellen
Pro-NK	Vorläufer natürlicher Killerzellen
Pro-T	T-Zell-Vorläufer
PS	Parathion
QH ₂	Ubiquinol
qRT-PCR	quantitative <i>real-time</i> RT-PCR
RBC	<i>red blood cell count</i>
RDW	Erythrozytenverteilungsbreite (<i>red blood cell distribution width</i>)
RECQL4	<i>RecQ Like Helicase 4</i>
Redox	Reduktion-Oxidation

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNS	Reaktive Stickstoffspezies (<i>reactive nitogene species</i>)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygene species</i>)
RT	Reverse Transkription bzw. Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
RUNX	<i>runt related transcription factor 1</i>
s	Sekunde
SCF	<i>stem-cell factor</i>
SDF-1	<i>stromal-derived factor 1</i> auch CXCL12 genannt
siRNA	kleine eingreifende RNA (<i>small interfering RNA</i>)
SIRT1	Sirtuin-1
SOD	Superoxiddismutase
SPI1	<i>Spi-1 proto-oncogene</i>
ST	<i>short-term</i>
STATs	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TAL1	<i>Erythroid Differentiation Factor</i>
T-ALL	T-Zell akute lymphatische Leukämie
TARC	<i>Translational Animal Research Center</i>
TERT	Telomerase reverse transcriptase
TierSchG	Tierschutzgesetz
TNF	Tumornekrosefaktor
TPO	Thrombopoietin
Txnip	<i>thioredoxin-interacting protein</i>
UPR	<i>unfolded protein response</i>
vgl.	vergleiche
VLA4	<i>Very Late Antigen-4</i> , auch Integrin $\alpha 4\beta 1$ genannt
vs.	Versus
WBC	<i>white blood cell count</i>
WBMCs	<i>whole bone marrow cells</i>
WT	Wildtyp
XO	Xanthin Oxidase
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Die Proteinfamilie der Paraoxonasen

Die Paraoxonase Familie besteht aus 3 Mitgliedern: Paraoxonase-1, -2 und -3. Die 3 Gene, die für PON1 - 3 codieren, sind bei Menschen gemeinsam auf dem langen Arm des Chromosoms 7 (7q21.3-22.1) ¹ und bei der Maus auf dem Chromosom 6 lokalisiert. Diese physische Nähe sowie die hohe Strukturhomologie lassen die Vermutung zu, dass die Gene durch Genduplikation eines gemeinsamen evolutionären Vorläufers entstanden sind ². Auch innerhalb verschiedener Säugetierspezies sind die PON Gene hoch konserviert, so weist beispielsweise PON2 in Maus und Mensch eine Identität von über 85 % auf ³. Der Name Paraoxonase entstammt Studien von W.N. Aldridge aus dem Jahr 1953 ⁴. In diesen Studien wurde mittels *in vitro* Analysen gezeigt, dass das Enzym Paraoxonase-1 das toxische Metabolit von Parathion (PS, auch E 605 genannt), das Paraaxon (PO, auch bekannt als E 600), hydrolysiert. Nach der Entdeckung der beiden anderen Gene, PON2 und PON3, wurde die Nomenklatur einfach beibehalten, obwohl weder die PON2 noch -3 PO hydrolysieren kann ³. Trotz ihrer starken genetischen Ähnlichkeit weisen die drei Paraoxonasen grundlegende Unterschiede in ihrer enzymatischen Aktivität, Lokalisation und Regulation auf. PON1 wird vorwiegend in der Leber exprimiert, dort sekretiert und liegt zum größten Teil assoziiert an HDL (*high density lipoprotein*) im Serum vor. PON2 hingegen ist ein ubiquitär exprimiertes, ausschließlich intrazelluläres Protein. PON3 wird wie PON1 in der Leber, zusätzlich aber auch in anderen Geweben exprimiert ⁵. Zum geringen Teil liegt PON3 HDL-assoziiert im Blutkreislauf vor, die Lokalisation der PON3 scheint jedoch mit der Spezies zu variieren ⁶. Erst 2012 wurde für PON3 außerdem eine intrazelluläre Lokalisation, in den Mitochondrien und im ER, nachgewiesen ⁷. Eine Funktion, die alle 3 Paraoxonasen gemein haben, ist deren Arylesterase- und Laktonase-Aktivität, wobei PON1, -2 und -3 verschiedene und z.T. überlappende Substratspezifitäten aufweisen ^{8,9}. Die Laktonase-Aktivität ist bei allen Vertretern sehr stark ausgeprägt und stellt dadurch vermutlich deren wichtigste enzymatische Aktivität dar. Draganov et al. haben 2005 experimentell nachgewiesen, dass Phenylacetat und Organophosphat für PON1, Acyl-Homoserin Lactone für PON2 und Lovastatin und Spironolacton für PON3 die besten und spezifischsten Substrate darstellen ⁸. Zu den oben genannten Acyl-Homoserin Lactonen zählt unter anderem 3OC12 (N-3-Oxododecanoyl-Homoserinlacton), ein Molekül, das von *Pseudomonas aeruginosa* (einem opportunistischen Krankenhauskeim) als Signalmolekül verwendetet wird. PON2 kann 3oxoC12 hydrolysieren,

was zu einer Störung des *quorum-sensing* führt und damit die Virulenz der Bakterien verringert. Experimentell konnte dies an PON2 *knock-out* Mäusen gezeigt werden, die sehr viel sensitiver gegenüber *P. aeruginosa* Infektionen sind als entsprechende Wildtyp-Mäuse¹⁰. Eine weitere einheitliche Funktion aller PONs ist deren anti-oxidative Wirkung. Diese Wirkung spiegelt deren Einfluss auf verschiedene Krankheitsbilder wider, bei denen oxidativer Stress und eine Störung des Redox-Gleichgewichts von essentieller Bedeutung sind. Anhand von Mausmodellen konnten beispielsweise allen Paraoxonasen anti-atherogene Eigenschaften nachgewiesen werden¹¹⁻¹⁴.

1.1.1 Paraoxonase-2

Obwohl das Enzym Paraoxonase-2 erst wesentlich später als Paraoxonase-1 entdeckt wurde, zeigen phylogenetische Analysen, dass es sich bei PON2 höchst wahrscheinlich um den ältesten Vertreter der Paraoxonase-Familie handelt¹⁵. Wie in 1.1 bereits erwähnt, ist PON2 ein ausschließlich intrazelluläres, ubiquitär exprimiertes Enzym. In Mäusen wurde der höchste PON2-Level in Lunge und dem Dünndarm gemessen, gefolgt von Herz und Leber, während Testikel, Nieren und Gehirn einen niedrigen Level aufwiesen¹⁶. Neben dem divergenten Expressionslevel in den Ge-weben variiert die PON2-Expression auch mit dem Geschlecht. Im Jahr 2011 wurde aufgedeckt, dass Frauen eine 3- bis 4-fach höhere PON2-Expression aufweisen als Männer¹⁶. Das Mole-kulargewicht der PON2 beträgt etwa 43 kDa¹. Durch Spleißen der PON2-mRNA entstehen beim Menschen 2 Isoformen, PON2-iso1 und PON2-iso2^{17, 18}. Bisher ist jedoch nicht bekannt, ob sich die Isoformen in ihrer Lokalisation, Expression und/oder Funktion unterscheiden.

Die für diese Arbeit wichtigste Funktion der PON2 ist ihre anti-oxidative Wirkung. Zu oxidativem Stress kommt es vor allem dann, wenn die Aktivität oxidativer Systeme die Aktivität anti-oxidativer Systeme übersteigt. Infolge dessen werden ROS-sensitive Signalwege modifiziert und Schäden an Zellen bzw. Geweben verursacht. Im Gegensatz zu PON1 und PON3 greift PON2 zum Schutz vor erhöhter Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, siehe 1.2.1) auf einen Zell-basierten Mechanismus zurück¹⁹⁻²¹. 2007 wurde von Horke et al. gezeigt, dass ein PON2 *knock-down* in vaskulären Zellen den intrazellulären ROS-Gehalt erhöht, wohingegen eine PON2 Überexpression den ROS-Level

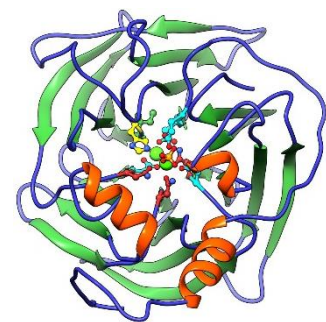


Abbildung 1: Modellierter 3D-Struktur des PON2 Proteins. Homologiemodell erstellt von Dr. Martin Haugwitz mithilfe des Programms UCSF Chimera.

deutlich senkt ¹⁸. Wenige Jahre später wurde von Altenhöfer et al. nachgewiesen, dass PON2 speziell die Freisetzung von Superoxid von der inneren Mitochondrienmembran verringert, jedoch keinen Einfluss auf andere reaktive Sauerstoffverbindungen wie beispielsweise Wasserstoffperoxid oder Peroxi-nitrit hat ²¹. Der Mechanismus hinter dieser Prävention der Superoxid-Produktion wird in Abbildung 2 dargestellt.

Die mitochondriale Atmungskette beginnt mit der Übertragung zweier Elektronen von NADH auf den Komplex I. Anschließend werden die Elektronen auf Ubiquinon (auch Coenzym Q10 genannt) übertragen, wodurch Ubiquinol (QH₂) entsteht. Dieses wird anschließend von Komplex III unter der Übertragung von zwei Elektronen wieder zu Ubiquinon oxidiert. Eines der beiden Elektronen wird auf Cytochrom C übertragen und zu Komplex IV transportiert, während das zweite Elektron in den sogenannten Q-Zyklus einfließt ²². Das von Cytochrom C transportierte Elektron wird auf Komplex IV übertragen, der nach dem Empfang von vier Elektronen molekularen Sauerstoff zu Wasser oxidiert. Die während des gesamten Elektronen-transportes in den Intermembranraum gepumpten Protonen fließen nun, entlang ihres Gradienten, durch Komplex V zurück in die Matrix, wobei ATP synthetisiert wird. Innerhalb der mitochondrialen Atmungskette entstehen sowohl an Komplex I also auch an Komplex III relativ große Mengen Superoxid, die anschließend an beide Seiten der inneren Mitochondrienmembran abgegeben werden ^{23, 24}. Wie in Abbildung 2 zu erkennen ist, bindet PON2 in der inneren Mitochondrienmembran an Coenzym Q, was die Übertragung von Elektronen durch Komplex I und Komplex III auf molekularen Sauerstoff verhindert ^{7, 21, 25}. Die Funktion der PON2 ist also präventiver Natur, da sie die Superoxid-Bildung Coenzym Q10-abhängig verhindert, jedoch kein bereits entstandenes Superoxid abbauen kann. Punktmutationsstudien von Altenhöfer et al. haben 2010 außerdem gezeigt, dass die von PON2 ausgehende anti-oxidative Funktion unabhängig von deren Laktonase-Aktivität ist ²¹.

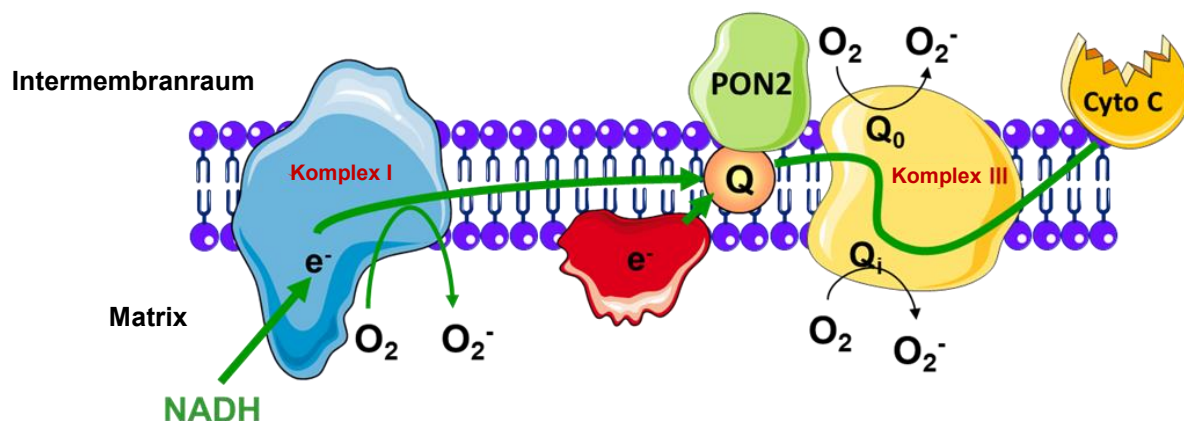


Abbildung 2: Der Mechanismus hinter der anti-oxidativen Wirkung der PON2 an der inneren Mitochondrienmembran. Schematische Darstellung der Rolle von PON2 innerhalb der mitochondrialen Atmungskette. Paraoxonase-2 bindet an Coenzym Q und bewirkt dadurch eine Prävention der Superoxid-Produktion an Komplex I und III. Abbildung übernommen und modifiziert aus Witte et al. 2012 ⁷.

Im Jahr 2014 wurde von Hagmann et al. nachgewiesen, dass der durch PON2 gewährte Schutz vor oxidativem Stress zu einer Inhibition der Peroxidation von Plasmamembranlipiden führt ²⁶. In seiner Studie wurde beschrieben, dass es sich bei PON2 um ein Transmembranprotein handelt, das als Reaktion auf oxidativen Stress vom ER an die Plasmamembran translozieren kann (siehe Abbildung 3). Dort wird die ROS-induzierte Lipidperoxidation durch die extrazelluläre, C-terminale Domäne von PON2 gehemmt. Dies geschieht vermutlich durch die hydrolytische Aktivität der PON2.

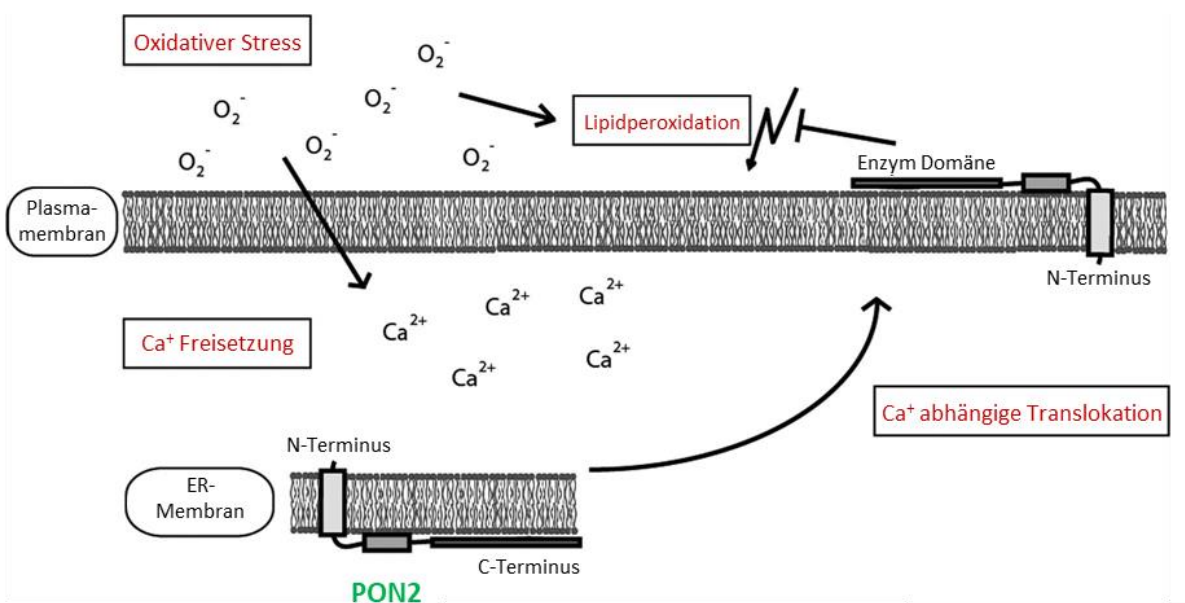


Abbildung 3: PON2 Translokation bei oxidativem Stress. Schematische Darstellung der PON2 Translokation in Reaktion auf oxidativen Stress und der PON2-vermittelten Inhibition der Peroxidation von Plasmamembranlipiden. Verändert in Anlehnung an Hagmann et al. 2014 ²⁶.

Des Weiteren wird vermutet, dass der von PON2 ausgehende anti-oxidative Effekt eine wichtige Rolle in der Vorbeugung von atherosklerotischen Prozessen spielt ^{13, 27}. Dieser protektive Effekt wurde ebenfalls für PON1 und PON3 beschrieben. Bei der Atherosklerose handelt es sich um eine chronisch inflammatorische Krankheit, die dadurch charakterisiert ist, dass zahlreiche Zellen, Lipide und extrazelluläre Matrices in der Intima der Arterien akkumulieren. Dieser Prozess wird dann verstärkt angeregt, wenn erhöhte Level reaktiver Sauerstoffspezies Lipide und Sterole modifizieren, die dadurch wiederum einen Teufelskreis von unerwünschter Entzündung und mehr oxidativem Stress auslösen ⁷. In Mäusen konnte deshalb bereits 1998 eine negative Korrelation zwischen dem PON Level und Atherosklerose

gezeigt werden ¹¹. Durch *in vitro* Analysen konnte später nachgewiesen werden, dass PON2 die Oxidation von LDL verhindern und die anti-oxidativen Eigenschaften sowie die Cholesterol-Ausstromkapazität von HDLs erhöhen kann, obwohl sie nicht an den Lipoproteinen zu finden ist ^{13, 14, 20, 28-30}. 2006 wurde von Lg et al. gezeigt, dass PON2 defiziente Mäuse aufgrund von erhöhten ROS-Leveln deutlich größere arteriosklerotische Läsionen aufweisen als jene Mäuse, die über einen normalen PON2- Expressionslevel verfügen ¹³. Umgekehrt wurde außerdem nachgewiesen, dass eine adenovirale Überexpression humaner PON2 in ApoE^{-/-} Mäusen eine Verringerung der Arteriosklerose bewirkt ²⁷. In diesem Zusammenhang zeigte eine Über-expression der PON2 in vaskulären Zellen, dass PON2 die intrazelluläre Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies vermindert, dadurch einer Dysfunktion des Endothels entgegenwirkt und somit einen Schutz vor Atherosklerose bilden könnte ¹⁸.

Neben den bereits genannten Studien wurde erst kürzlich von Ebert et al. nachgewiesen, dass PON2 durch einen Redox-abhängigen Mechanismus die endotheliale *tissue factor*- (TF) Aktivität reguliert und dabei die systemische Aktivierung der Koagulation sowie Inflammation verhindert ³¹. Dieser Mechanismus konnte *in vivo* an PON2^{-/-}-Mäusen aufgedeckt werden, die eine verstärkte Gerinnung aufwiesen, was sich durch signifikant verkürzte Gerinnungszeiten, erhöhte Gerinnungsfaktoraktivitäten und eine verstärkte pro-koagulatorische Thrombozyten-aktivität äußerte. Durch verschiedenste Methoden wurde außerdem oxidativer Stress in der Gefäßwand sowie ein pro-inflammatorisches und dysfunktionales Endothel aufgedeckt. Zurückge-führt werden konnte der pro-koagulatorische Phänotyp auf eine signifikant verstärkte TF-Aktivität, was eine endothelabhängige, TF-vermittelte Gerinnungsregulation durch PON2 implizierte. ³¹

Aufgrund der Tatsache, dass ROS auch als Signalmoleküle innerhalb verschiedenster *signaling-pathways* fungieren (siehe 1.2.1), hat die anti-oxidative Funktion von PON2 auch Aus-wirkungen auf den programmierten Zelltod (Apoptose) ^{5, 32}. Apoptose ist ein streng geregelter physiologischer Vorgang der auch als programmierter Zelltod bezeichnet wird. Er dient unter anderem der Beseitigung beschädigter oder infizierter Zellen, um deren Ausbreitung zu verhindern und damit verbundene Schäden am Gesamtorganismus zu minimieren. Gekennzeichnet ist der Prozess der Apoptose durch Bildung von membranumschlossenen Apoptosekörperchen (*apoptotic bodies*), Zerstörung des Zytoskeletts, Schrumpfen der Zelle, Verdichtung des Nukleus, Chromatiden-Kondensation und DNA-Fragmentierung. Zellüber-reste werden nach Abschluss des Apoptose-Vorgangs

von Phagozyten aufgenommen und zerstört. Die Aktivierung der Apoptose kann von verschiedenen Faktoren ausgehen. Ein Beispiel dafür ist eine übermäßig gesteigerte Freisetzung von Superoxid ($O_2^{\bullet-}$), das zunächst spontan oder enzymatisch durch die mitochondriale Superoxiddismutase (MnSOD) zu H_2O_2 disproportioniert wird. Das entstandene H_2O_2 dient Cytochrom C als Substrat, um Cardiolipin zu oxidieren. In Folge dieser Modifizierung ändert das Cardiolipin seine Konformation und gibt das assoziierte Cytochrom C frei^{33, 34}. Dieses Ereignis ruft wiederum eine Öffnung der Poren in der inneren mitochondrialen Membran hervor, wodurch das Cytochrom C aus den Mitochondrien austreten kann³⁵. Die Ausschüttung von Cytochrom C aktiviert die Caspase-9, welche schließlich die Caspase-3 aktiviert und somit die Apoptose initiiert. Wie in Abb. 7 zu erkennen, vermindert PON2 die Superoxidproduktion an der inneren Mitochondrienmembran (siehe auch Abbildung 2), verhindert dadurch die Cardiolipin-Peroxidation, die Cytochrom C Freisetzung, die Caspase Aktivierung und dadurch die Apoptose. Dieser Zusammenhang wurde 2011 von Witte et al. in Zellkulturexperimenten nachgewiesen³². Ein zweiter Faktor, der zur Initiierung der Apoptose führen kann, ist der sogenannte ER-Stress (ER = endoplasmatisches Retikulum). ER-Stress beschreibt eine Störung der Homöostase des ERs, die durch verschiedene Faktoren wie z.B. erhöhte ROS Mengen, Hypoxie o.Ä. bedingt sein kann und den *unfolded protein response* (UPR) Signalweg auslöst. Der Name UPR ist auf eine Akkumulation falsch gefalteter bzw. ungefalteter Proteine zurückzuführen. Das Ziel der Initiierung des UPR ist das Überleben der Zelle, was daran zu erkennen ist, dass die Proteintranslation blockiert und verschiedene Chaperone induziert werden, was eine Wiederherstellung der ER-Hämostase und somit der ER-Funktion zur Folge hat. Schlagen diese Bemühungen jedoch fehl und der ER-Stress kann nicht bewältigt werden, wird die Apoptose eingeleitet³⁶. Horke et al. konnten 2007 zeigen, dass es durch ER-Stress zu einer gesteigerten Expression von PON2 kommt¹⁸. PON2 kann die ER-Stress induzierte Apoptose hemmen, indem sie die Aktivierung der c-Jun-Kinase (JNK) reduziert und dadurch zu einer verminderten Induktion der pro-apoptotischen CHOP beiträgt (siehe Abbildung 4)³⁷.

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass PON2 sowohl in den Mitochondrien als auch im endoplasmatischen Retikulum zu einer Verringerung pro-apoptotischer Stimuli beiträgt und der Zelle somit einen Schutz vor Apoptose bietet.

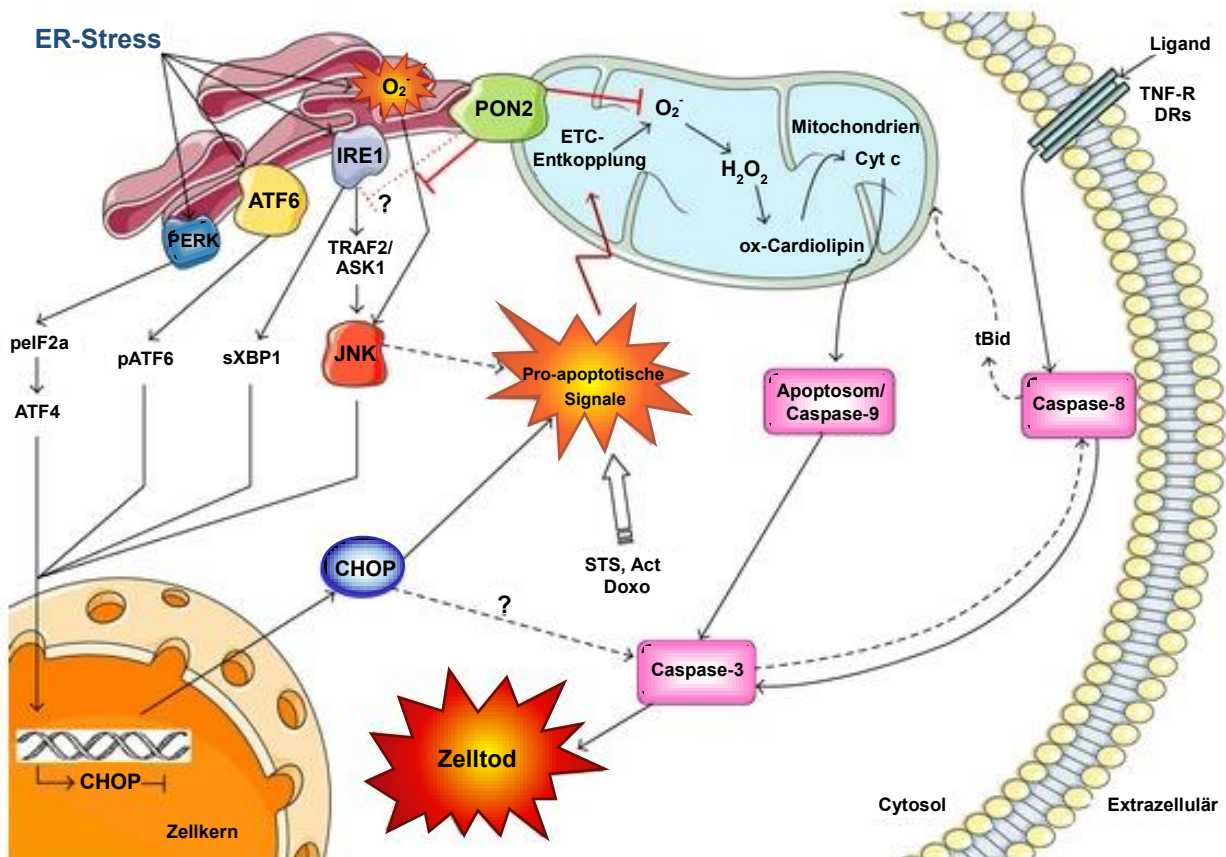


Abbildung 4: Schematische Darstellung des anti-apoptotischen Mechanismus der Paraoxonase-2. Die Verhinderung der Superoxid-Produktion durch PON2 beeinflusst sowohl mitochondriale pro-apoptotische Signalwege (z.B. Cardiolipin-Peroxidation und Cytochrom C Freisetzung) als auch ER-Stress induzierte Signalwege (über JNK und CHOP). Nähere Beschreibung siehe Text. Abbildung übernommen und modifiziert aus Witte et al. 2012 ⁷.

Die multiplen Funktionen der PON2, die im Zusammenhang mit essentiellen Zellfunktionen stehen, machen PON2 zu einem äußerst attraktiven pharmakologischen Target.

1.1.1.1 Paraoxonase-2 und Leukämie

Im Anschluss an kardiovaskuläre Krankheiten (38,55 % 2015) stellen Krebserkrankungen (25,27 % 2015) die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar ³⁸. Die absolute Zahl der Neuerkrankungen an Krebs hat sich seit Anfang der 1970er Jahre in Deutschland fast verdoppelt. Eine wesentliche, aber nicht die einzige Ursache, ist die demografische Alterung der Bevölkerung in diesem Zeitraum. Bei etwa 3 % der Krebsneuerkrankungen bei Erwachsenen handelt es sich um Leukämie, die im Deutschen auch als (weißer) Blutkrebs bezeichnet wird. Viel erschreckender ist jedoch die Tatsache, dass Leukämie, mit 34,1 % im Zeitraum zwischen 2001 und 2010, die am häufigsten auftretende Krebsart bei Kindern ist ³⁹.

Aufgrund der Tatsache, dass sich viele Krebszellen, darunter auch Leukämiezellen, anti-apoptotische und anti-oxidative Mechanismen zunutze machen, um ihre Immortalität zu gewährleisten, erscheint es verständlich, dass auch PON2 mit verschiedenen malignen Erkrankungen assoziiert wurde. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass PON2 in vielen Tumorgeweben hochreguliert war. So beschreiben beispielsweise Pise-Masison et al. eine Überexpression der Gene für PON2, GATA-2 und PLAGL2 in HTLV-I (*Human T-cell leukemia virus type I*) - infizierten Zellen⁴⁰. Weiterhin konnte eine Überexpression von PON2 in Patienten mit pädiatrischer akuter lymphatischer Leukämie (ALL) festgestellt werden⁴¹. Im Jahr 2010 wurde PON2 außerdem als einer von wenigen Markern identifiziert, die mit einer schlechten Prognose bei diesen Patienten assoziiert sind⁴². Eine weitere Studie belegte, dass eine erhöhte PON2-Expression in Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie (CML) mit einer Resistenz gegen Imatinib assoziiert ist⁴³. Auf dieser Grundlage wurden in unserer Arbeitsgruppe Versuche an verschiedenen Leukämiezelllinien durchgeführt. Die Experimente ergaben, dass ein *knock-down* von PON2 in verschiedenen Zelllinien, z.B. in K562 Zellen (einer CML Zelllinie), zu spontaner Apoptose führt. Ferner kam es zu einer gesteigerten Empfindlichkeit dieser Zellen gegenüber Chemotherapeutika. Umgekehrt konnte ebenfalls gezeigt werden, dass eine PON2 Überexpression zu einer gesteigerten Resistenz der Zellen gegenüber der Behandlung mit Imatinib führt³². Kürzlich wurde von Krüger et al. aufgedeckt, dass die PON2-Expression in humanen Tumoren sowie Krebszelllinien durch den Wnt/GSK-3 β / β -catenin Signalweg vermittelt wird⁴⁴.

Aufgrund dieser Analysen liegt der Schluss nahe, dass PON2 in Zukunft evtl. als Biomarker für Therapieresistenz oder als prognostischer Tumormarker angewendet werden könnte.

1.2 Oxidativer Stress

Im aeroben Organismen ist die Bildung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS/RNS) unvermeidlich. Über eine lange Zeit wurden ROS und RNS lediglich als Komponenten der körpereigenen Immunabwehr gegen Mikroorganismen oder als zufällige, schädliche Nebenprodukte des aeroben Metabolismus betrachtet. Heutzutage liegt jedoch eine Vielzahl an Publikationen vor, die eine Rolle von ROS/RNS als Signalmoleküle in der Redox-Signalweiterleitung innerhalb verschiedenster physiologischer Prozesse belegen⁴⁵.

Die Bezeichnung oxidativer Stress beschreibt ein Ungleichgewicht aus übermäßiger Bildung bzw. Freisetzung von ROS- oder RNS bei mangelnder anti-oxidativer Verteidigung.

1.2.1 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Die Bezeichnung reaktive Sauerstoffspezies (ROS) steht für verschiedene kurzlebige, von Sauerstoff abgeleitete Moleküle. Zu den wichtigsten Vertretern zählen Superoxid ($O_2^{\bullet-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das Hydroxyl-Radikal ($OH^{\bullet}$)⁴⁶. Das unter physiologischem pH als Anion vorliegende Superoxid ist selbst kaum oxidierend, stellt aber dennoch die initiale reaktive Sauerstoffspezies dar. Wichtige Charakteristika des Superoxids sind seine kurze Halbwertszeit sowie sein Unvermögen biologische Membranen zu durchdringen, was auf seinen radikalischen Charakter sowie auf seine negative Ladung zurückgeführt werden kann. Superoxid kann unter physiologischen Bedingungen sowohl enzymatisch als auch nicht-enzymatisch umgewandelt werden. Die enzymatische Umwandlung erfolgt mithilfe der Superoxiddismutase (SOD), die in der Lage ist, $O_2^{\bullet-}$ zu je einem Wasserstoffperoxid-Molekül (H_2O_2) und Wasser (H_2O) zu dismutieren^{47, 48}. Nicht-enzymatisch kann Superoxid zu H_2O_2 oder Singulett-Sauerstoff (1O_2) umgewandelt werden. Im Gegensatz zu Superoxid wirkt Wasserstoffperoxid oxidativ, hat eine längere Halbwertszeit, kann biologische Membranen überwinden und hat keinen radikalischen Charakter. Durch die sogenannte Fenton-Reaktion kann H_2O_2 in Gegenwart der Übergangsmetalle Eisen (Fe^{2+}) oder Kupfer (Cu^{1+}) in das Hydroxylradikal ($OH^{\bullet}$) umgewandelt werden, das hochreaktiv ist⁴⁹. $OH^{\bullet}$ kann nahezu alle Makromoleküle oxidieren, was durch die Dissoziation zu zwei Molekülen Wasser mithilfe von Katalase, Thiothredoxinperoxidase oder Glutathionperoxidase verhindert werden soll.

ROS entstehen als Nebenprodukt zahlreicher metabolischer Prozesse und führen in hoher Konzentration unmittelbar zu Schäden an Proteinen, Membranen und der DNA⁵⁰. Außerdem können sie Apoptose induzieren⁵¹ und sind zudem an der Alterung von Zellen und der Entstehung einer Vielzahl von Krankheiten wie beispielsweise Krebs und Diabetes beteiligt⁵². Die meisten Organismen besitzen deshalb Enzyme, die sie gegen die toxischen und sehr reaktiven Intermediate des Sauerstoffs schützen. Trotz dieser zunächst ausschließlich negativ klingenden Eigenschaften der reaktiven Sauerstoffspezies, werden diese auch vom Organismus benötigt. Ein Beispiel liefert die in 1.2 erwähnte Rolle von ROS in der Abwehr von Bakterien. Während der Phagozytose setzen Makrophagen und neutrophile Granulozyten große Mengen reaktiver Sauerstoffspezies frei, was als *oxidative burst* bezeichnet wird. Diese antimikrobiellen Handlungen müssen jedoch sehr gezielt eingesetzt werden, da die freigesetzten ROS auch umliegendes Gewebe schädigen können, was bei starken Entzündungen auch geschieht⁵¹. Des Weiteren spielen ROS eine wichtige Rolle als chemische Botenstoffe in der zellulären Signaltransduktion.

Trotz der Tatsache, dass diese ROS-vermittelte Signaltransduktion für essentielle Zellfunktionen benötigt wird, führen pathologisch erhöhte Level reaktiver Sauerstoffverbindungen zu Störungen im sogenannten *Redox-Signaling*.

1.3 Das hämatopoetische System

Unter Hämatopoese versteht man sowohl die embryonale und adulte Blutbildung als auch die Funktion von adulten hämatopoetischen Stammzellen (*hematopoietic stem cells*, HSCs), sich selbst zu erneuern, zu proliferieren und zu differenzieren. Sie kann anhand des Ortes der Blutbildung in zwei Prozesse eingeteilt werden: Die Myelopoese, die ausschließlich im Knochenmark stattfindet und die Erythrozytopoese (siehe 1.3.3), die Granulozytopoese, die Monozytopoese und die Thrombozytopoese umfasst, sowie die Lymphopoese, die sich zunächst auch im Knochenmark vollzieht, bevor die weitere Differenzierung der Zellen, je nach Zelltyp, in den verschiedenen lymphatischen Organen (Thymus, Lymphknoten, Milz) stattfindet (siehe 1.3.4).

Da die meisten Blutzellen eine begrenzte Lebensdauer aufweisen, muss für eine ständige Erneuerung gesorgt werden. Zum Beispiel zirkulieren Erythrozyten nur für ca. 3 bis 4 Monate im Blut und werden dann vor allem in Leber und Milz durch Phagozyten zerstört. Bei einem erwachsenen Menschen müssen etwa 2×10^{11} Erythrozyten und 10^{10} Leukozyten täglich neu gebildet werden, um eine konstante Anzahl an Zellen im Blut aufrechtzuerhalten (Homöostase) ⁵³. Wie in Abbildung 5 dargestellt, ist das hämatopoetische System hierarchisch organisiert. Bei den sogenannten *long-term* (LT)-HSCs handelt es sich um die am wenigsten differenzierten Stammzellen, welche durch Selbsterneuerung der Erhaltung des HSC-Pools über einen langen Zeitraum hinweg dienen. Aus ihnen differenzieren *short-term* (ST)-HSCs, die nur eine kurze Phase der Selbsterneuerung durchlaufen und anschließend in die etwas stärker determinierten, multipotenten Vorläuferzellen (MPPs) differenzieren oder durch Apoptose absterben. Diese Vorläuferzellen haben bereits die Fähigkeit der Selbsterneuerung verloren, sind aber noch in der Lage, zu Zellen der myeloiden und der lymphoiden Linie zu differenzieren ⁵⁴. Mit zunehmender Differenzierung verlieren die Zellen ihre Pluripotenz und es entwickeln sich Zellen, die in ihrer Differenzierung zunehmend auf bestimmte hämatopoetische Zelllinien determiniert sind ⁵⁵. Diese sogenannten Linien-spezifischen, oligopotenten Vorläuferzellen, die sich aus MPPs entwickelt haben, können durch spezifische Oberflächenantigene oder linientypische Zelleigenschaften (voneinander) unterschieden werden. Wie in Abbildung 5 dargestellt, unterscheidet man myeloische Vorläuferzellen

(*common myeloid progenitors*, CMPs) und lymphatische Vorläuferzellen (*common lymphoid progenitors*, CLPs). CMPs differenzieren entlang ihrer Linien-Zugehörigkeit zu Megakaryozyten/Erythrozyten Vorläufern (*megakaryocyte/erythroid progenitors*, MEPs), zu Granulozyten/Makrophagen Vorläufern (*granulocyte/macrophage progenitors*, GMPs), sowie zu Vorläufern dendritischer Zellen (Pro-DC). CLPs hingegen entwickeln sich zu T-Zell- (Pro-T), B-Zell-Vorläufern (Pro-B), Vorläufern natürlicher Killerzellen (Pro-NK) oder zu Vorläufern dendritischer Zellen. Am unteren Ende der Hierarchie-Pyramide des hämatopoetischen Systems befinden sich die ausgereiften Blut-zellen. Sie sind die Basis des zellulären Immunsystems, der Gerinnung und des Transportes von Sauerstoff sowie des Stoffwechselendproduktes Kohlendioxid. Den größten Teil der Blutzellen einer Maus nehmen die Erythrozyten ein (7 bis 12,5 Millionen Zellen pro μl Blut), gefolgt von den Thrombozyten (160 - 410 Tausend Zellen pro μl Blut) und den in sehr geringer Zahl vertretenen Leukozyten (6 -15 Tausend Zellen pro μl Blut) ⁵⁶.

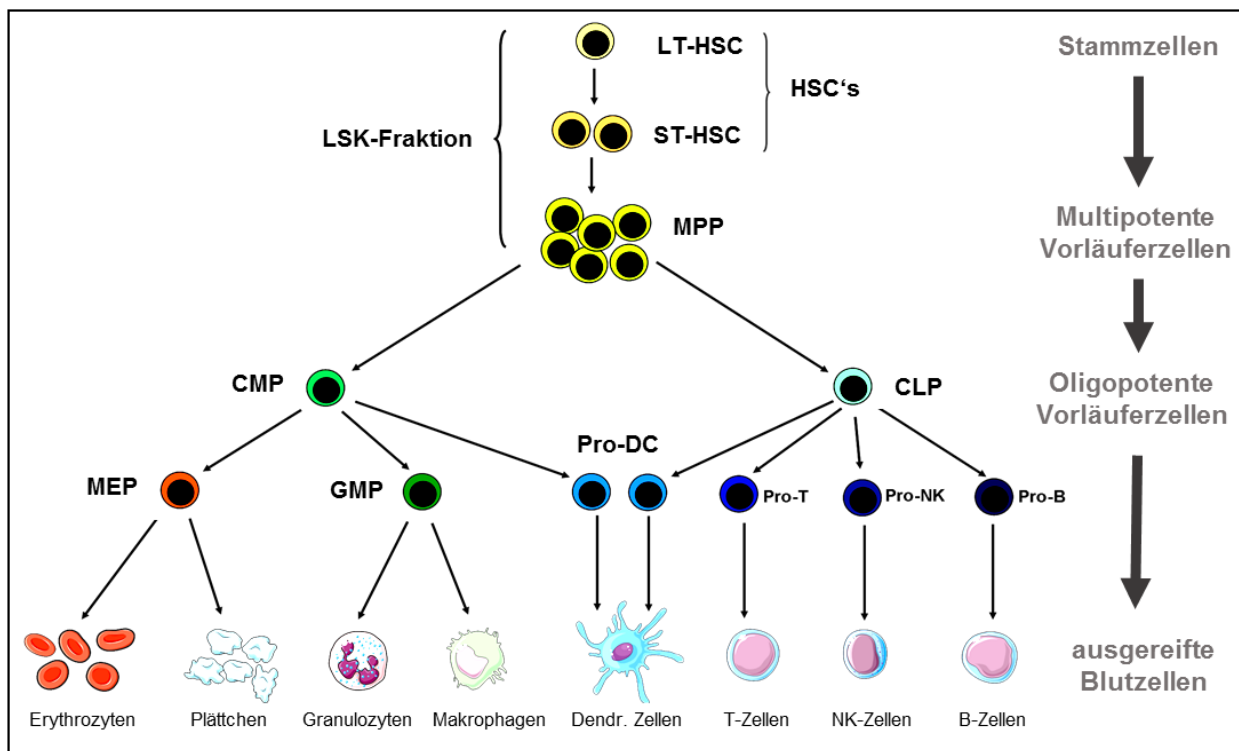


Abbildung 5: Hierarchisches Modell des murinen hämatopoetischen Systems.

Den Ausgangspunkt der Hämatopoese bilden die hämatopoetischen Stammzellen (HSCs - *hematopoietic stem cells*), bestehend aus LT- (*long-term*) und ST- (*short-term*) HSCs. Aus ihnen entstehen multipotente Vorläuferzellen (MPPs – *multipotent progenitors*), die wiederum zu myeloischen (CMPs - *common myeloid progenitors*) oder lymphatischen Vorläuferzellen (CLPs - *common lymphoid progenitors*) differenzieren. CMPs entwickeln sich entsprechend der myeloischen Reihe zu Megakaryozyten und Erythrozyten Vorläufern (MEPs – *megakaryocyte/erythroid progenitors*), zu Granulozyten und Makrophagen Vorläufern (GMPs – *granulocyte/macrophage progenitors*) oder zu Vorläufern dendritischer Zellen (Pro-DC). Diese determinierten Vorläufer differenzieren zu Erythrozyten und Plättchen, zu Makrophagen und Granulozyten sowie zu dendritischen Zellen. CLPs hingegen entwickeln sich entsprechend der lymphatischen Reihe zu T-Zell-, B-Zell-, NK-Zell-Vorläufern oder zu Vorläufern dendritischer Zellen (Pro-DC). Diese Vorläufer differenzieren zu T-, B-, NK- (*natural killer*-) und zu dendritischen Zellen. Übernommen und modifiziert aus Passegue, et al. 2003 ⁵⁷.

1.3.1 Die Knochenmarksnische

Das Konzept der Stammzellnische wurde bereits 1987 von Raymond Schofield vorgestellt, der damit die physiologisch limitierte Mikroumgebung beschreibt, in der Stammzellen ansässig sind ⁵⁸.

Im adulten Organismus verweilen die hämatopoetischen Stammzellen in solchen spezialisierten Bereichen des Knochenmarks (Nischen), die ihnen eine hypoxische Umgebung bieten. Innerhalb dieser Nischen schwankt die Sauerstoffkonzentration im Knochenmark von etwa 6 % auf der Ebene der Blutgefäße zu etwa 1 % in der Nähe des Knochens ^{59, 60}.

Die Knochenmarksnische kann in zwei Bereiche unterteilt werden, die osteoblastische und die vaskuläre Nische, in denen jeweils unterschiedliche Bedingungen für die Stammzellen vorherrschen. Die osteoblastische Nische befindet sich innerhalb der Bindegewebshaut (Endosteum), welche den Knochen auskleidet und eine Abgrenzung vom inneren Markbereich darstellt. Zusammengesetzt ist diese Schicht vorwiegend aus mesenchymalen Zellen, den sogenannten Osteoblasten. Sie stellen die Matrix für die spätere Knochenbildung durch Mineralisierung dar. Die osteoblastische Nische unterstützt die Erhaltung der HSCs sowie die Regulation ihrer Fähigkeit zur Selbsterneuerung und ihres Ruhestadiums (Quieszenz) ⁶¹. Aus diesem Grund befinden sich hier die primitivsten, quieszenten, langzeit-repopulierenden hämatopoetischen Stammzellen. Wenn die Stammzellen in die aktive Phase (Zellzyklusphasen G1, G2, S, M) eintreten, ist es notwendig, dass sie, entlang eines Sauerstoffgradienten, von der extrem hypoxischen osteoblastischen in die vaskuläre Nische wandern, eine Nische im Bereich der Blutkapillarwände (Sinusoide) ⁶². Die dort vorherrschenden Bedingungen favorisieren sowohl Proliferation als auch Differenzierung, wodurch die LT-HSCs zunächst zu ST-HSCs und anschließend weiter zu Vorläuferzellen (Progenitorzellen) differenzieren können. In der vaskulären Nische spielen die Epithelzellen, die die Kapillarwände bilden, eine wichtige Rolle für die Anhaftung der HSCs ⁶³.

Sowohl in der osteoblastischen als auch in der vaskulären Nische spielt die Interaktion der HSCs mit ihrer Umgebung eine essentielle Rolle. Ein Beispiel dafür bildet der Rückhalt der HSCs in ihren Nischen, der durch die Wechselwirkung zwischen spezifischen Rezeptoren, die auf der Oberfläche der HSCs exprimiert werden, und deren Liganden, die von den Nischenzellen exprimiert und sezerniert werden, gesteuert wird. Diese Aufgabe wird von verschiedenen solcher Rezeptor/Liganden-Interaktionen in beiden Nischen erfüllt. Trotz der Tatsache, dass sich die Liganden-Expression von Zellen der Nische geringfügig unterscheidet, scheint eine bestimmte Interaktion in beiden Nischen von besonderer Bedeutung zu sein.

Dabei handelt es sich um die Interaktion zwischen dem auf HSCs exprimierten Rezeptor Cxcr4 und dem von sogenannten CAR (Cxcl12-*abundant reticular*)-Zellen der Nische gebildeten und sezernierten *stromal derived factor 1* (SDF1 α , Cxcl12) ⁶³. Diese beiden Faktoren sind jedoch nicht ausschließlich für die Rückhaltung der HSCs im Knochenmark von Bedeutung, sie spielen auch eine Rolle bei der Migration Cxcr4-exprimierender HSCs aus der fötalen Leber in das Knochenmark und zu späteren Zeitpunkten bei der SDF1 α Gradient-vermittelten Bereitstellung von HSCs zur weiteren Blutzellentwicklung in der Peripherie, wenn Bedarf besteht ⁶⁴.

1.3.2 Hämatopoetische Stammzellen

Im Wesentlichen gibt es zwei Charakteristika, die Stammzellen von allen anderen Zellen im Körper unterscheiden. Erstens können sie sich teilen, aber auch selbst erneuern, und zweitens haben sie die Fähigkeit, sich zu spezialisierten Zellen zu entwickeln. Hämatopoetische Stammzellen erfüllen diese Kriterien und zählen damit zu den multipotenten, adulten Stammzellen. Sie besitzen die Fähigkeit, sowohl sich selbst zu erneuern und damit ein Leben lang ihre eigene Anzahl konstant zu halten, als auch in alle hämatopoetischen Zelllinien zu differenzieren ⁵³. HSCs können sich sowohl symmetrischen als auch asymmetrischen Teilungen unterziehen. Durch symmetrische Teilungen entstehen zwei Tochterzellen, bei denen es sich um zwei HSCs oder um zwei hämatopoetische Vorläuferzellen (HPCs) handelt. Durch asymmetrische Teilung entsteht hingegen eine HSC und eine HPC ⁴⁶.

Es ist seit langem bekannt, dass eine geringe Zahl an hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen (*hematopoietic stem and progenitor cells*, HSPCs) im Blut zirkuliert ⁵⁰, doch der Großteil der HSPCs ist im Knochenmark zu finden. Dort machen die HSCs quantitativ < 0.1 % der kernhaltigen Zellen aus. Es wurden 2 Typen hämatopoetischer Stammzellen definiert: die langzeit-repopulierenden Stammzellen (*long-term-repopulating hematopoietic stem cells*, LT-HSCs), die dazu fähig sind, sowohl ihr Selbsterneuerungspotential als auch ihr *multi-lineage* Differenzierungspotential ein Leben lang aufrecht zu erhalten ⁶⁵, und die kurzzeit-repopulierenden Stammzellen (*short-term-repopulating hematopoietic stem cells*, ST-HSCs), die von LT-HSCs abstammen. Sie haben ihre Multipotenz behalten ⁶⁶, weisen jedoch ein beschränktes Selbsterneuerungspotential auf. ST-HSCs können das myeloide und/oder lymphoide Kompartiment nur über eine kurze Zeitperiode (etwa 6 Wochen) wiederherstellen ^{50, 65}. Experimentell zeigt sich die Fähigkeit von HSCs zur Selbsterneuerung darin, dass sie, nach Transplantation in zuvor letal bestrahlte Mäuse, die gesamte Hämatopoese re-initiieren können ⁶⁷.

1.3.2.1 Der Einfluss von ROS auf hämatopoetische Stammzellen

Der Großteil der hämatopoetischen Stammzellen befindet sich in einem ruhenden Zustand (G0 Phase) und ist nahezu zytokinresistent. Da sie metabolisch wenig aktiv sind, nutzen HSCs hauptsächlich den weniger effektiven Prozess der Glykolyse um ATP zu gewinnen, während die verschiedenen Vorläuferzellen hauptsächlich mitochondriale oxidative Phosphorylierung zur Energiegewinnung nutzen ⁶⁸⁻⁷¹. Glykolyse in quieszenten HSCs wird als Antwort auf die hypoxische Umgebung angesehen und sorgt durch die limitierte Produktion von mitochondrialem ROS für einen Vorteil bei der HSC Erhaltung. In Folge dieser Strategie ist der basale ROS-Level in HSCs vergleichbar niedrig, was sie wiederum sehr sensitiv auf Änderungen dieses Levels reagieren lässt ⁷². Aus diesem Grund hat die Untersuchung des Metabolismus hämatopoetischer Stammzellen in den letzten Jahren stark an Interesse gewonnen. In physiologischer Menge dienen ROS als Signalmoleküle, die verschiedene zelluläre Funktionen, unter anderem HSC Proliferation, Differenzierung und Mobilisierung, steuern. Eine abnormale Steigerung der ROS-Produktion aufgrund verschiedener pathologischer Konditionen kann allerdings die Fähigkeit der HSCs zur Selbsterneuerung inhibieren und induziert Seneszenz, was zum vorzeitigen Erschöpfen der hämatopoetischen Stammzellen und zu hämatopoetischen Dysfunktionen führt ⁷³. Unter diesem Gesichtspunkt beinhaltet die Beeinflussung des ROS-Levels in HSCs enormes medizinisches und pharmakologisches Potential. In den letzten Jahren wurden zahlreiche Studien veröffentlicht, die sich mit der Änderung des Redox-Signalings durch die Aktivität oxidativ oder anti-oxidativ wirkender Faktoren beschäftigen. Zu diesen Faktoren zählen unter anderem Glutathionperoxidase-4 (GPX4), Superoxiddismutase (SOD) -2 und -3, *alpha hemoglobin stabilizing protein* (AHSP), ATM ⁴⁶ und Peroxiredoxin-I, -II, -III ⁷⁴. Weiterhin sind auch Transkriptionsfaktoren, welche die Expression dieser oxidativen oder anti-oxidativen Enzyme kontrollieren, Gegenstand intensiver Forschung. Beispiele stellen die Transkriptionsfaktoren p45NF-E2 ⁷⁵, Nrf (NF-E2-related factor) -1, -2 und -3 ⁷⁶, HIF1 (Hypoxie-induzierter Faktor), p53 ⁴⁶ sowie GATA-1 ⁷⁷ und die FoxOs dar. Letztgenannte Proteine werden als Tumor-Suppressoren eingestuft, da sie einen Zellzyklusarrest in HSCs auslösen und gegebenenfalls Reparatur-Systeme bzw. Apoptose induzieren, sobald die Zellen abnormem oxidativem Stress ausgesetzt werden ⁷⁸. Trotz all dieser Studien existieren immer noch große Lücken im Verständnis der in HSCs regulierten Gene in Reaktion auf oxidativen Stress.

1.3.2.2 Alterung von hämatopoetischen Stammzellen

Vor mehr als 60 Jahren wurde von Denham Harman die Theorie des Alterns aufgrund von freien Radikalen bzw. oxidativem Stress aufgestellt ⁷⁹. Seine Theorie stützte darauf, dass oxidativer Stress, entstanden durch ein Ungleichgewicht zwischen ROS und Antioxidantien, zu einer Schädigung von Makromolekülen führt, deren Anreicherung wiederum zu zunehmendem Funktionsverlust der Zellen und letztendlich zu einer verkürzten Lebensdauer führt. Ob gesteigerter oxidativer Stress während der Alterung tatsächlich zu einer verkürzten Lebenserwartung des Organismus führt bleibt strittig ⁷³, doch es ist Fakt, dass die Fähigkeit von Stammzellen erfolgreich Zellen/Gewebe zu regenerieren, während des Alterungsprozesses allmählich verloren geht ⁸⁰. Weiterführende Studien haben bestätigt, dass HSCs aus alten Tieren multiple, charakteristische Veränderungen aufweisen. Zu ihnen zählt eine beeinträchtigte Zielfindungsfähigkeit (*homing*) ^{81, 82}, gesteigerte DNA-Fragmentierung ^{83, 84}, veränderte Differenzierungsrichtung (Linienentscheidung) ^{85, 86}, erhöhte ROS-Produktion ⁸⁰, gesteigerte Apoptoserate ⁸⁰, reduzierte Telomeraseaktivität, Dysfunktion der Selbsterneuerungsfähigkeit ⁸⁷, vermehrte Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen (z.B. IL-12p70, IL-6 und TNF) sowie Zellzyklusarrest ⁸⁰. Die erhöhte ROS-Produktion in alten HSCs scheint die Folge von zusätzlichen pro-oxidativen Quellen wie CYP450 (Cytochrom P450) und XO (Xanthin Oxidase) (neben den in jungen Mäusen hauptsächlich ROS produzierenden Quellen NADPH-Oxidase und Mitochondrien), sowie der reduzierten Aktivität der anti-oxidativen Enzyme SOD, CAT und GPx zu sein (siehe Abbildung 6) ⁸⁰. Doch trotz der Tatsache, dass HSCs, isoliert aus alten Mäusen, aufgrund des erhöhten ROS-Levels eine eingeschränkte Fähigkeit zur Repopulation aufweisen, kommt es im Laufe der Zeit nicht zu einer Verminderung ihrer absoluten Zahl, sondern vielmehr zu einer Erhöhung. Vermutlich liegt der Grund dafür in der Tatsache, dass ihre Leistung auf einer pro-Zelle-Basis stetig abnimmt, was durch die erhöhte Zellzahl kompensiert werden muss, um die Blutbildung stetig aufrecht zu erhalten ^{88, 89}. Weitere Studien wie beispielsweise jene von Chambers et al. ⁹⁰ haben gezeigt, dass die verschiedenen Alterserscheinungen in HSCs höchst wahrscheinlich epigenetisch gesteuert sind.

Die meisten der frühen Studien, die sich mit der Alterung hämatopoetischer Stammzellen befassten, sind davon ausgegangen, dass das HSC Kompartiment aus funktionell homologen Einheiten besteht (z.B. ⁸²). Später wurde jedoch entdeckt, dass sich die HSC Kompartimente sowohl in jungen als auch in alten Individuen aus Zellen zusammensetzen, die sich sowohl im Ausmaß, in dem sie die Blutbildung unterstützen, als auch im ausgereiften Zelltypus, in den sie sich vorzugsweise entwickeln, unterscheiden ⁹¹⁻⁹³. Diese Entdeckung steht im Konflikt mit

der allgemein verbreiteten Annahme, dass HSCs noch keine Linien-Beschränkung, also eine Festlegung der Differenzierungsrichtung in Zellen der myeloiden oder der lymphoiden Linie, aufweisen. Neuesten Ansichten zufolge, ist der im Alter stattfindende Verschiebung der Blutbildung hin zu mehr myeloischen und weniger lymphatischen Zellen (auch *myeloid skewing* genannt), und die damit verbundene Immunsensenz (auch Immun-Umbildung, also *immune remodeling* genannt), Folge einer klonalen Vermehrung myeloid-vorbestimmter Stammzellen auf Kosten von lymphoid-vorbestimmten Zellen (siehe Abbildung 6).

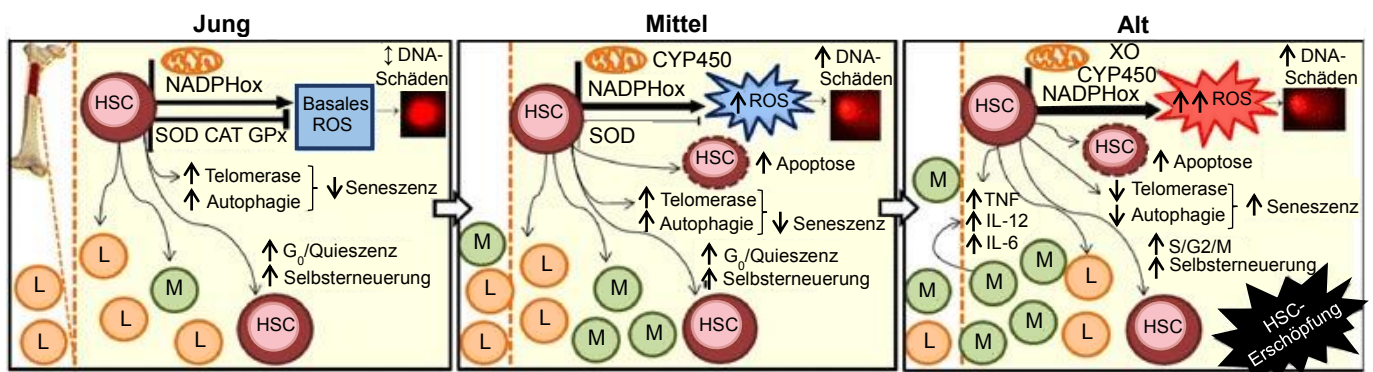


Abbildung 6: Schema altersbedingter Faktoren, die die HSC-Funktion regulieren. Während des Alterungsprozesses kommt es in HSC zu einer vermehrten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies sowie zu einer vermehrten Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine, was die Zellen schädigen und zu Störungen der HSC-Funktion führen kann. Zu diesen Schädigungen zählt vor allem die DNA-Fragmentierung. Im Laufe der Zeit führen diese Veränderungen zu einer Anhäufung von HSCs mit myeloischer Linienverpflichtung (*lineage commitment*), zu erhöhten Apoptoseraten sowie zur Seneszenz und zum Zellzyklusarrest. Letzten Endes führen alle diese Faktoren zu einer Stammzell-Erschöpfung (*HSC exhaustion*). Abkürzungen: NADPH Oxidase (NADPHox), Cytochrom P450 (CYP450), Xanthin Oxidase (XO), lymphoide Zelle (L), myeloide Zelle (M), Tumornekrosefaktor (TNF), Interleukin-12p70 (IL-12), Interleukin-6 (IL-6). → = Stimulation; —| = Inhibition; ↑ = Normalzustand. Abbildung übernommen und modifiziert aus Porto et al. 2015⁸⁰.

Diese Veränderungen im Alter führen zu verringerter zellulärer Immunität und erhöhter systemischer Inflammation, was vermehrt zur Ausprägung von Krankheiten führt, bei denen entzündliche Komponenten eine bedeutende Rolle spielen, wie z.B. Krebs, Atherosklerose, Autoimmunerkrankungen und neurodegenerative Erkrankungen⁹⁴.

1.3.3 Erythropoese

Als Erythropoese bezeichnet man den schrittweise ablaufenden Prozess der Bildung reifer roter Blutzellen (Erythrozyten). Wie bei allen anderen Blutzellen steht an oberster Stelle der Differenzierungsreihe die langzeit-repopulierende hämatopoetische Stammzelle. Sie differenziert zunächst zu kurzzeit-repopulierenden HSC, diese wiederum differenzieren weiter

zu multipotenten Vorläufern, aus denen erst myeloische Vorläuferzellen (CMPs) und anschließend Megakaryozyten/Erythrozyten Vorläufer (MEPs) entstehen. Die ersten determinierten Erythrozyten-Vorläufer sind die *burst-forming unit erythrocytes* (BFU-E) und die *colony-forming unit erythrocytes* (CFU-E) ⁹⁵. Sie differenzieren weiter zu Proerythroblasten die wiederum zu basophilen Erythroblasten, polychromatischen Erythroblasten und schließlich zum acidophilen Erythroblasten (auch als acidophiler Normoblast bezeichnet) differenzieren (siehe Abbildung 7). Ab diesem Stadium sind die Zellen nicht mehr weiter teilungsfähig. Während der Differenzierung vom Proerythroblasten zum acidophilen Erythroblasten (auch orthochromatischer Erythroblast genannt) nimmt die Expression des Proliferationsmarkers CD71 (Transferin Rezeptor) ab, während die Expression des Zelloberflächenproteins Ter119 im Laufe der Differenzierung vom Proerythroblasten zum basophilen Erythroblasten zunächst zunimmt und dann konstant bleibt ⁹⁶. Die Anwendung fluoreszenzmarkierter CD71 und Ter119 Antikörper ermöglicht die Unterscheidung der verschiedenen Erythrozyten-Vorläuferstufen mittels Durchflusszytometrie. Das Volumen des Erythroblasten nimmt mit jeder Zellteilung kontinuierlich ab, es kommt zur Produktion und Akkumulation von Hämoglobin, was die Zelle rot färbt, und zu einer zunehmenden Kondensation des Chromatins, was zu einer Verkleinerung des Kernes führt ⁹⁷. An einem bestimmten Punkt ist der Zellkern pyknotisch, also zur weiteren Teilung nicht mehr fähig, und wird schließlich von der Zelle ausgestoßen (Enukleation). Dieser Prozess markiert den Übergang zur Retikulozyte ^{97, 98}, die aus dem Knochenmark in die Blutbahn übertritt und dort ausreift.

Hauptregulator der Erythropoese ist das Glycoproteinormon Erythropoetin, dessen Rezeptor EpoR von Erythrozyten-Vorläufern exprimiert wird ⁹⁹. Die Sekretion von Erythropoetin wird durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 (*hypoxia-inducible factor-1*) direkt von den Sauerstoffbedingungen im Gewebe kontrolliert. Zusammen mit anderen stress-induzierten Faktoren wie Glucocorticoiden ^{100, 101}, *stem-cell factor* (SCF) ¹⁰² und *bone morphogenetic protein 4* ¹⁰³ stimulieren hohe Erythropoetin-Level eine erhöhte erythropoetische Rate ⁹⁶.

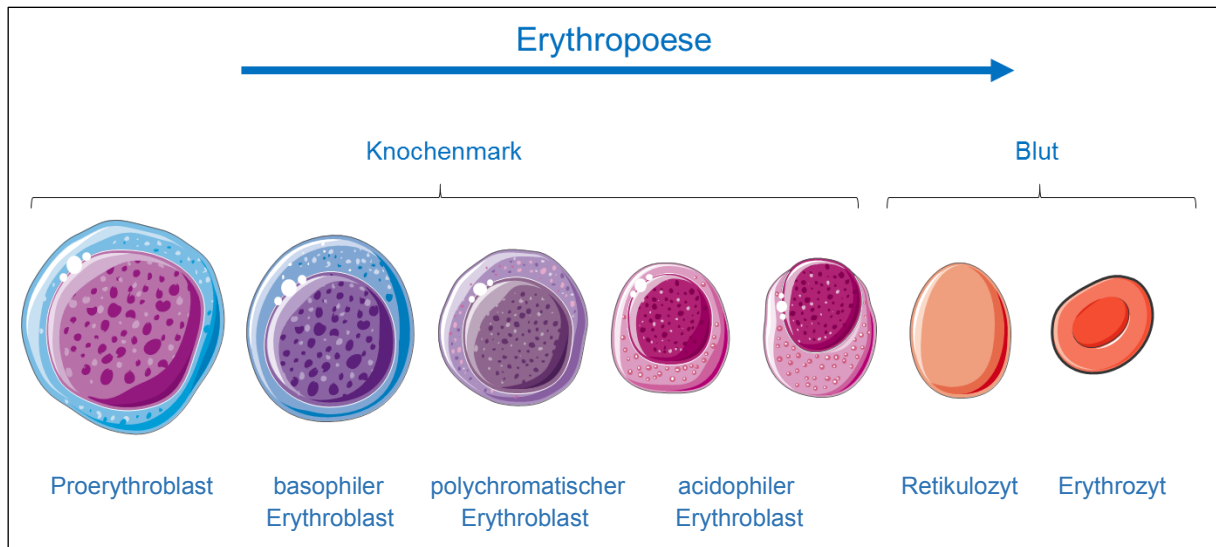


Abbildung 7: Schematische Übersicht der Erythropoese. Am Beginn der Entwicklung reifer Erythrozyten steht der Proerythroblast, der aus den in Abbildung 5 dargestellten MEPs entstanden ist. Dieser Proerythroblast differenziert zum basophilen, dann zum polychromatischen und schließlich zum acidophilen Erythroblasten. Im nächsten Stadium verliert der Erythroblast seinen Zellkern und wird zur Retikulozyte. Diese reift anschließend zur Erythrozyte. Die ersten 5 Schritte der Erythropoese finden im Knochenmark statt, während die letzten beiden Schritte im Blut erfolgen. Übernommen und modifiziert aus *Servier Medical Art-Powerpoint image bank*.

1.3.4 Lymphatische Organe und Lymphozyten

Die lymphatischen Organe können in primäre (Knochenmark und Thymus) und sekundäre (Lymphknoten, Milz und MALT = Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe) lymphatische Organe eingeteilt werden.

In den primären lymphatischen Organen findet die Reifung und Differenzierung von lymphatischen Vorläuferzellen in immunkompetente Lymphozyten statt. Die Entwicklung der B-Zellen und der T-Zellen beginnt im Knochenmark. Durch Proliferation und Differenzierung entstehen aus MPPs zunächst oligopotent lymphoide Vorläuferzellen, die anschließend in B-, T- oder NK-Zellen terminieren können. Entsprechend ihrer Nomenklatur geschieht die Reifung der B- und T-Lymphozyten jedoch an unterschiedlichen Orten. „B“ steht für „Bursa fabricii“, ein lymphoides Organ in der Kloake von Vögeln, in dem die B-Zellen erstmals beschrieben wurden. Heute steht das „B“ jedoch für „bone marrow derived“, da die B-Lymphozyten-Reifung der Säugetiere im Knochenmark abläuft. „T“ hingegen steht für „thymus derived“, da die unreifen T-Lymphozyten aus dem Knochenmark in den Thymus wandern, und dort weiter ausdifferenzieren. Im Anschluss an den Reifungsprozess werden die Zellen in die Peripherie entlassen und besiedeln sekundäre lymphatische Organe. Hier wird nach dem Antigenkontakt über die Proliferation und Entwicklung von Gedächtnis- und Effektorzellen eine spezifische Immunantwort initiiert.

Das primäre lymphatische Organ Thymus befindet sich kranial des Herzens im Mediastinum. Während der Embryonalentwicklung wandern unreife lymphoide Zellen, die sich von CLPs ableiten (siehe 1.3), in den Thymus ein und differenzieren dort zu T-Helferzellen (CD4+/CD8- Zellen) oder zytotoxischen T-Zellen (CD4-/CD8+ Zellen). Während der Alterung kommt es bei allen Säugetieren zu einer Thymus-Involution, also einer Rückbildung des Organs, während derer Thymus-Epithelzellen durch Adipozyten, sowie Bindegewebszellen ersetzt werden. Die Involution führt dazu, dass das im jungen Organismus etablierte Repertoire an T-Zellen im älteren Organismus hauptsächlich durch homöostatische Zellteilungen aufrechterhalten wird.

Die Milz, eines der sekundären lymphatischen Organe, liegt als zungenförmiges, braunrotes Organ unmittelbar links und dorsal vom Magen. Innerhalb der Milz unterscheidet man zwischen der weißen und der roten Pulpa. Nach dem Antigenkontakt immigrieren aktivierte B-Zellen in die Milz (oder Lymphknoten), wo sie stark proliferieren und zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen oder zum kleinen Teil zu B-Gedächtniszellen differenzieren (siehe ¹⁰⁴ und Abbildung 63), wodurch besonders der Anteil der weißen Pulpa zunimmt. Die rote Pulpa hingegen ist der Ort für den Abbau alter oder defekter Erythrozyten (auch als Blutmauserung bezeichnet), deren Vitalität durch das erzwungene Passieren der Endothelschlitze zum Wiedereintritt in das venöse System überprüft wird. Verschiedene Auslöser wie unter anderem Bluterkrankungen (z.B. Leukämie), Lebererkrankungen, akute oder chronische Infektionen, Entzündungen oder Milz-Sequestrierung können zur Ausbildung einer Splenomegalie führen, die als Vergrößerung der Milz, gemessen an ihrer Größe und ihrem Gewicht, definiert wird ¹⁰⁵.

1.3.5 Die Regulation der Hämatopoese mittels Transkriptionsfaktoren

Die Regulierung der Hämatopoese basiert auf Transkriptionsfaktoren. Unterschiedliche Faktoren wie Kofaktoren, Wachstumsfaktoren/Zytokine, post-translationale Modifikationen sowie andere Transkriptionsfaktoren steuern hingegen diese Transkriptionsfaktoren ^{106, 107}. Die Transkriptionsfaktoren können die Zielgenexpression sowohl unterdrücken als auch einleiten, indem sie an die DNA binden ^{108, 109}. Die Beschleunigung von Modifikationen der Histone durch Katalysatoren sowie die Blockade oder Stabilisation der Bindung von RNA-Polymerase und DNA bilden dabei die relevantesten Mechanismen ¹¹⁰⁻¹¹². Um wirksam zu sein, benötigen Transkriptionsfaktoren häufig Kofaktoren, bei denen es sich sowohl um

Repressoren als auch um Aktivatoren handeln kann. Ob der jeweilige Transkriptionsfaktor-Komplex als Repressor oder Aktivator agiert, wird von seiner Konstellation bestimmt^{111, 113-115}.

In der Hämatopoese wird die Entscheidung der HSCs zur Selbsterneuerung oder zum Supprimieren bzw. Induzieren einer speziellen Entwicklungslinie von Transkriptionsfaktoren vorgegeben¹¹⁶. Im basalen Zustand exprimieren HSCs Marker-Transkripte der verschiedenen Entwicklungslinien hämatopoetischer Zellen in geringen Mengen und sind dadurch zur Differenzierung in alle Linien der Entwicklung fähig. Zu jenem Zeitpunkt, an dem die Linienentscheidung getroffen wird, kommt es zu einer Dominanz des Expressionsprogramms eines Transkriptionsfaktors, während die Zielgen-Expression der übrigen Transkriptionsfaktoren unterdrückt wird. Für die Hämatopoese besonders relevante Transkriptionsfaktoren sind beispielsweise *runx related trans-cription factor 1* (RUNX), *TAL BHLH Transcription Factor 1*, *Erythroid Differentiation Factor* (TAL1), *friend of gata1* (FOG1), *GATA binding protein 1* (GATA1), *Erythroid Krueppel-Like Transcription Factor* (KLF1) und *Spi-1 proto-oncogene* (SPI1).

1.3.5.1 Hämatopoetische Signalwege

Unterschiedliche Signalwege wie beispielsweise WNT, JAK/STAT und NOTCH spielen für die Hämatopoese eine zentrale Rolle. Die Dysregulation dieser Signalwege wurde in verschiedenen Studien mit Leukämie in Verbindung gebracht.

Der WNT-Signalweg spielt bei der Entwicklung fast aller Organe eine essentielle Rolle¹¹⁷. In hämatopoetischen Stammzellen ist der Einfluss von WNT noch nicht vollständig aufgeklärt, allerdings ist bekannt, dass WNT die Selbsterneuerung beeinflusst. Eine Studie von Reya et al. aus dem Jahr 2003 hat mithilfe von Transplantationsexperimenten gezeigt, dass die konstitutive Aktivierung des WNT-Signalwegs zu einer verbesserten Reproduktions- und Proliferationsfähigkeit der Zellen führt¹¹⁸. Andere Untersuchungen von Kirstetter et al. sowie Scheller et al. aus dem Jahr 2006 haben hingegen erwiesen, dass die WNT-Aktivierung die HSC Differenzierung blockiert, wodurch das Reservoir der Stammzellen frühzeitig erschöpft¹¹⁹. Anlässlich dieser konträren Ergebnisse wurde im Jahr 2016 von Staal et al. ein Modell vorgelegt, das die Auswirkungen von WNT auf die Aktivität von HSCs von dessen Dosis abhängig macht¹²⁰. Collu et al. haben darüber hinaus aufgedeckt, dass der WNT-Signalweg und der NOTCH-Signalweg miteinander verbunden sind¹²¹.

Die Übertragung von Signalen innerhalb des JAK/STAT-Signalweges erfolgt durch eine JAK

(*Janus protein tyrosine kinase*)-vermittelte Aktivierung von STATs (*signal transducers and activators of transcription*). STATs sind Transkriptionsfaktoren die Signale, die von Zytokinen induziert wurden, zu einer Reaktion auf zellspezifischer Ebene konvertieren, indem sie gewisse Expressionsprogramme aktivieren¹²². Sowohl in HSCs als auch in MPPs und reifen hämatopoetischen Zellen spielt vor allem STAT5 eine wichtige Rolle. Zu jenen Faktoren die STAT5 aktivieren, zählen unter anderem G-CSF (*Granulocyte-Colony Stimulating Factor*), GM-CSF (*Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor*), IL3 (Interleukin-3, auch *Multi-potential Colony Stimulating Factor* genannt), TPO (*Thrombopoietin*) und EPO/SCF (*Erythropoietin/stem cell factor*)¹²³.

In HSCs werden sowohl die NOTCH-Rezeptoren als auch deren membranständige Liganden gebildet¹²⁴. Sie agieren indirekt, über eine Stammzellnischen-Modifikation, oder direkt an den HSCs und beeinflussen deren Selbsterneuerung, aber auch deren Differenzierung¹²⁵. Verschiedene Studien haben NOTCH in der Vergangenheit mit Bluterkrankungen wie beispielsweise Leukämie in Verbindung gebracht. Ellisen et al. haben bereits im Jahr 1991 gezeigt, dass die Aktivierung von NOTCH durch eine Translokation auf chromosomaler Ebene mit der Entstehung und Entwicklung von T-Zell akuter lymphatischer Leukämie (T-ALL) in Verbindung steht¹²⁶. Die Translokation verhindert die Degradierung von NOTCH und führt gleichzeitig zu einer Aktivierung von MYC, einem Pro-Onkogen¹²⁷⁻¹³⁰. Andere Studien konnten allerdings belegen, dass NOTCH ebenfalls die Unterdrückung von Tumoren unterstützen kann¹³¹⁻¹³³.

2 Ziele der Arbeit

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass sich hämatopoetische Stammzellen größtenteils in einem ruhenden Zustand befinden, metabolisch wenig aktiv sind und ihre Energie hauptsächlich über anaerobe Glykolyse gewinnen, was sie anfällig für Stimulationen bzw. Schädigungen durch oxidativen Stress macht.

Das Enzym PON2 wirkt anti-oxidativ, indem es in der inneren Mitochondrienmembran an Coenzym-Q10 bindet und dadurch die Bildung von Superoxid (O_2^*) verhindert, was zusätzlich einen anti-apoptotischen Effekt erzeugt, der unter anderem für die Stabilisierung von Tumorzellen und deren Resistenz gegen Chemotherapeutika sowie für verschiedene kardiovaskuläre Erkrankungen relevant ist. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass die Therapieresistenz zweier CML-ähnlicher Zelllinien auf eine signifikant erhöhte PON2-Expression zurückzuführen ist. Trotz der Assoziation mit Leukämie ist die Rolle der Paraoxonase-2 im hämatopoetischen System mit Ausnahme von Makrophagen bisher unbekannt. Aus diesem Grund war das Ziel dieser Arbeit, die allgemeine Funktion der PON2 in der Hämatopoese zu charakterisieren. Dafür sollte zunächst der Expressionslevel der PON2 in verschiedenen hämatopoetischen Zellen überprüft werden. Anschließend sollten die Effekte einer PON2-Defizienz *in vivo* auf verschiedene Komponenten des hämatopoetischen Systems aufgedeckt werden. Durch die in anderen Zelltypen erwiesene PON2-vermittelte ROS-Regulation wurde vermutet, dass ein PON2 *knock-out* Auswirkungen auf den Redox-Status, die Apoptoserate, den Zellzyklus, die Proliferation, die Differenzierung und das *Engraftment* von HSCs hat. Dies sollte durch vergleichende Analysen an PON2^{-/-}- und WT-Mäusen mithilfe Chemilumineszenz- und Fluoreszenz-basierter Methoden sowie durch Knochenmarktransplantationen analysiert werden.

Da sich anhand dieser Untersuchungen ein erhöhter ROS-Level in PON2-defizienten HSPCs herausstellte, galt es zu überprüfen, ob ROS kausal ist. Zu diesem Zweck sollten im nächsten Schritt grundlegende Analysen an NAC-behandelten PON2^{-/-}-Mäusen wiederholt werden. Die genannten Arbeiten sollten anschließend durch gezielte molekularbiologische Analysen zur Identifizierung PON2-regulierender Signalwege und Transkriptionsfaktoren ergänzt werden.

Da aus Vorarbeiten dieses Projektes hervorging, dass PON2-defiziente Mäuse gesteigerte Erythrozyten Volumina aufweisen, sollte zusätzlich der Zellzyklusstatus, die Differenzierung und die Lebensdauer der PON2^{-/-}-Erythrozyten und deren Vorläufern, sowie die Stress-Erythropoese durchleuchtet werden.

Zusammengefasst war das Ziel dieser Arbeit die Aufklärung der Bedeutung der PON2 für das Redox-Signaling und die physiologische Funktion von hämatopoetischen Zellen.

3 Material

3.1 Chemikalien

Tabelle 1: Chemikalien.

CM-H ₂ DCFDA	Molecular Probes
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich
2,3-Dimethoxy-1,4-naphthoquinon (DMNQ)	Calbiochem
EDTA <i>Solution</i> , 100x	Thermo Scientific
Ethanol, vergällt	Roth
Ethanol Rotipuran®	Roth
<i>Fetal calf serum</i> (FCS)	Sigma Aldrich
Glycerin, 99%	Roth
IgG <i>from rat serum</i>	Sigma Aldrich
Isofluran	Abbott
Isopropanol	Roth
L-012 (8-Amino-5-Chloro-7-Phenylpyrido[3,4-d]Pyridazin-1,4-(2H,3H)-Dion)	Wako Chemicals
Methanol	Roth
Penicillin/Streptomycin, 100x, 10.000 U/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin	Gibco
Pentobarbital	Serva
Phenylhydrazin Hydrochlorid	Sigma Aldrich
RPMI 1640	Gibco
sulfo-NHS-LC-biotin	Pierce

3.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien.

96-well-Platten, µClear®, transparent, weiß	Greiner
<i>Cell Strainer Cap</i> (12x75 mm)	BD Biosciences
<i>Cell Culture Dishes</i> , PS, 35 x 10 mm, <i>with vents</i> , <i>sterile</i>	Greiner
Einmalskalpell Typ 10A, steril	Swann-Morton
FACS-Röhrchen	BD Biosciences
Injekt®-F Feindosierungsspritze, 1 ml	Braun
Kryoröhrchen	Greiner
Microvette® 500 K3E	Sarstedt
Pasteurpipetten	Roth
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2,0 ml)	Eppendorf
Reaktionsgefäße (15 ml; 50 ml)	Greiner
Serologische Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 50 ml), steril	Greiner
Sterican® Standardkanülen (0,45 x 25 mm) 26 G, 26 G ½	Braun

Material	
Sterican® Standardkanülen (0,60 x 25mm) 23 G	BD
Sterican® Standardkanülen (1,2 x 40 mm) 18 G	BD
TC-Schale 100, Cell+	Sarstedt
Zellsieb, 100 µm	Greiner

3.3 Laborgeräte

Tabelle 3: Laborgeräte.

Centro LB960 Luminometer	Berthold Technologies
CO ₂ -Inkubatoren CO-150 und Exella ECO-170	New Brunswick Scientific
FACSCanto™ II Durchflusszytometer mit FACSDiva Software	BD Biosciences
HEMAVET 950FS	DREW Scientific Inc
Leitz DM IL Mikroskop	Leica
Megafuge 1.0R	Heraeus Sepatech
My Cycler™ Thermal Cycler	BioRad
Nanodrop ND 1000 Spectrophotometer	Peqlab
Neubauer-Zählkammer	Labor Optik
Präparierbesteck	FST
PT 1200 Präzisionswaage	Sartorius
StepOnePlus Real Time-PCR System	Applied Biosystems
Sysmex KX-21N™ <i>Automated Hematology Analyzer</i>	Sysmex
Thermomixer kompakt	Eppendorf
Tischzentrifuge	Labnet
Vollschutzbestrahlungsanlage für Kleintiere, Typ OB 58-BA, Cäsium-137 Quelle 2x 60 Tetrabecquerel, Strahler-Nr: 086-90 + 090-90	Buchler
Vortexer	Heidolph
Wasserbad	GSL
Zentrifuge 5417R	Eppendorf

3.4 Reagenzien und Kits

Tabelle 4: Reagenzien und Kits.

Arcturus® PicoPure® RNA Isolation Kit	Applied Biosystems
Anti-Rat/Hamster Ig, κ/Negative Control (FBS*) Compensation Particles Set	BD Biosciences
BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Kit	BD Biosciences
BD™ CompBeads	BD Biosciences
dNTP-Mix	Peqlab
EasyStep™ Mouse Hematopoietic Progenitor Cell Isolation Kit	StemCell Technologies

Material	
GoTaq Polymerase Puffer (5x)	Promega
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I	BD Biosciences
peqGOLD DNase I Digest Kit	Peqlab
peqGOLD Total RNA Kit	Peqlab
SuperScript™ VILO™ Master Mix	Invitrogen

3.5 Puffer, Lösungen und Medien

Tabelle 5: Puffer, Lösungen & Medien.

Citrate Concentrated Solution	Sigma
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) + GlutaMax™	Gibco
Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS), (1x), steril, -CaCl ₂ , -MgCl ₂	Sigma Aldrich
Erythrocyte Lysis Buffer	Qiagen
FACS-Puffer	1x PBS, 2 % FCS, 1 mM EDTA
<i>Freezing-Medium</i>	FCS + 10 % DMSO
Krebs-HEPES Puffer	Noxygen
MethoCult® Methocellulose-Based Medium	StemCell Technologies
Natriumchlorid-Lösung	0,9 % NaCl, ddH ₂ O
peqGOLD Trifast™	Peqlab
RNase freies Wasser	ddH ₂ O, 0,1 % DEPC, autoklaviert
Wasser, doppel destilliert	ddH ₂ O

3.6 Enzyme und Standards

Tabelle 6: Enzyme und Standards.

Go-Taq® DNA Polymerase	Promega
Proteinase K	Sigma Aldrich
RNase A	Sigma Aldrich
Taq DNA Polymerase	Zur Verfügung gestellt durch Prof. Dr. H. Kleinert, Institut für Pharmakologie, Universitätsmedizin Mainz.

3.7 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Tabelle 7: Antikörper für Durchflusszytometrie.

Zielprotein	Kopplung	Bezugsquelle
B220 (CD45R)	Biotin, APC, Alexa Fluor 700	eBiosciences
CD3e	Biotin, PE	eBiosciences
CD4	Biotin, APC, Alexa Fluor 700	eBiosciences
CD5	Biotin	eBiosciences
CD8 (Ly2)	Biotin, PE, Alexa Fluor 700	eBiosciences
CD11b	Biotin, APC, Alexa Fluor 700	eBiosciences
CD19	PE	BioLegend
CD16/32	PE	BD
CD34	FITC (Alexa Fluor 488)	BD
CD34	FITC	eBiosciences
CD45.1	FITC	BioLegend
CD45.2	APC	BioLegend
CD48	PE-Cy7	BioLegend
CD71	PE	eBiosciences
CD117	APC	eBiosciences
CD127	Biotin	BioLegend
CD135	PE	BioLegend
CD138	Brillant violet 421	BD
CD150	Alexa Fluor 488, Brill. violet 421, PE-Cy5	BioLegend
ckit	PerCP-eFluor710, APC, PE	eBiosciences
Gr1 (Ly6G/C)	Biotin, PE, Alexa Fluor 700	eBiosciences
Sca1 (Ly-6A/E)	PECy7	eBiosciences
Sca1 (Ly-6A/E)	APC-Cy7	BD
Streptavidin	APC-Cy7	BioLegend
Ter119	Biotin, APC	eBiosciences
Ter119	Alexa Fluor 700	BioLegend
γ H2A.X Phospho (Ser139)	Alexa Fluor 488	BioLegend

3.8 Oligonukleotide

3.8.1 Oligonukleotidsequenzen für quantitative real-time PCR

Die hier aufgeführten Primer und *TaqMan* Sonden (*probes*) für qRT-PCR Analysen wurden von Eurofins Genomics bezogen. Am 5'-Ende sind die Sonden mit dem Fluorophor 6-Carboxyfluorescein (FAM) und am 3'-Ende mit dem Quencher Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA) markiert.

Tabelle 8: Murine Primer-Sequenzen für qRT-PCR Analysen.

murin	forward (5' → 3')	reverse (5' → 3')
bActin	AGAGGGAAATCGTGCGTGAC	CAATAGTGATGACCTGGCCCGT
Gapdh	TCACCACCATGGAGAAGGC	GCTAAGCAGTTGGTGGTGCA
PON2	CGGTATGTATGGGAAGATGCTGAC	TTGTTGTTGCTGCTTCTGGGG

Tabelle 9: Murine TaqMan Sonden-Sequenzen für qRT-PCR Analysen.

murin	probe (FAM-5' → 3'-TAM)
bActin	CACTGCCGCATCCTCTTCCTCCC
Gapdh	ATGCCCCCATGTTTGTGATGGGTGT
PON2	CCAATGGCCTGGCTTTCTTT

3.9 Versuchstiere

Die verwendeten Versuchstiere wurden gemäß §4 Abs. 1 und §7 Abs. 2 S. 2 oder § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes eingesetzt. Alle Tiere die im weiteren Verlauf als “jung“ bezeichnet werden, waren entweder männlich oder weiblich und 10-14 Wochen alt. Als “alt“ bezeichnete Versuchstiere waren ebenfalls nicht geschlechtsspezifisch aufgetrennt, jedoch mehr als 9 Monate alt. Die drei verwendeten Mausmodelle werden in nachfolgender Tabelle aufgelistet und kurz beschrieben.

Tabelle 10: Mausmodelle mit kurzer Beschreibung und Quelle.

Mausmodell	Beschreibung	Quelle
C57BL/6J WT	Inzuchtstamm	<i>Translational Animal Research Center (TARC)</i> der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
C57BL/6-Ly5.1 WT	Inzuchtstamm	Bereitgestellt von Prof. Dr. Ari Waisman, Institut für Molekulare Medizin Mainz
C57BL/6J PON2 ^{-/-}	Inzuchtstamm PON2- <i>knockout</i> durch Insertion einer floxP-flankierten β -geo Expressionskassette im zweiten Intron des murinen PON2-Gens (Ng et al. 2006). ¹³	Von Prof. Dr. S. T. Reddy, Department of Medicine / Department of Molecular and Medical Pharmacology, University of California, Los Angeles, California, USA zur Verfügung gestellt; In TARC importiert durch Prof. Dr. B. Fuhrmann, Technion Faculty of Medicine / Rambam Medical Center, Haifa, Israel.

Die Wildtyp (WT) C57BL/6J Mäuse erhielten wir durch das *Translational Animal Research Center* (TARC) der Johannes Gutenberg-Universität Mainz von den Züchtern Envigo (früher Harlan), Janvier Labs oder Charles River.

Das PON2^{-/-}-Mausmodell zeigt eine Restexpression von lediglich 0-5 % der PON2-mRNA-Expression von WT-Mäusen (siehe 5.3.2, Abbildung 29 und 5.4.2, Abbildung 52). Der Grund dafür ist die Insertion einer β -Galaktosidase/Neomycin Fusionskassette (β -geo), flankiert von einer Splice-Akzeptor-Stelle (SA) und einer poly-Adenin-Nukleotid-Sequenz (pA), im zweiten Intron, 9.995 bp nach dem Transkriptionsstartpunkt des murinen PON2-Gens (Erstbeschreibung siehe Ng et al. 2006¹³). Dieser *gene-trap* Vektor bewirkt eine Fusion der β -geo Kassette mit dem Transkript der ersten zwei PON2 Exone, was dazu führt, dass eine mRNA, bestehend aus Exon 1, Exon 2, β -geo und pA entsteht (siehe Abbildung 8), die nicht für ein funktionelles PON2 Protein codiert.

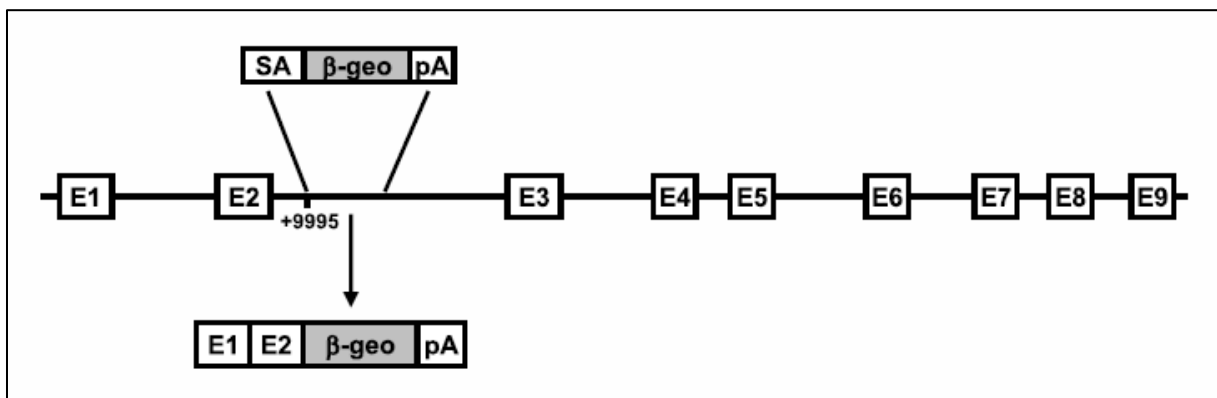


Abbildung 8: Schematische Darstellung des β -geo *gene trap* Vektors im PON2-Lokus des PON2^{-/-} Mausmodells. 9.995 Basenpaare nach dem Translationsstartpunkt des murinen PON2-Gens wird ein *gene trap* Vektor eingebracht. Dieser Vektor trägt eine β -Galaktosidase/Neomycin Genkassette (β -geo), flankiert von einer Splice-Akzeptor-Stelle (SA; links) und einer poly-Adenin-Nukleotid-Sequenz (pA; rechts). Durch die Fusion der transkribierten Vektorsequenz mit der Splice-Donor-Stelle des gespleißten Transkripts von Exon 1 (E1) und Exon 2 (E2), die durch die SA vermittelt wird, entsteht eine verkürzte mRNA aus E1, E2, β -geo und pA, die nicht für eine funktionelle PON2 codiert. Abbildung nach Ng et al.¹³.

4 Methoden

4.1 Zellbiologische Arbeitsmethoden

Die folgenden zellbiologischen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sterilwerkbank durchgeführt. Es wurden ausschließlich autoklavierte oder steril erworbene Materialien verwendet.

4.1.1 Isolierung von Knochenmarkzellen und Blut

Zur Untersuchung der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen wurde das Knochenmark zunächst isoliert und anschließend mittels Durchflusszytometrie (FACS) analysiert (siehe 4.1.4). Da die Entnahme des Gewebes unter Narkose mit anschließender Tötung stattfand, handelte es sich hierbei nicht um einen Tierversuch, sondern lediglich um ein anzeigepflichtiges Verfahren gemäß §4 Abs. 1 und §7 Abs. 2 S.2 TierSchG.

Zur Isolierung wurden die Mäuse zunächst für kurze Zeit mit Isofluran betäubt und unter der Narkose eine annähernd letale Dosis Pentobarbital (0,4 ml 2 %iges Pentobarbital in 0,9 %iger NaCl-Lösung) *i.p.* injiziert. Sobald sichergestellt werden konnte, dass die Tiefe der Narkose ausreichend war, wurde der Thorax der Mäuse geöffnet, um mithilfe einer mit Citratlösung (Sigma) benetzten Spritze und einer 26 G Kanüle *intra cardial* Blut für eine spätere Analyse am Sysmex XP *Haematology Analyzer* oder HEMAVET zu gewinnen. Die Eröffnung des Zwerchfells führt dabei zu einem Pneumothorax, der letztendlich zum Tod des Tieres führt. Zur anschließenden Gewinnung der Knochenmarkzellen wurden die Hinterläufe des Tieres abgenommen, von Haut und Gewebe befreit und beide Femora- und Tibia-Knochen entnommen. Durch Einführen einer mit RPMI + 2 % FCS gefüllten Spritze mit 23 G Kanüle in die Knochenmarkskanäle, wurden Femur und Tibia ausgespült, und das Knochenmark ausgeschwemmt. Vor der weiteren Verwendung wurden die im Medium befindlichen Knochenmarkszellen bei 4 °C zwischengelagert. Um Knochenmarktransplantationen (4.3.4) durchzuführen wurden die so genannten WBMCs (*whole bone marrow cells*) durch einen Zellsieb (*Cell-Strainer Cap*, 12x75 mm) vereinzelt, anschließend ausgezählt und direkt für die Injektion in Spendertiere vorbereitet, oder bis zur weiteren Verwendung in *freezing*-Medium (FCS + 10 % DMSO) aufgenommen und in einem Kryo-Röhrchen bei -80 °C gelagert. Zur Durchführung von FACS-Analysen wurde vor der Zellzählung eine Lyse der Erythrozyten durchgeführt. Dafür wurden die Zellen zunächst zentrifugiert (4 °C, 5 min, 900 g), in 1 ml

Erythrocyte Lysis Buffer (Qiagen) resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation, bevor die Zellen in FACS-Puffer (1x PBS, 2 % FCS, 1 mM EDTA) aufgenommen und mit Oberflächenmarkern gefärbt, oder in *freezing*-Medium resuspendiert und bei -80 °C gelagert wurden.

4.1.2 Isolierung von Zellen aus Milz und Thymus

Zur Isolierung der Zellen aus Milz und Thymus wurden die Versuchstiere zunächst wie in 4.1.1 beschrieben abgetötet, bevor Milz und Thymus entnommen und in einem 50 ml Reaktionsgefäß, gefüllt mit 10 ml PBS, auf Eis gelagert wurden. Anschließend wurden die Zellen der Organe mechanisch, mithilfe eines Zellsiebs, vereinzelt. Danach wurde eine Lyse der Erythrozyten wie in 4.1.1 beschrieben durchgeführt. Zur dauerhaften Lagerung wurden die Zellen schließlich kryokonserviert (siehe 4.1.3) oder zur direkten Weiterverwendung für FACS-Analysen in FACS-Puffer resuspendiert.

4.1.3 Kryokonservierung und Auftauen muriner Zellen

Die Kryokonservierung bietet die Möglichkeit der zeitlich nahezu unbegrenzten Lagerung von Zellen. Zur Kryokonservierung von Knochenmark- sowie Milz- oder Thymuszellen wurden, wie in 4.1.1 und 4.1.2 kurz beschrieben, folgende Schritte durchgeführt:

Zunächst wurden die zu konservierenden Zellen wie unter 4.1.1 und 4.1.2 beschrieben isoliert, zentrifugiert (4 °C, 5 min, 900 g) und anschließend in 1 ml *freezing*-Medium resuspendiert. Um so wenig Vitalitätsverlust wie möglich zu erreichen, wurden die Zellen sofort nach der Resuspendierung in Kryo-Röhrchen transferiert und umgehend in eine -20 °C Tiefkühltruhe überführt. Sobald das *freezing*-Medium, mit den darin befindlichen Zellen, vollständig durchgefroren war, wurden die Kryo-Röhrchen zur langfristigen Aufbewahrung in einen -80 °C Schrank transferiert.

Zum Auftauen wurden die Kryo-Röhrchen direkt nach der Entnahme aus dem -80 °C Schrank in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und die Zellsuspension sogleich in 5 ml RPMI + 2 % FCS aufgenommen. Durch Zentrifugation (4 °C, 5 min, 900 g) und anschließende Aufnahme der Zellen in einsprechendes Medium, wurde das DMSO vollständig entfernt.

4.1.4 Isolierung und Differenzierung verschiedener Subpopulationen mittels Oberflächenmarkern (FACS)

Um die verschiedenen Subpopulationen hämatopoetischer Vorläuferzellen unterscheiden zu können, macht man sich deren charakteristische Antigenexpression zunutze. Mithilfe von Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern können die verschiedenen Zellpopulationen mittels FACS quantitativ analysiert werden. Dafür wurde nach folgendem Standardprotokoll vorgegangen: Zunächst wurden ungefärbte Zellen der jeweiligen Zellsuspension verwendet, um das FACS-Gerät spezifisch auf die zu messenden Zellen einzustellen. Die einzelnen Zellpopulationen sollten im *Dotplot* gut voneinander zu unterscheiden sein und ihre Autofluoreszenz sollte nicht als positives Messergebnis erfasst werden. Um Kompensationen durchzuführen, wurden Einzelfärbungen der verschiedenen Fluorochrome benötigt. Dazu wurden die unterschiedlichen Fluorochrom-gekoppelten Antikörper mithilfe ihrer *kappa-chain* an spezielle Kompensationsbeads (BD) gebunden. Die Parameter der Kompensation wurden so eingestellt, dass keine positiven Zellen durch zu starke Kompensation verloren gehen, die gefärbten Kontrollpopulationen aber auch nicht in dem jeweils anderen Kanal detektiert wurden. Erst nach Einstellung dieser Messparameter konnte mit der Aufnahme der zu analysierenden Zellsuspensionen begonnen werden.

Für Messungen der Zellen aus Milz und Thymus wurden die vereinzelter Zellen in gleich große Fraktionen aufgeteilt. Um Färbungen der weiter ausdifferenzierten Zellen des Knochenmarks durchzuführen, wurde die Zellsuspension zunächst ausgezählt, bevor 5 Fraktionen mit jeweils $4 - 8 \times 10^6$ Zellen abgenommen wurden. Die übrigen Knochenmarkzellen, die zu einem späteren Zeitpunkt für Färbungen der LSK-Fraktion, sowie der CMP's, GMP's und MEP's verwendet werden sollten, wurden zunächst auf Eis zwischengelagert. Die Zellen innerhalb der verschiedenen Fraktionen wurden in FACS-Puffer für eine Stunde, bei 4 °C, im Dunkeln, mit jeweils 1 µl der folgenden Antikörper inkubiert:

Tabelle 11: Antikörper für FACS-Färbungen von Milz-, Thymus- und Knochenmarkzellen

FACS-Färbung	Milz	Thymus	Knochenmark
1	Ø (ungefärbt)	Ø (ungefärbt)	Ø (ungefärbt)
2	ckit-PerCP-eFluor710/ CD11b-APC/Gr1-PE	B220-APC/CD3-PE	ckit-PerCP-eFluor710/ CD11b-APC/Gr1-PE
3	B220-APC/CD3-PE	CD4-APC/CD8-PE	B220-APC/CD3-PE
4	B220-APC/CD19-PE		Ter119-APC/CD71-PE
5	Ter119-APC/CD71- PE		B220-APC/CD138- Brilliant violet
6	B220-APC/CD138- Brilliant violet		

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen durch zweimaliges Zentrifugieren (4 °C, 5 min, 750 g) und anschließendes Resuspendieren in 200 µl (Milz und BM) bzw. 300 µl (Thymus) FACS-Puffer gewaschen und in FACS-Röhrchen überführt. Anschließend wurden die gefärbten Zellen am FACSCanto™ II Durchflusszytometer quantitativ analysiert. Eine Übersicht über die Antikörper-Kombinationen, die für die Differenzierung der verschiedenen Zelltypen innerhalb der Milz, des Thymus sowie des Knochenmarks mithilfe der FACSDiva Software zur Anwendung kamen, ist in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Übersicht der Antikörper-Kombinationen zur durchflusszytometrischen Analyse der Milz-, Thymus- und Knochenmarkzellen. „+“ bedeutet, dass der entsprechende Marker von der jeweiligen Zellpopulation exprimiert wird, „-“ bedeutet keine Expression.

<u>Subpopulation</u>	<u>Antikörper</u>
Reife Myelozyten	Gr1+ / CD11b+
Erythrozyten Vorläufer	Ter119+ / CD71+
Erythrozyten	Ter119+ / CD71-
Proliferierende Zellen	Ter119- / CD71+
Frühe B-Zellen	B220+ / CD19-
Weiter ausgereifte B-Zellen	B220+ / CD19+
Ausdifferenzierte B-Zellen	B220- / CD19+
T-Vorläuferzellen	B220- / CD3+
Frühe T-Zellen („doppelt-negative“)	CD4- / CD8-
T-Zellen („doppelt-positive“)	CD4+ / CD8+
T-Helferzellen („einfach positive“)	CD4+ / CD8-
Zytotoxische T-Zellen („einfach positive“)	CD4- / CD8+

Um innerhalb der Knochenmarkzellen hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen von reifen Blutzellen unterscheiden zu können, wurden spezifische „*lineage*-Marker“ (Lin) verwendet. Dabei handelt es sich um verschiedene Differenzierungsantigene, die von ausdifferenzierten Blutzellen, nicht jedoch von frühen Vorläufer- und Stammzellen exprimiert werden, da sich das Antigenprofil mit zunehmender Differenzierung verändert. Eine *lineage*-negativ-Selektion diente hierbei dem Ausschluss weiter ausgereifter Blutzellen. Für diese Selektion wurde die Knochenmark-Zellsuspension in 2 (ggf. 3, wenn zusätzlich LSK + Annexin V-Färbung durchgeführt wurde) Fraktionen aufgeteilt (etwa 1 - 5 x 10⁷ Zellen pro Fraktion) und mit den in folgender Tabelle aufgeführten Antikörpern für 30 Minuten auf Eis inkubiert.

Tabelle 13: Antikörper für die lineage-negativ-Selektion

Antikörper	Eingesetzte AK-Menge für 1 - 5 x 10 ⁷ Zellen/500µl
CD3 biotin	750 ng (1,5 µl)
CD4 biotin	125 ng (0,25 µl)
CD8 biotin	250 ng (0,5 µl)
CD5 biotin	500 ng (1 µl)
B220 biotin	250 ng (0,5 µl)
Gr1 biotin	200 ng (0,4 µl)
Ter119 biotin	250 ng (0,5 µl)
CD11b biotin (nur für LSK (LT-, ST-HSC, MPP-Analyse)	200 ng (0,4 µl)
CD127 biotin (nur für CMP/GMP/MEP - Analyse)	500 ng (1 µl)

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen erneut durch zweimaliges Zentrifugieren (4 °C, 5 min, 750 g) und anschließendes Resuspendieren in 500 µl FACS-Puffer gewaschen. Im Anschluss wurden die jeweiligen Fraktionen 30 Minuten im Dunkeln und auf Eis mit 4 µl (0,8 µg) Streptavidin-APC-Cy7 inkubiert, bevor die Zellen erneut gewaschen und danach mit Rattenserum (25 µl / 1 - 5 x 10⁷ Zellen) behandelt wurden, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Um die verschiedenen Subpopulationen innerhalb der Fraktionen unterscheiden zu können, wurden den verschiedenen Ansätzen nun folgende Antikörper zugegeben:

Tabelle 14: Antikörper zur Unterscheidung der verschiedenen Stammzell- und Vorläuferzell-Subpopulationen.

LSK (LT-, ST-HSC, MPP) - Fraktion		CMP/GMP/MEP - Fraktion	
Antikörper	Eingesetzte Menge für 1 - 5 x 10 ⁷ Zellen/500 µl	Antikörper	Eingesetzte Menge für 1 - 5 x 10 ⁷ Zellen/500 µl
Sca1-PECy7	1,5 µl (0,5 µg)	Sca1-PECy7	1,5 µl (0,5 µg)
ckit-APC	2 µl (0,4 µg)	ckit-APC	2 µl (0,4 µg)
CD135-PE	2,5 µl (0,5 µg)	CD16/32-PE	5 µl (1 µg)
CD150-FITC	1 µl (0,5 µg)	CD34-FITC (RAM34)	1 µl (0,5 µg)

Die Inkubation erfolgte abgedunkelt, in einer *end-over-end*-Rotation in einem Kühllabor (4 °C). Darauf folgend wurden die Zellen gewaschen, in FACS-Röhrchen überführt und am FACSCantoTM II Durchflusszytometer quantitativ analysiert.

Die verschiedenen Fluorochrome wurden bei folgenden Excitations-/Emissionswellenlängen gemessen:

APC: 650/660 nm; APC-Cy7: 650/785 nm; FITC (Alexa Fluor 488): 495/519 nm; PE: 496/578 nm; PE-Cy7: 496/785 nm; Brilliant violet: 407/421 nm; PerCP-eFluor 710: 488/710 nm.

4.1.4.1 Sortieren von Zellen

Das Sortieren von Zellen anhand ihrer charakteristischen Antigenexpression erfolgte an einem Durchflusszytometer mit Sortierfunktion, dem FACS Aria™ II *flow cytometer* (BD) in der *Flow Cytometry Core Facility* des Instituts für Molekulare Biologie gGmbH (IMB) in Mainz.

Dafür wurden die Knochenmarkzellen mehrerer Mäuse wie in 4.1.1 beschrieben isoliert, eine Lyse der Erythrozyten durchgeführt und anschließend die hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen wie in 4.1.4 dargestellt angefärbt. Im Unterschied zum normalen Färbeprotokoll der Knochenmarkzellen für FACS-Analysen wurde, anstelle der üblichen Färbung mit Biotin-gekoppelten Antikörpern vor der Streptavidin-Färbung, eine Anreicherung der *lineage*-negativen Zellen vorgenommen. Dieser Zwischenschritt diente dazu, die für den Sortierprozess benötigte Zeit zu verkürzen und somit den auf die Zellen ausgeübten Stress zu vermindern. Um diesen Effekt zu erreichen, wurde das *EasyStep™ Mouse Hematopoietic Progenitor Cell Isolation Kit* (StemCell Technologies) verwendet. Die Durchführung der negativ-Selektion mittels Streptavidin gekoppelter, magnetischer *Beads* (Streptavidin RapidSpheres™ 50001) erfolgte nach Herstellerangaben, jedoch mit der Änderung, dass anstelle des im Kit beinhalteten *isolation cocktails* laboreigene Biotin-gekoppelte Antikörper in entsprechender Menge (siehe Tabelle 13) angewendet wurden. Im Anschluss an die *lineage*-negativ Anreicherung wurde der in 4.1.4 beschriebene Färbeprozess ab dem Zeitpunkt der Zugabe von Streptavidin-APC-Cy7 fortgeführt. Während des Sortierprozesses wurden die verschiedenen Subpopulationen in jeweils 500 µl FCS entlassen. Zuletzt wurden die einzelnen Zellsuspensionen zentrifugiert (4 °C, 5 min, 750 g), um anschließend kryokonserviert oder umgehend für eine RNA Extraktion (siehe 4.2.1) verwendet zu werden.

4.1.5 Messung reaktiver Sauerstoffspezies in hämatopoetischen Stammzellen mittels Durchflusszytometrie

Um das intrazelluläre ROS-Level verschiedener Subpopulationen des Knochenmarks quantifizieren zu können, wurde eine durchflusszytometrische Detektion der reaktiven Sauerstoffspezies mithilfe des Indikators CM-H₂DCFDA durchgeführt. Für diese Methode wurden anhand des Protokolls in 4.1.1 frisch isolierte Knochenmarkzellen verwendet. Zunächst wurden die Zellen ausgezählt, bevor etwa 5×10^7 Zellen in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen und die LSK-Zellen (LT-, ST-HSCs und MPPs) wie in 4.1.4 beschrieben angefärbt wurden. Zu beachten war dabei, dass anstelle des in Tabelle 14 aufgeführten

Antikörpers CD150-FITC ein mit *Brilliant Violet* gekoppelter CD150 AK in einer Konzentration von 0,075 µg (3 µl) verwendet wurde, um den FITC-Kanal am Durchflusszytometer für den Indikator H₂DCFDA verwenden zu können. Nach der letzten AK-Inkubation des Färbeprotokolls wurden die Zellen mit Krebs-HEPES Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte die ROS-Färbung. Dafür wurden die Zellen in 0,5 µM CM-H₂DCFDA-Lösung in Krebs-HEPES Puffer aufgenommen und für 30 min bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Hiernach folgte ein Waschschrift in Krebs-HEPES Puffer und die Analyse der gefärbten Zellen am FACSCanto™ II. Bei dem Indikator CM-H₂DCFDA handelt es sich um ein zellpermeables Chloromethyl-Derivat, das in seiner reduzierten Form nicht fluoresziert. Aufgrund der Reaktion mit ROS ändert der Indikator jedoch seine Struktur und wird durch Abspaltung der Acetatgruppen durch intrazelluläre Esterasen und durch Oxidation in das stark fluoreszierende 2', 7'-dichlorofluorescein (DCF) umgewandelt¹³⁴. Aufschluss über den ROS-Level gibt also die CM-H₂DCFDA-Signalintensität. Die Messung des Signals am Durchflusszytometer erfolgte anhand der folgenden Excitations-/Emissionswellenlänge: CM-H₂DCFDA: 488/520 nm.

Die Auswertung der Messdaten erfolgte mithilfe der FACSDiva Software, indem ein Histogramm der Zellzahl gegen die H₂DCFDA-Signalintensität erstellt wurde. Dieses erlaubte einen direkten Vergleich der Zellproben, die innerhalb eines Versuches am FACS analysiert und mit derselben H₂DCFDA-Färbelösung gefärbt wurden. Indirekte Vergleiche der Messungen von verschiedenen Versuchstagen konnten durch Berechnen der *arbitrary fluorescence* von WT- vs. PON2^{-/-}-Proben gezogen werden.

4.1.6 Messung reaktiver Sauerstoffspezies in frisch isolierten Knochenmarkzellen mittels Chemilumineszenz

Ein weiterer Ansatz um reaktive Sauerstoffspezies in Knochenmarkzellen zu analysieren, besteht darin, die Zellen mit L-012 zu behandeln und anschließend die Chemilumineszenz am Luminometer zu messen. Bei L-012 handelt es sich um ein zellpermeables Luminol-Derivat, das als Detektor für intrazelluläre reaktive Sauerstoffspezies mit hoher Sensitivität für Superoxid dient, da es bei der Reaktion mit ROS zur Chemilumineszenz angeregt wird¹³⁵.

Für diesen Versuch wurden die Knochenmarkzellen zunächst wie in 4.1.1 beschrieben frisch isoliert. Im Anschluss wurde eine Lyse der Erythrozyten durchgeführt, bevor die Zellen ausgezählt und die Zellsuspension durch Zugabe von Krebs-HEPES Puffer auf eine Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml verdünnt wurde. Danach wurde eine weiße 96-well-

Platte mit transparentem Boden mit 50 µl der vorbereiteten Zellsuspension bzw. Puffer beladen. Anschließend wurde 50 µl L-012-Lösung (40 µM) und in einige Wells zusätzlich 50 µl DMNQ-Lösung (10 µM) zugegeben. Bei dem zytotoxischen 2,3-Dimethoxy-1,4-Naphthoquinon (DMNQ) handelt es sich um ein Redox-Zyklus-Reagens, das intrazellulär die Bildung von Superoxid induziert ¹³⁶. Anschließend wurden alle Wells mit Krebs-HEPES Puffer auf ein Gesamtvolumen von 150 µl/Well aufgefüllt. Die Messung des Chemilumineszenz-Signals erfolgte über einen Zeitraum von 75 Minuten am Centro LB960 Luminometer.

4.1.7 Quantifizierung apoptotischer Zellen mittels Durchflusszytometrie

Für die Quantifizierung apoptotischer Zellen am FACS wurden sowohl frisch isolierte als auch aufgetaute, zuvor kryokonservierte, Knochenmarkzellen (siehe 4.1.3) verwendet. Der Versuch beruht auf der Detektion von Phosphatidylserin (PS), einem Phospholipid der Zellmembran, mittels Annexin V-PE. Bei Zellen, welche sich nicht in der Apoptose befinden, befindet sich das Phosphatidylserin nur in der inneren Lipidschicht der Zelle, pathogene Stimuli können jedoch dazu führen, dass PS auf der Zelloberfläche präsentiert wird und dadurch pro-apoptotisch wirkt ¹³⁷. Wie auch bei der Messung reaktiver Sauerstoffspezies mittels CM-H₂DCFDA wurde zunächst eine Erythrozyten-Lyse durchgeführt. Anschließend wurden die Knochenmarkzellen ausgezählt, um dann in einer Konzentration von bis zu 5 x 10⁷ Zellen/500 µl eine Färbung der LSK-Zellen (LT-, ST-HSC, MPP) wie in 4.1.4 beschrieben durchzuführen. Im Unterschied zu dem beschriebenen Färbeprotokoll wurde der AK CD135-PE aus Tabelle 14 weggelassen, um bei der anschließenden FACS-Analyse Annexin V-PE im PE-Kanal detektieren zu können. Durch diese Modulation des Protokolls konnte die Apoptoserate sowohl in LT- als auch in ST-HSCs ermittelt werden. Im Anschluss an die Färbung mit den übrigen 3 Antikörpern aus Tabelle 14 wurden die Zellen gewaschen, in 100 µl Annexin V-Bindepuffer aufgenommen, mit 5 µl Annexin V-PE versetzt und danach für 15 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Anschließend wurde die gefärbte Zellsuspension mit 400 µl Annexin V-Bindepuffer komplementiert. Die Messungen erfolgten am FACSCantoTM II mit der FACSDiva Software. Dabei wurden jeweils 500.000 *events* für die entsprechenden Excitations-/Emissionswellen-längen erfasst.

APC: 650 /660 nm; PE: 496/578 nm; Alexa Fluor 647: 650/665 nm.

4.1.8 Zellzyklusanalysen an HSPCs mittels Ki-67 und Hoechst

Um Zellzyklusanalysen an hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen durchführen zu können, wurden verschiedene Oberflächenfärbungen (Tabelle 15) mit einer Zellzyklusfärbung kombiniert. Dieser Versuch erfolgte in Kooperation mit Dr. Nina Cabezas-Wallscheid am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg.

Zunächst wurden die Versuchstiere abgetötet und ihre Knochenmarkzellen wie in 4.1.1 beschrieben isoliert. Im Anschluss an die Lyse der Erythrozyten wurden die Zellen ausgezählt, bevor je 2×10^7 Zellen pro Maus in FACS-Röhrchen überführt wurden. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (4 °C, 5 min, 1500 rpm) und eine anschließende Resuspendierung der Zellen in je 200 µl des folgenden Mastermixes:

Tabelle 15: Verwendete AK für den Mastermix zur Oberflächenfärbung der HSPCs für die Zellzyklusanalyse; eingesetzt in PBS

Zielprotein	Kopplung	Bezugsquelle	Eingesetzte Verdünnung
CD4	Alexa Fluor 700	eBioscience	1 : 500
CD8a	Alexa Fluor 700	eBiosciences	1 : 500
CD11b	Alexa Fluor 700	eBiosciences	1 : 500
Gr1 (Ly6G/C)	Alexa Fluor 700	eBiosciences	1 : 500
B220	Alexa Fluor 700	eBiosciences	1 : 300
Ter119	Alexa Fluor 700	BioLegend	1 : 500
ckit (CD117)	PE	eBiosciences	1 : 1000
Ly-6A/E	APC-Cy7	BD	1 : 500
CD150	PE-Cy5	BioLegend	1 : 500
CD48	PE-Cy7	BioLegend	1 : 1000

Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 4 °C. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 500 µl PBS und darauffolgendes Zentrifugieren (1500 rpm, 5 min, 4 °C) gewaschen. Auf eine Resuspendierung in 100 µl Cytofix/Cytoperm folgte dann eine 15-minütige Inkubation bei 4 °C. Dieser Schritt diente dazu, die Zellen zu permeabilisieren und zu fixieren. Durch Zugabe von 250 µl Permash und einer weiteren Zentrifugation (1500 rpm, 5 min, 4 °C) wurden die Zellen erneut gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 200 µl einer Ki-67 Alexa Fluor 647-Lösung (1:30) in Permash aufgenommen und 30-120 min bei 4 °C inkubiert. Der Anti-körper Ki-67 erkennt ein Epitop, das nur in den Kernen proliferierender Zellen auftritt, wodurch er als Proliferationsmarker eingesetzt werden kann^{138, 139}. Nach einem Waschschrift in Permash-Lösung wurden die Zellen in 100 µl einer 1:500

Verdünnung von Hoechst 33342 in PBS aufgenommen. Hoechst 33342 ist ein Fluoreszenz-Farbstoff, der dem Anfärben von DNA dient. Im Anschluss an eine 15-minütige Inkubation im Dunkeln bei RT wurden die Zellen mithilfe eines Zellsiebs (*Cell-Strainer Cap*, 12x75 mm) vereinzelt und am BD LSR II *Flow Cytometer* analysiert.

Excitations-/Emissionswellenlängen der in 4.1.4 noch nicht genannten Fluorochrome sind: Alexa Fluor 700: 633-647/723 nm; Alexa Fluor 647: 650/668 nm; PE-Cy5: 496/667 nm und FITC: 494/520 nm.

4.1.9 Quantifizierung von Doppelstrangbrüchen mittels γ -H2A.X am Durchflusszytometer

Sobald es durch endogene oder exogene Einflüsse zu einer DNA Schädigung kommt, die Doppelstrangbrüche verursacht, wird stets das Histon H2A.X phosphoryliert. Dieses neu phosphorylierte Protein, γ -H2A.X, ist der erste Schritt der Rekrutierung und Lokalisierung von DNA-Reparaturproteinen. Die Detektion und Visualisierung von γ -H2A.X mittels Durchflusszytometrie erlaubt die Beurteilung von DNA-Schädigungen, damit verbundenen DNA-Schadenproteinen und DNA-Reparatur¹⁴⁰.

Zur quantitativen Bestimmung des Maßes an DNA-Doppelstrangbrüchen in HSPCs wurden frisch isolierte oder zuvor kryokonservierte Knochenmarkzellen verwendet und eine LSK-Färbung (Lin-, Sca1+, ckit+) wie in 4.1.4 beschrieben durchgeführt. Im Anschluss an die Oberflächenfärbung wurden die Zellen mithilfe des Cytofix/Cytoperm-Kits wie in 4.1.8 beschrieben fixiert und permeabilisiert. Im letzten Schritt wurden die Zellen für 2 Stunden auf Eis und im Dunkeln mit dem Antikörper γ -H2A.X Phospho (Ser139) inkubiert (1:100 in Permash). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen gewaschen, in 500 μ l PBS + 2 % FCS resuspendiert und am FACSCanto™ II Durchflusszytometer analysiert. Die Auswertung erfolgte mithilfe der FACSDiva Software, indem ein Histogramm der Zellzahl gegen die γ -H2A.X Phospho-Signalintensität erstellt wurde. Um die Ergebnisse der Messungen von PON2^{-/-}-und WT-Knochenmarkzellen besser vergleichen zu können, wurde anschließend mithilfe der *CellQuest Pro* Software (BD) ein Overlay von jeweils 2 Histogrammen erstellt.

4.2 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

4.2.1 RNA Extraktion aus primären Zellen

Für die Extraktion der RNA aus Milz- und Blutzellen wurde das *peqGOLD Total RNA Kit* nach Herstellerangaben angewendet. Die RNA wurde in 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert.

Um die Gesamt-RNA aus hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen isolieren zu können, wurden die Subpopulationen zunächst wie in 4.1.4.1 beschrieben isoliert. Da die Anzahl der verschiedenen Zellen nach dem Sortieren sehr gering war, wurde anschließend das *Arcturus PicoPure RNA Isolation Kit* eingesetzt. Dieses Kit gewährleistet höhere Ausbeuten bei wenig Ausgangsmaterial. Die RNA wurde in 11 µl Elutionspuffer eluiert.

4.2.2 Bestimmung des Nukleinsäuregehalts

Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit von RNA erfolgte am *Nanodrop Spectrophotometer* durch die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Der Ablauf der Messung erfolgte den Angaben des Herstellers entsprechend. Als Leerprobe wurde dabei entweder RNase-freies Wasser oder Elutionspuffer verwendet, in Abhängigkeit davon, mit welchem Kit die RNA zuvor isoliert wurde (siehe 4.2.1).

Das Verhältnis (*ratio*) von Extinktion der Probe bei 260 nm zu 280 nm entspricht der Nukleinsäure-Reinheit und zeigt die Verunreinigung durch Protein-Rückstände aus der Präparation an. Dies ergibt sich aus der Absorption von Nukleinsäuren bei 260 nm und jener von Proteinen bei 280 nm. Dabei sollte das Verhältnis OD260/OD280 nicht unter 1,8 liegen.

4.2.3 cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Um eine quantitative real-time RT-PCR (siehe 4.2.4) durchführen zu können, ist es notwendig, die extrahierte RNA in cDNA (*complementary DNA*) umzuschreiben. Die Synthese der cDNA erfolgte mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase. Die Synthese von cDNA aus der extrahierten RNA von Milz- oder Blutzellen wurde mit dem *High Capacity cDNA Reverse Transkription Kit*, gemäß Empfehlungen des Herstellers, in einem Thermal Cycler durchgeführt. Dabei wurden 80 ng RNA eingesetzt. Bei den verwendeten Primern handelt es sich um ein Gemisch aus Primern mit Zufallssequenzen (*random-primer-mix*).

Tabelle 16: Reaktionsansatz und Reaktionsprofil der cDNA-Synthese mit dem *High Capacity cDNA Reverse Transkription Kit*.

PCR-Ansatz		PCR Reaktionsprofil	
Wasser	6,2 µl	10 min	25 °C
10 x PCR Puffer	2 µl	120 min	37 °C
dNTPs	0,8 µl	5 min	85 °C
Primermix 10 x (Endkonz. 20 pM/µl)	2 µl		
RT Enzyme	1 µl		
Template RNA (10 ng/µl) (Endkonz. 80 ng/Reaktion)	8 µl		

Die Synthese von cDNA aus der extrahierten RNA von zuvor sortierten hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen (4.1.4.1) wurde mit dem *SuperScript™ VILO™ Master Mix* nach Herstellerangaben durchgeführt. Dieser Mastermix dient der Synthese von cDNA aus geringen RNA-Mengen. Pro Ansatz wurden 20 ng RNA eingesetzt.

Tabelle 17: Reaktionsansatz und Reaktionsprofil der cDNA-Synthese mit dem *SuperScript™ VILO™ Master Mix*.

PCR-Ansatz		PCR Reaktionsprofil	
Wasser	14 µl	10 min	25 °C
<i>SuperScript™ VILO™ Master Mix</i>	4 µl	120 min	37 °C
Template RNA (10 ng/µl) (Endkonz. 20 ng/Reaktion)	2 µl	5 min	85 °C

4.2.4 Quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR)

Die quantitative real-time RT-PCR dient dazu, aus einer Gesamtzell-RNA eine spezifische mRNA zu quantifizieren, wodurch das Expressionsprofil von Zellen für ein spezifisches Gen angezeigt werden kann.

Für die *TaqMan* qRT-PCR wird neben den *forward* und *reverse* Primern eine spezifische DNA-Sonde (*TaqMan probe*) eingesetzt, die am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff (6-Carboxyfluorescein, FAM) und am 3'-Ende mit einem Quencher (Carboxytetramethyl-rhodamin, TAMRA) markiert ist. Die Sonde ist für den Genbereich zwischen den beiden eingesetzten Primern sequenzspezifisch. Solange die Sonde an die komplementäre cDNA gebunden und intakt ist, wird durch die räumliche Nähe von Fluoreszenzmarkierung und Quencher keine Fluoreszenz abgegeben. Der Grund dafür ist der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (*fluorescence resonance energy transfer*, FRET) von FAM auf TAMRA.

Erst wenn während der Extensionsphase der PCR die Sonde durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase gespalten wird und sich dadurch Fluoreszenzfarbstoff und Quencher räumlich voneinander entfernen, sodass der Energietransfer ausbleibt, emittiert FAM bei 518 nm. Diese Emission kann durch Anregung bei 488 nm im qPCR-System detektiert werden. Das vom Detektor erfasste Signal ist dabei direkt proportional zur Menge der amplifizierten cDNA und somit zur ursprünglichen mRNA-Menge. Der *TaqMan* PCR-Ansatz und das verwendete Reaktionsprofil wurden wie in Tabelle 18 aufgeführt eingesetzt und mittels *OneStepPlus Cyclor* gemessen.

Tabelle 18: Reaktionsansatz und Reaktionsprofil der *TaqMan* qRT-PCR.

PCR-Ansatz		PCR Reaktionsprofil		
2x Reaktionspuffer	10 µl	1 min	95 °C	1 x
dNTPs (0,2 mM)	0,4 µl	1 min	95 °C	45 x
<i>forward Primer</i> (10 pmol/µl)	1 µl	30 sec	95 °C	
<i>reverse Primer</i> (10 pmol/µl)	1 µl	1 min	60 °C	
<i>TaqMan</i> Sonde (10 pmol/µl)	1 µl	∞	4 °C	1 x
Wasser	3,1 µl			
Taq-Polymerase	0,5 µl			
cDNA	3 µl			

Die Berechnung des mRNA-Expressionslevels für alle qRT-PCR-basierten Analysen erfolgte durch die $2^{-1\Delta\Delta}$ -Methode¹⁴¹. Dabei wurde die Expressionsrate des analysierten Gens (PON2) gegen die Expressionsrate zweier konstitutiv exprimierter mRNAs (*house keeping genes*, hier: Glycerin-aldehyd-3-phosphat, GAPDH bzw. Gapdh und β -Actin) aus der gleichen Probe normalisiert.

4.2.5 Totale RNA-Sequenzierung

Zur totalen RNA-Sequenzierung wurden die Knochenmarkzellen von jungen PON2^{-/-}- und WT- Tieren isoliert und die HSCs wie in 4.1.4 beschrieben mittels Fluorochrom-gekoppelter Antikörper markiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis in die *Flow Cytometry Core Facility* des Instituts für Molekulare Biologie (IMB) in Mainz transportiert und dort an einem FACS Aria™ II flow cytometer (BD) anhand der Färbung ihrer zellspezifischen Oberflächenmarker sortiert. Zur Sequenzierung wurden ausschließlich die *long-term* HSCs (Lin-, Sca1+, ckit+, CD135-, CD150+) verwendet. Diese wurden in Paketen von 10 Zellen pro Well in eine von der *Genomics Core Facility* des IMB vorbereitete, mit Lysis-Puffer gefüllte 96-well-Platte

sortiert. Innerhalb der *Genomics Core Facility* wurde anschließend das *Smart-seq2*-Protokoll zur Bibliothekenerstellung verwendet, bevor eine *Next-Generation-DNA*-Sequenzierung mit dem *NextSeq® 500/550 High Output Kit v2* durchgeführt wurde. Die Analyse der Rohdaten wurde in Kooperation mit Piyush More durchgeführt. Um die Qualität der Sequenzdaten zu überprüfen, wurde das Programm FastQC (Babraham Bioinformatics) verwendet. Anschließend wurde ein „Trimmen“ der Sequenzierungsreads durch Trimmomatic (v0.36, ¹⁴²) vorgenommen. Im nächsten Schritt wurde ein *alignment* der Sequenzdaten mit dem Referenzgenom der Maus (gencode release M12 GRCm38.p5) durchgeführt, indem das Programm STAR aligner (v2.5.3a; ¹⁴³) mit der Option "- quantModeGeneCounts" angewendet wurde, um die Zahl der *reads* pro Gen abbilden zu können. Danach wurden die Programme DESeq2 (v1.18.1; ¹⁴⁴) und edgeR (v3.20.7; ¹⁴⁵) genutzt, um differentiell exprimierte Gene in den PON2-defizienten Zellen im Vergleich zu den WT-Zellen zu identifizieren. Gene mit einer mindestens 2-fachen Änderung und einer FDR (*False Discovery Rate*) unter 0.05 wurden als differentiell exprimiert eingestuft.

4.3 Vergleichende Analysen des hämatopoetischen Systems von Wildtyp C57BL/6J- und PON2^{-/-}-Mäusen

4.3.1 *In vivo* Biotinylierung zur Messung des Erythrozyten- und Thrombozytenumsatzes

Der Erythrozyten- und Thrombozytenumsatz (auch Erythro-/Thrombokinetik genannt) beschreibt den permanenten Prozess des Abbaus alter Erythrozyten bzw. Thrombozyten und deren Ersatz durch junge Erythrozyten/Thrombozyten. Mithilfe einer Biotin-Markierung gemäß veröffentlichter Protokolle ^{75, 146} sollte die Verweildauer der Erythrozyten und Thrombozyten im peripheren Blut von Mäusen ermittelt werden. Da das verwendete sulfo-N-hydroxysuccinimide-long chain-Biotin (sulfo-NHS-LC-Biotin) neben den Erythrozyten und Thrombozyten ebenfalls an die Oberflächenstrukturen verschiedener anderer peripherer Blutzellen bindet, wurden im Versuchsablauf zusätzlich der Erythrozyten-spezifische Oberflächenmarker Ter119 sowie der Thrombozyten-spezifische Oberflächenmarker CD41 eingesetzt. Unter Verwendung des Biotin-Streptavidin-Systems konnte so die Anzahl an

biotinylierten Erythrozyten und Thrombozyten in Blutproben durchflusszytometrisch ermittelt werden. Aufgrund der ungefähren durchschnittlichen Lebenserwartung von murinen Erythrozyten von $40,7 \pm 1,9$ Tagen¹⁴⁷ sowie von murinen Thrombozyten von 5,7 Tagen¹⁴⁸ wurde der Versuch über einen Zeitraum von 5 Wochen bzw. 5 Tagen durchgeführt.

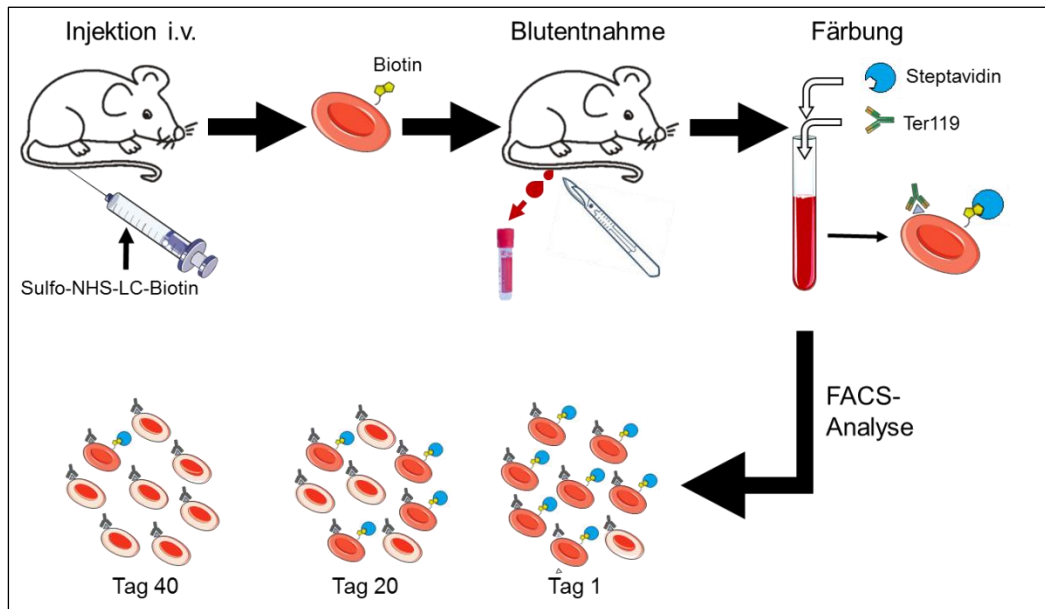


Abbildung 9: Schematische Darstellung der *in vivo* Biotinylierung von Erythrozyten. WT- und PON2^{-/-}-Tieren wurde *i.v.* sulfo-NHS-LC-Biotin injiziert, um die im zirkulierenden System befindlichen peripheren Blutzellen, unter anderem die Erythrozyten, zu markieren. In regelmäßigen Abständen erfolgte die Entnahme einer geringen Menge an Blut, um mittels Streptavidin und Ter119 Färbung die Menge an markierten Erythrozyten im Blut der Versuchstiere durchflusszytometrisch zu bestimmen.

Zur Biotinylierung der Erythrozyten und Thrombozyten *in vivo* wurden den WT- und PON2^{-/-}-Mäusen mithilfe einer 26 G ½ Kanüle 100 µl einer sulfo-NHS-LC-Biotin Lösung (30 mg/ml) in die Schwanzvene (*i.v.*) injiziert. Dies hat eine erwartete Markierungsrate von etwa 80 - 95 % der zirkulierenden Erythrozyten/Thrombozyten zur Folge. Nach 30 Minuten erfolgte die erste Blutentnahme, um den individuellen Ausgangswert der Biotinylierung jeder Maus zu ermitteln. Nachfolgende Blutentnahmen wurden zunächst täglich (erste 5 Tage), dann im Abstand von 5 Tagen, ab Tag 20 im Abstand von 7 Tagen durchgeführt. Mittels FACS-Analysen wurde die Anzahl der biotinylierten Erythrozyten bzw. Thrombozyten in den Blutproben, also im zirkulierenden System, zum jeweiligen Zeitpunkt bestimmt. Dafür wurden durch Anritzen der *Vena caudalis mediana* ca. 10 µl Blut entnommen und umgehend in ein EDTA-beschichtetes Reaktionsgefäß (Microvette® 500 K3E) überführt. Nach der Zugabe von 600 µl PBS + 2 % FCS und mehrmaligem auf- und abpipettieren, wurde die verdünnte Blutprobe in gleichen Teilen in drei 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und mit PBS

+ 2 % FCS auf 500 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Als negativ Kontrolle für die anschließende FACS-Analyse diente eine unbehandelte Blutprobe. Den Blutproben in den beiden übrigen Reaktionsgefäßen wurde Streptavidin APC-Cy7 (1:250) und der Antikörper Ter119 APC (1:500) bzw. CD41 FITC (1:500) zugesetzt. Im Anschluss an eine 15-minütige Inkubation im Dunkeln und auf Eis wurden die Proben mit PBS + 2 % FCS gewaschen und am FACSCanto™ II Durchflusszyto-meter bei folgenden Excitations-/Emissionswellenlängen gemessen:

Streptavidin APC-Cy7: 650/785 nm; Ter119 APC: 650/660 nm; CD41 FITC: 494/520 nm.

4.3.2 Induzieren einer hämolytischen Anämie durch Phenylhydrazin

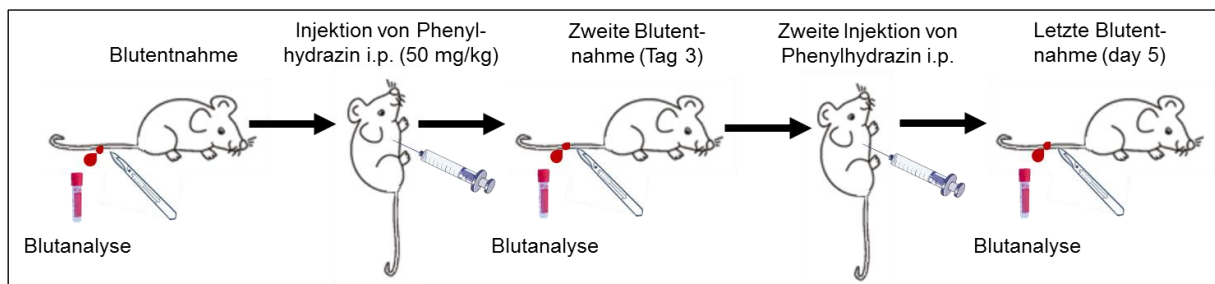


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes während der Induktion einer hämolytischen Anämie durch Phenylhydrazin. WT- und PON2^{-/-}-Mäusen wurde an Tag 1 durch Anritzen der Schwanzvene Blut entnommen um am Sysmex XP Haematology Analyzer ein Blutbild zu erstellen. Anschließend wurde den Tieren *i.p.* Phenylhydrazin injiziert. An Tag 3 wurden diese beiden Schritte wiederholt. An Tag 5 erfolgte lediglich die Entnahme und Analyse von Blut, bevor der Versuch beendet wurde.

Als hämolytische Anämie bezeichnet man Anämien, die Folge eines vorzeitigen bzw. beschleunigten Erythrozytenuntergangs sind. Dieser Zustand wurde im hier beschriebenen Versuch durch die intraperitoneale (*i.p.*) Injektion von Phenylhydrazin, einem Hydrazin-Derivat, das mit Hämoglobin reagiert, hervorgerufen. Diese Methode erlaubt die Analyse der Stress-induzierten Erythropoese in Mäusen.

Im ersten Schritt wurden den WT- und PON2^{-/-}-Versuchstieren durch vorsichtiges Anritzen der *Vena caudalis mediana* ca. 80 µl Blut entnommen, in ein EDTA beschichtetes Reaktionsgefäß überführt und mittels Sysmex XP Haematology Analyzer untersucht. Im Anschluss wurde den Mäusen mithilfe einer 26 G Kanüle 50 mg/kg Phenylhydrazin Hydrochlorid (Sigma-Aldrich) oder PBS (für Kontrolltiere) *i.p.* injiziert. An Tag 3 wurden diese beiden Schritte wiederholt, während an Tag 5, dem Tag der Versuchsbeendigung, lediglich eine Blutprobe entnommen und keine Injektion vorgenommen wurde. Ein individueller Vergleich der RBC (*red blood cell count*)-Werte an Tag 1, 3 und 5 erlaubt Rückschlüsse auf die Sensibilität der Mäuse gegenüber der Behandlung.

4.3.3 Behandlung mit Antioxidantien

Um ROS-abhängige von anderen PON2-vermittelten Effekten abgrenzen zu können, wurden 16 PON2^{-/-}-Mäuse mit dem Antioxidant N-Acetylcystein (NAC; Sigma-Aldrich) behandelt. Verabreicht wurde das NAC in einer Konzentration von zunächst 7 mg/ml, in einem späteren Versuchsaufbau dann 10 mg/ml im Trinkwasser der Tiere. Die Behandlung begann in der pränatalen Phase durch die Behandlung der trächtigen Müttertiere und wurde nach der Geburt bis hin zur Analyse der hämatopoetischen Zellen im Alter von 10-14 Wochen kontinuierlich weitergeführt.

4.3.4 Knochenmarktransplantationen

Diese Methode beruht auf der Übertragung von Knochenmarkszellen (*bone marrow cells*, BMCs) aus einer Spendermaus (Donor) in eine Empfängermaus (Rezipient), deren eigenes Knochenmark vor der intravenösen Injektion der Spender-BMCs durch eine letale Bestrahlungsdosis zerstört wurde.

Aufgrund der hierarchischen Proliferationsorganisation und der Tatsache, dass sich die Knochenmarkszellen kontinuierlich aus einer kleinen Menge teilungsfähiger Stammzellen regenerieren, ist das hämatopoetische System extrem anfällig gegenüber Strahlung¹⁴⁹. Die multipotenten, undifferenzierten Stammzellen sind dabei die radiosensitivsten. Durch die letale Bestrahlung der Empfängermäuse werden sie abgetötet, wodurch das gesamte hämatopoetische System zum Erliegen kommt. Durch die intravenöse Injektion von Spenderknochenmark kommt es anschließend zu einer Repopulation des Knochenmarks durch die transplantierten Stammzellen (Donor-Hämatopoese)¹⁵⁰.

4.3.4.1 Reziproke Knochenmarktransplantation

Die reziproke Knochenmarktransplantation dient der Erzeugung von Chimären, deren hämato-poetische Zellen einen Genotyp aufweisen, der vom Genotyp des übrigen Organismus abweicht. Auf diese Weise können zellspezifische Effekte von umgebungsvermittelten, in diesem Fall Nischeneffekten, differenziert werden.

Um die reziproke Knochenmarktransplantation durchzuführen, wurden zunächst die etwa 12 Wochen alten Empfängermäuse in einer Vollschutzbestrahlungsanlage für Kleintiere (Cäsium-137 Quelle 2x 60 Tetrabecquerel) mit einer Dosis von 9 Gy bestrahlt. 24 Stunden

später wurden die Knochenmarkzellen aus Femora und Tibia der etwa 12 Wochen oder über 9 Monate alten Spendertiere (PON2^{-/-} und WT) wie in 4.1.1 beschrieben isoliert oder zuvor isolierte und kryokonservierte Zellen rekultiviert. Je nach Zellzahl wurden jeweils zwei oder drei Proben des gleichen Spendergenotyps zu einer gemeinsamen Zellsuspension vereinigt und bei 900 xg und 4 °C 5 Minuten lang zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in DMEM resuspendiert, ausgezählt und auf eine Konzentration von 5 x 10⁷ Zellen/ml eingestellt. Den am Tag zuvor bestrahlten Empfängertieren wurde mittels einer 1 ml-Spritze mit 26 G ½ Kanüle 100 µl der jeweiligen verdünnten Zellsuspension (PON2^{-/-} oder WT) i.v. in eine der Schwanzvenen injiziert, sodass jedes Individuum eine Gesamtmenge von 5 x 10⁶ Knochenmarkzellen erhalten hat. Zur Sichtbarmachung der Venen wurden die Empfängertiere vor der Injektion ca. 5 - 10 Minuten unter einer Rotlichtlampe erwärmt. Zur Kontrolle der Bestrahlungseffizienz wurde einer Empfängermaus 100 µl DMEM (ohne BMCs) injiziert. Bei dieser Maus zeigten sich im Laufe von etwa 8 - 10 Tagen deutliche Strahlungsschäden, sodass sie gemäß der Beurteilungstabelle (siehe Tabelle 19) abgetötet wurde.

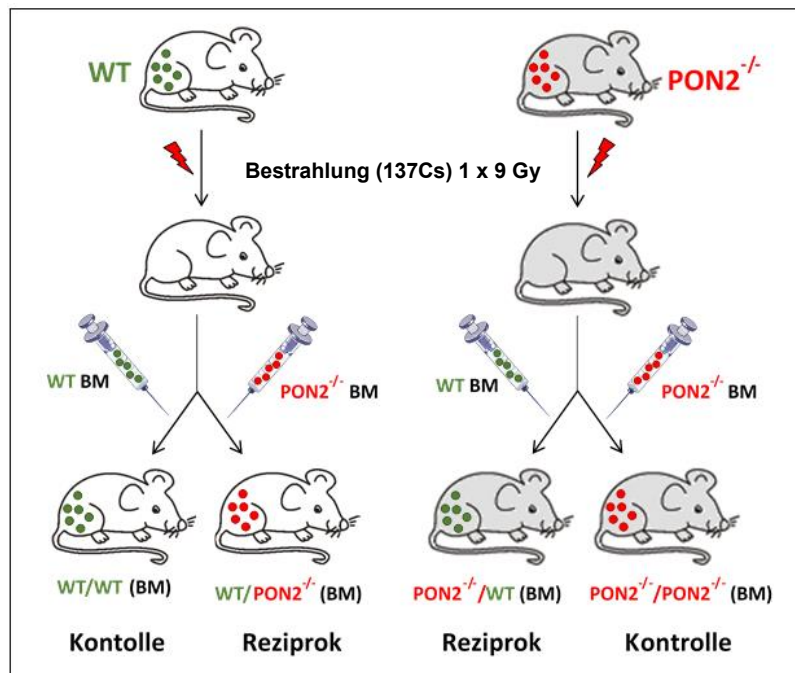


Abbildung 11: Schema der reziproken Knochenmarkstransplantation zur Generierung von WT- und PON2^{-/-}-Chimären. WT- und PON2^{-/-}-Rezipienten wurden mit einer Dosis von 9 Gy bestrahlt, wodurch ihr eigenes Knochenmark abgetötet wurde und die Hämatopoese zum Erliegen kam. WT- und PON2^{-/-}-Spendertieren wurden Knochenmarkszellen (BMCs) entnommen und mittels i.v. Injektion in die bestrahlten Empfängertiere übertragen. Dadurch wurden 4 Versuchsgruppen generiert: die 2 Transplantationskontrollen WT/WT (BM) und PON2^{-/-}/PON2^{-/-} (BM), sowie die 2 Chimären WT/PON2^{-/-} (BM), PON2^{-/-}/WT (BM).

Wie in Abbildung 11 dargestellt, wurden durch die reziproke Transplantation vier verschiedene Versuchsgruppen generiert. Die beiden Kontrollgruppen, WT/WT (BM) und PON2^{-/-}/PON2^{-/-} (BM), dienten dem Erkennen und Ausschließen transplantationsbedingter Effekte. Die beiden reziproken Gruppen, WT/PON2^{-/-} (BM) und PON2^{-/-}/WT (BM), dienten hingegen der Erzeugung von Chimären, die entweder PON2^{-/-}-Knochenmark- und Blutzellen im WT Hintergrund, oder WT-Knochenmark- und Blutzellen im PON2^{-/-} Hintergrund aufwiesen.

Während der 21-tägigen Dauer des Versuches wurde der Gesundheitszustand der transplantierten Mäuse für 10 Tage täglich, anschließend jeden zweiten Tag, mithilfe eines etablierten Bewertungsschemas (Tabelle 19) nach Cooke et al.¹⁵¹ beurteilt. Dabei wurde jedes Tier nach den Parametern der *Graft-versus-Host-Reaktion* (Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion) untersucht. Zu den Bewertungskriterien zählen die Hautbeschaffenheit, Fell, Körperhaltung, Aktivität und Gewicht. Die Punkteskala von 0-2 Punkten pro Bewertungskriterium ergibt eine maximale Punktzahl von 10 Punkten. Aus tierschutzrechtlichen Gründen wurden die Versuchstiere bei einem Wert von ≥ 6 narkotisiert und anschließend mittels zervikaler Dislokation abgetötet.

Tabelle 19: Bewertungsschema für die Beurteilung des Gesundheitszustands der Bestrahlungskontrolle und der Knochenmark-transplantierten Tiere.

	Haut	Fell	Körperhaltung	Aktivität	Gewicht
0,5	Schuppung an Pfote und Ohren	struppiges Fell ventral	leichte Kyphose, nur in Ruhe	Aktivität reduziert	
1	Erythem an Schwanz und Anus	ventrale Querlinien, leicht struppiges Fell dorsal	leichte Kyphose auch bei Bewegung	>50% des Beobachtungszeitraums keine Bewegung	10-25% Gewichtsverlust
1,5	offene Läsion	Struppiges Fell >50% der Oberfläche	Kyphose	Bewegung nur nach Stimulation	
2	multiple offene Läsionen	gesamtes Fell betroffen, Fellverlust	starke Kyphose, eingeschränkte Beweglichkeit	keine Bewegung, auch nach Stimulation	>25% Gewichtsverlust

Nach Ablauf der 21 Tage wurden die Versuchstiere wie in 4.1.1 beschrieben abgetötet und ihr Knochenmark sowie eine Blutprobe entnommen. Der Erfolg des *Engraftments* und somit der Initiierung der Donor-Hämatopoese wurde durch mRNA-Expressionsanalysen isolierter Blutzellen analysiert. Dafür wurden die Blutzellen aus mittels Herzpunktion gewonnenem Blut zunächst in PBS gewaschen, eine Lyse der Erythrozyten durchgeführt und anschließend eine RNA-Isolation mithilfe des *peqGOLD Total RNA Kits* durchgeführt. Nachfolgend wurde, wie in 4.2.4 beschrieben, mittels qRT-PCR die PON2-mRNA-Expression der Zellen analysiert.

4.3.4.2 Kompetitive Knochenmarktransplantation

Die kompetitive Knochenmarktransplantation dient der Analyse der Funktionalität von hämato-poetischen Stammzellen.

Zu Beginn des Experimentes wurden Knochenmarkzellen der etwa 12 Wochen alten CD45.1 positiven WT C57BL/6-Ly5.1-, sowie der CD45.2 positiven PON2^{-/-} und WT C57BL/6J-Spendertiere wie in 4.1.1 beschrieben isoliert. Anschließend wurden die Knochenmarkzellen ausgezählt, auf eine Konzentration von 8×10^7 Zellen/ml eingestellt und dann 1:1 vermischt, um die folgenden Gruppen zu erhalten: WT CD45.1/WT CD45.2 (Kontrollgruppe) und WT CD45.1/PON2^{-/-} CD45.2 (siehe Abbildung 12). Im nächsten Schritt wurden 100 µl der vereinten Knochenmarkzellen intravenös in zuvor letal bestrahlte, ebenfalls etwa 12 Wochen alte WT C57BL/6J-Empfängermäuse injiziert. Wie bereits bei der reziproken Transplantation in 4.3.4.1 beschrieben, wurde auch hier einer Empfängermaus, die als Bestrahlungskontrolle dienen sollte, DMEM anstelle von Knochenmark-Zellsuspension injiziert. Über einen Zeitraum von 22 Wochen wurden die transplantierten Mäuse in regelmäßigen Abständen auf die in Tabelle 19 aufgeführten Anzeichen der *Graft-versus-Host-Reaktion* untersucht. Zusätzlich wurde den Versuchstieren 3- bis 4-wöchentlich Blut abgenommen, um die Blutzellen auf deren Ptpcr a/b-Chimärismus zu analysieren (siehe Abschnitt 4.3.4.2.1).

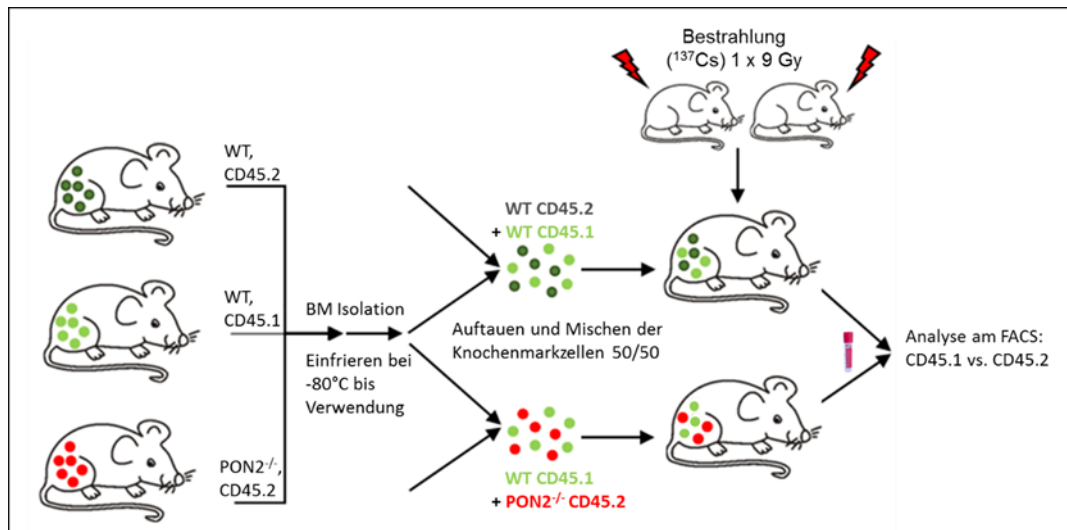


Abbildung 12: Der experimentelle Aufbau der kompetitiven Knochenmarktransplantation. WT CD45.2, WT CD45.1 sowie PON2^{-/-} CD45.2 positiven Spendertieren wurden Knochenmarkszellen entnommen und im Verhältnis von 1:1 zu den Gruppen WT/WT (Kontrolle) und WT/PON2^{-/-} zusammengefügt. Die vereinten Zellsuspensionen wurden i.v. in zuvor letal bestrahlte WT-Empfängertiere injiziert. In regelmäßigen Abständen wurde den kompetitiv transplantierten Empfängertieren eine kleine Menge Blut entnommen, um die Blutzellen mittels CD45.1- und CD45.2-Antikörpern zu färben und das Verhältnis von CD45.1 zu CD45.2 positiven Blutzellen durchflusszytometrisch zu analysieren.

4.3.4.2.1 FACS-Analyse von Mäuseblut auf den Ptpcr a/b-Chimärismus

Die Analyse von Blutproben mittels Durchflusszytometrie erfolgt in Anlehnung an Mardiney und Malech 1996¹⁵². Bei dieser Methode wird der Chimärismus des Ptpcr-Gens (*protein tyrosine phosphatase, receptor type C*) ausgenutzt. Aufgrund dieses Chimärismus tritt bei manchen Mauslinien das Allel a (z.B. bei C57BL/6-Ly5.1) und bei anderen Linien das Allel b (z.B. bei C57BL/6J) auf. Innerhalb der CD-Nomenklatur wird Ptpcr^a auch als CD45.1 und Ptpcr^b auch als CD45.2 bezeichnet. Da CD45 auf allen Leukozyten exprimiert wird, wird es auch als „common leukocyte antigen“ bezeichnet. Die hier verwendeten PON2^{-/-}-Mäuse (siehe 3.9) der Linie C57BL/6J tragen das Allel b (CD45.2).

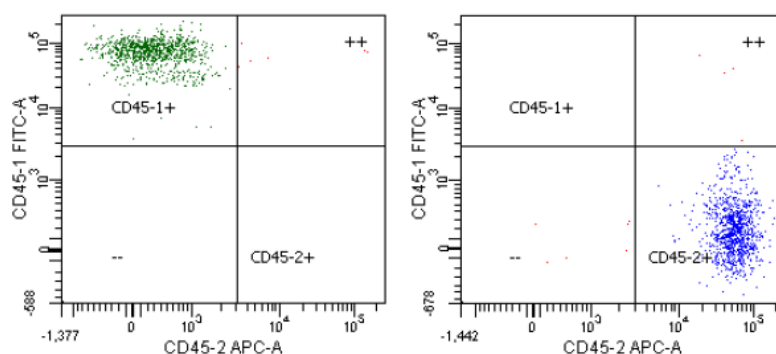


Abbildung 13: Analyse peripherer Leukozyten mittels Durchflusszytometrie.

Leukozyten von (A) C57BL/6-Ly5.1 und (B) C57BL/6J Mäusen. An der Oberfläche der Leukozyten zeigt sich der Chimärismus des Ptpcr-Gens in der CD45.1 Expression in C57BL/6-Ly5.1 bzw. der CD45.2 Expression in C57BL/6J Mäusen.

Nach 3, 7, 11, 15, 19 und 22 Wochen im Anschluss an die Knochenmarktransplantation erfolgte eine Analyse der peripheren Blutzellen der Empfängertiere. Die durchflusszytometrische Quantifizierung der CD45.1 und CD45.2 positiven Leukozyten erfolgte im direkten Anschluss an die Entnahme von 50 µl Blut durch Anritzen der *Vena caudalis mediana*. Dafür wurde das Blut zunächst in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß, gefüllt mit 500 µl *Erythrocyte Lysis Buffer*, überführt. Eine 5-minütige Inkubation auf Eis bewirkte die Lyse fast aller im Blut befindlichen Erythrozyten. Im Anschluss an eine Zentrifugation (5 min, 4 °C, 750 g) erfolgte die Resuspendierung der Zellen in 100 µl PBS + 2 % FCS und die Zugabe von 2 µl CD45.1- (FITC) und 1,25 µl CD45.2- (APC) Antikörper. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis und im Dunkeln, wurden die Blutzellen gewaschen, in 300 µl kaltes PBS mit 2 % FCS aufgenommen und anschließend am FACSCanto™ II Durchflusszytometer

analysiert. Im *Dotplot* lassen sich 2 getrennte Populationen darstellen, da die Blutzellen entweder den CD45.1 positiven C57BL/6-Ly5.1 WT Stammzellen, oder den CD45.2 positiven C57BL/6J PON2^{-/-} oder WT (bei Kontrolltransplantierten) Stammzellen entstammen.

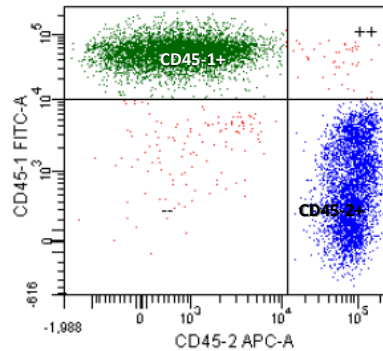


Abbildung 14: Gemischte Leukozyten-Population. Leukozyten von kompetitiv transplantierten Mäusen, gefärbt mit CD45.1 und -2. In diesem Beispiel tragen 57,3 % der Zellen das CD45.1 Antigen, während 40,9 % das CD45.2 Antigen tragen. Ungefärbte oder doppelt-positive Zellen wurden ausgeschlossen.

4.3.4.3 Serielle Knochenmarktransplantation

Die serielle Transplantation dient der Initiierung von erhöhtem Stress auf die Spender-Knochenmarkzellen durch multiples Initiieren der Donor-Hämatopoese.

Hierfür wurden Knochenmarkzellen von mehr als 9 Monate alten WT- und PON2^{-/-}-Spendermäusen isoliert, ausgezählt und anschließend 5×10^6 Zellen/Tier *i.v.* in zuvor letal bestrahlte, ca. 12 Wochen alte WT-Empfängermäuse injiziert. Anschließend wurde der Gesundheitszustand der Tiere zunächst täglich, ab dem 10. Tag nach der Transplantation in Intervallen von zwei Tagen mithilfe der in Tabelle 19 aufgeführten Parameter der *Graft-versus-Host*-Reaktion kontrolliert. Nach 3 Wochen wurde der Versuch beendet und die transplantierten Tiere als Donoren für die nächste Runde der Transplantation verwendet. Zu diesem Zweck wurde das Knochenmark der Tiere isoliert, ausgezählt und wiederholt in zuvor bestrahlte WT-Empfängertiere transplantiert. Im Laufe der darauffolgenden 3 Wochen wurde der Gesundheitszustand der Tiere noch engmaschiger, innerhalb der ersten 10 Tage zweimal täglich, anschließend einmal täglich kontrolliert und die Tiere beim Erreichen eines Wertes von ≥ 6 auf der Bewertungsskala (Tabelle 19) narkotisiert und anschließend abgetötet. Die Auswertung erfolgte anhand der Überlebenszeit bzw. Überlebensrate der Empfängertiere der zum zweiten Mal transplantierten WT- bzw. PON2^{-/-}-Knochenmarkzellen aus alten Spendertieren.

4.3.4.4 *Homing*

Unter *Homing* versteht man das „Wandern“ hämatopoetischer Stammzellen aus dem peripheren Blut in die Knochenmarknische.

Durchgeführt wurde dieses Experiment anhand des Protokolls von Yusuf und Scadden aus dem Jahr 2009¹⁵³. Als Spendertiere wurden WT- und PON2^{-/-}-Mäuse im Alter von 12-14 Wochen verwendet, als Empfänger dienten WT-Mäuse im Alter von etwa 12 Wochen. In Abweichung zum publizierten Protokoll wurden die Knochenmarkzellen, wie in 4.1.1 beschrieben, durch Spülen anstelle von Zermahlen der Knochen gewonnen.

Isoliert wurden die zuvor mit DiI gefärbten und *i.v.* injizierten Knochenmarkzellen 48 Stunden nach der Transplantation. Direkt im Anschluss erfolgte die Analyse der Zellen am Durchfluss-zytometer. Gemessen wurde die prozentuale Menge an DiI-positiven Knochenmarkzellen in Relation zur Gesamtmenge der analysierten Zellen. Die Messungen erfolgten am FACS CantoTM II mit der FACSDiva Software. Dabei wurden 500.000 *events* für die entsprechende Excitations-/Emissionswellenlänge erfasst:

DiI: 549/565 nm.

4.3.5 Colony Assay

Der *colony forming assay* dient der Beurteilung der Differenzierungseigenschaften und/oder der Selbsterhaltungskapazität von Knochenmarkzellen. Für diese Methode wurden Knochenmarkzellen aus WT- und PON2^{-/-}-Mäusen, wie in 4.1.1 beschrieben, isoliert. Während des Isolationsprozesses und allen folgenden Schritten wurde strengstens auf Sterilität geachtet. Nach einer Lyse der Erythrozyten wurde mit einem Teil der Zellsuspension eine 1:100 Verdünnung hergestellt, die der Ermittlung der Zellzahl pro ml mithilfe einer Neubauer-Zählkammer diene. Anschließend wurde die Gesamt-Zellsuspension verdünnt, um eine Konzentration von 3×10^5 Zellen/ml zu erreichen. 250 µl dieser verdünnten Zellsuspension wurden anschließend in 2,5 ml zähflüssiges MethoCultTM GF M3434 aufgenommen, mithilfe eines Vortexers durchmischt und daraufhin mindestens 5 Minuten bei Raumtemperatur ruhen gelassen, um das Entweichen von entstandenen Luftblasen aus dem MethoCult zu gewährleisten. Die Konsistenz des MethoCults ermöglicht es den ausplattierten Knochenmarkzellen, durch Teilung Kolonien auszubilden. Pro Knochenmarkprobe wurden zwei Ansätze à 1,1 ml in unbeschichteten Zellkulturschalen (Durchmesser 35 mm) ausplattiert. Die Dichte der Zellen betrug 3×10^4 Zellen pro Ansatz, also etwa $2,73 \times 10^4$ Zellen/ml MethoCult. Die

Inkubation der Proben erfolgte bei 37 °C in ausreichend humider Umgebung. Nach 10 - 12 Tagen erfolgte die Analyse der Anzahl der entstandenen Kolonien sowie die Identifizierung der verschiedenen Kolonien an einem Leitz DM IL Mikroskop (Leica). Die Kolonien wurden anhand des Benutzerhandbuches des Herstellers in die folgenden Einheiten eingeteilt: CFU-GEMM (*colony-forming unit granulocyte/erythroid/macrophage/megakaryocyte*), CFU-GM (*colony-forming unit granulocyte/macrophage*), CFU-G (*colony-forming unit granulocyte*), CFU-M (*colony-forming unit macrophage*) und BFU-E (*burst-forming unit erythroid*). Repräsentative Bilder der verschiedenen Kolonien sind in Abbildung 15 dargestellt.

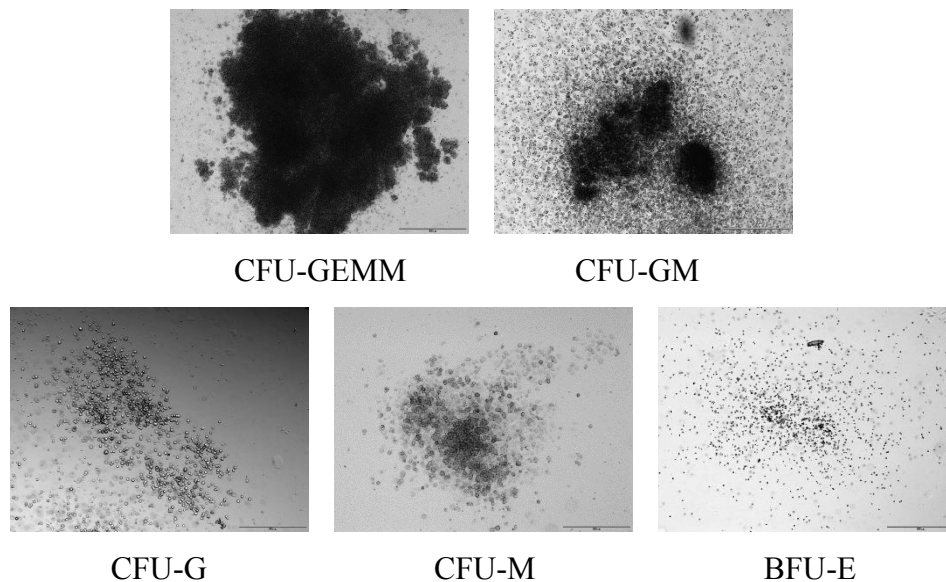


Abbildung 15: Colony forming assay. Repräsentative Bilder der *colony forming units* -GEMM, -GM, -G und -M sowie der *burst forming unit-E* nach 10- bis 12-tägiger Inkubation der Knochenmarkzellen von WT- und PON2^{-/-}-Mäusen bei 37 °C in MethoCult.

4.4 Statistik

Die in Kapitel 5 dargestellten Grafiken wurden mit dem Programm *GraphPad Prism 5* erstellt. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels *One-way ANOVA* oder *t-Test*. Dabei wurde für den Vergleich zweier Gruppen der *t-Test* (bei angenommener Normalverteilung mit einer Schiefe <1) und für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen der *One-way ANOVA* mit *Bonferroni's multiple comparison test* oder Fisher's *LSD-Test* angewendet.

5 Ergebnisse

Über die Rolle der PON2 im hämatopoetischen System liegen bisher nur sehr wenige Informationen vor. Einige Studien der letzten Jahre beschäftigen sich allerdings mit der Funktion von PON2 in verschiedenen malignen Erkrankungen des blutbildenden Systems, wie beispielsweise akuter lymphatischer Leukämie (ALL) und chronischer myeloischer Leukämie (CML) ^{42, 43}. Zusätzlich wurde 2011 in einer Studie von Witte et al. an der CML-Zelllinie K562 gezeigt, dass die Steigerung der PON2-Expression *in vitro* in einem Schutz vor verschiedenen Chemotherapeutika resultiert und dass der PON2 *knock-down* in den Tumorzellen zu einer spontanen Apoptose führt ³². Um die PON2 in Zukunft auf ihre Nutzbarkeit als prognostischer Marker oder als potentielles Target in der Leukämie-Behandlung untersuchen zu können ist es notwendig, zunächst die Rolle der PON2 im gesunden hämatopoetischen System zu analysieren.

Aufgrund dessen wurden in dieser Arbeit erstmals die Folgen einer PON2-Defizienz *in vivo* auf die Hämatopoese untersucht.

5.1 PON2-Defizienz verursacht Modifikationen in den hämatopoetischen Organen Thymus und Milz

Zur Ergründung der Rolle der PON2 im hämatopoetischen System wurden vergleichende Analysen an PON2-defizienten und Wildtyp-Mäusen im Alter von 10-14 Wochen (im weiteren Verlauf als „jung“ bezeichnet) beziehungsweise mehr als 9 Monaten (im weiteren Verlauf als „alt“ bezeichnet) durchgeführt. Während der Präparation der Tiere wurden neben dem Knochenmark und Blut auch die lymphatischen Organe Milz und Thymus isoliert, die unter anderem eine wichtige Rolle beim Aufbau beziehungsweise der Erhaltung des Immunsystems spielen.

5.1.1 PON2^{-/-}-Mäuse weisen divergente B-Zell- und T-Vorläuferzellzahlen auf sowie eine Splenomegalie in alten Weibchen

Die Milz, ein sekundäres lymphatisches Organ, schließt die Entwicklung verschiedener Lymphozyten und Monozyten ab, übernimmt die Aussonderung überalterter oder geschädigter Erythrozyten und dient bei jungen Säugetieren auch der Bildung von Erythrozyten. Mit Ausnahme der hämolytischen Krise ist sie im Erwachsenenalter in der Regel nicht mehr an der Hämatopoese beteiligt. Verschiedene Auslöser wie unter anderem Bluterkrankungen (z.B. Leukämie), chronische oder akute Infektionen sowie Entzündungen können zur Ausbildung einer Splenomegalie (Milz-Vergrößerung) führen¹⁰⁵.

Eine solche Splenomegalie konnte in mehr als 9 Monate alten PON2-defizienten Weibchen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 16). In Abbildung 17 ist deutlich zu erkennen, dass eine signifikant vergrößerte Milz auch in jungen weiblichen sowie alten männlichen PON2^{-/-}-Tieren detektiert werden konnte, wobei der Unterschied des durchschnittlichen Milzgewichtes in alten PON2^{-/-}-Weibchen im Vergleich zu alten WT-Weibchen am deutlichsten zutage trat. Die Milzen alter weiblicher PON2^{-/-}-Mäuse (durchschnittlich fast 300 mg schwer) waren hierbei nachweislich etwa doppelt so schwer wie die Milzen gleichaltriger weiblicher WT-Mäuse (durchschnittlich ca. 150 mg schwer).

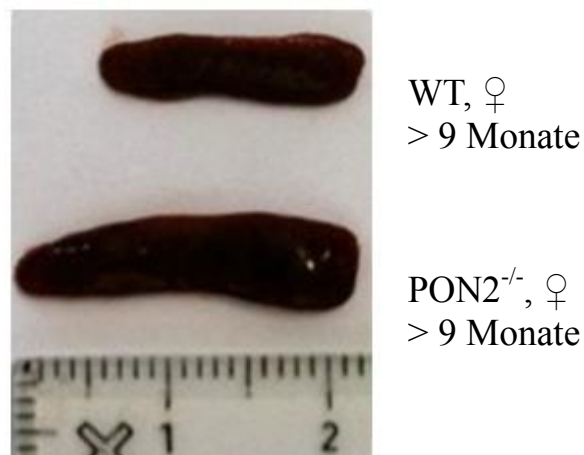


Abbildung 16: Vergrößerte Milz (Splenomegalie) bei weiblichen, mehr als 9 Monate alten PON2^{-/-}-Mäusen. Oben im Bild ist die Milz einer alten weiblichen Wildtyp-Maus zu sehen, während unten die Milz einer alten PON2-defizienten Maus gezeigt ist. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Milz der PON2^{-/-}-Maus im Vergleich zur Milz der Wildtyp-Maus stark vergrößert ist.

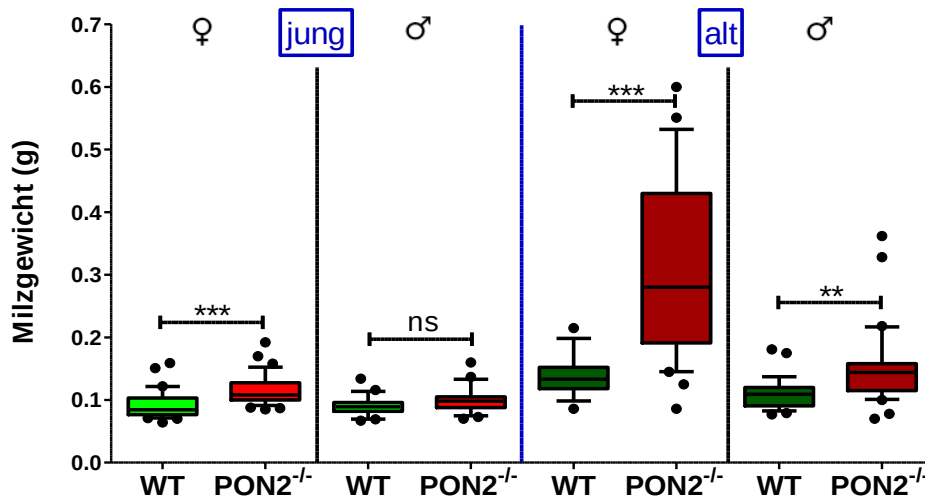


Abbildung 17: Durchschnittliches Milzgewicht von weiblichen und männlichen, jungen und alten PON2^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Wildtypen. Für die Analyse wurde das Gewicht der Milzen von PON2^{-/-}- und WT-Tieren bestimmt und nach Geschlecht und Alter getrennt statistisch verglichen. Box-Diagramm. Median $\pm$ unteres/oberes Quartil mit 10/90 Wert; Ausreißer = Kreise; n = 16-37. ** p<0,01; *** p<0,001; n.s.= nicht signifikant; T-Test.

Die mithilfe der in Tabelle 12 aufgeführten Antikörper-Kombinationen am Durchflusszytometer durchgeführten quantitativen Analysen der aus der Milz isolierten Zellen ergaben keine signifikanten Unterschiede der prozentualen Menge an reifen Myelozyten (siehe Abbildung 18 A), Erythrozyten-Vorläufern (siehe Abbildung 18 B) sowie proliferierenden Zellen (siehe Abbildung 18 H) innerhalb der Milz aus jungen oder alten WT- und PON2^{-/-}-Mäusen. In jungen PON2-defizienten Tieren konnte jedoch eine signifikante Verringerung des Anteils früher B-Zellen (siehe Abbildung 18 D) und weiter ausgereifter B-Zellen (siehe Abbildung 18 E) festgestellt werden, während die prozentuale Anzahl ausdifferenzierter B-Zellen eine signifikante Steigerung erkennen ließ (siehe Abbildung 18 F). Diese Erhöhung der Zahl ausdifferenzierter B-Zellen wurde neben einer signifikanten Verringerung der Erythrozytenzahl (siehe Abbildung 18 C) sowie der T-Vorläuferzellen (siehe Abbildung 18 G) auch in alten PON2^{-/-}-Tieren festgestellt.

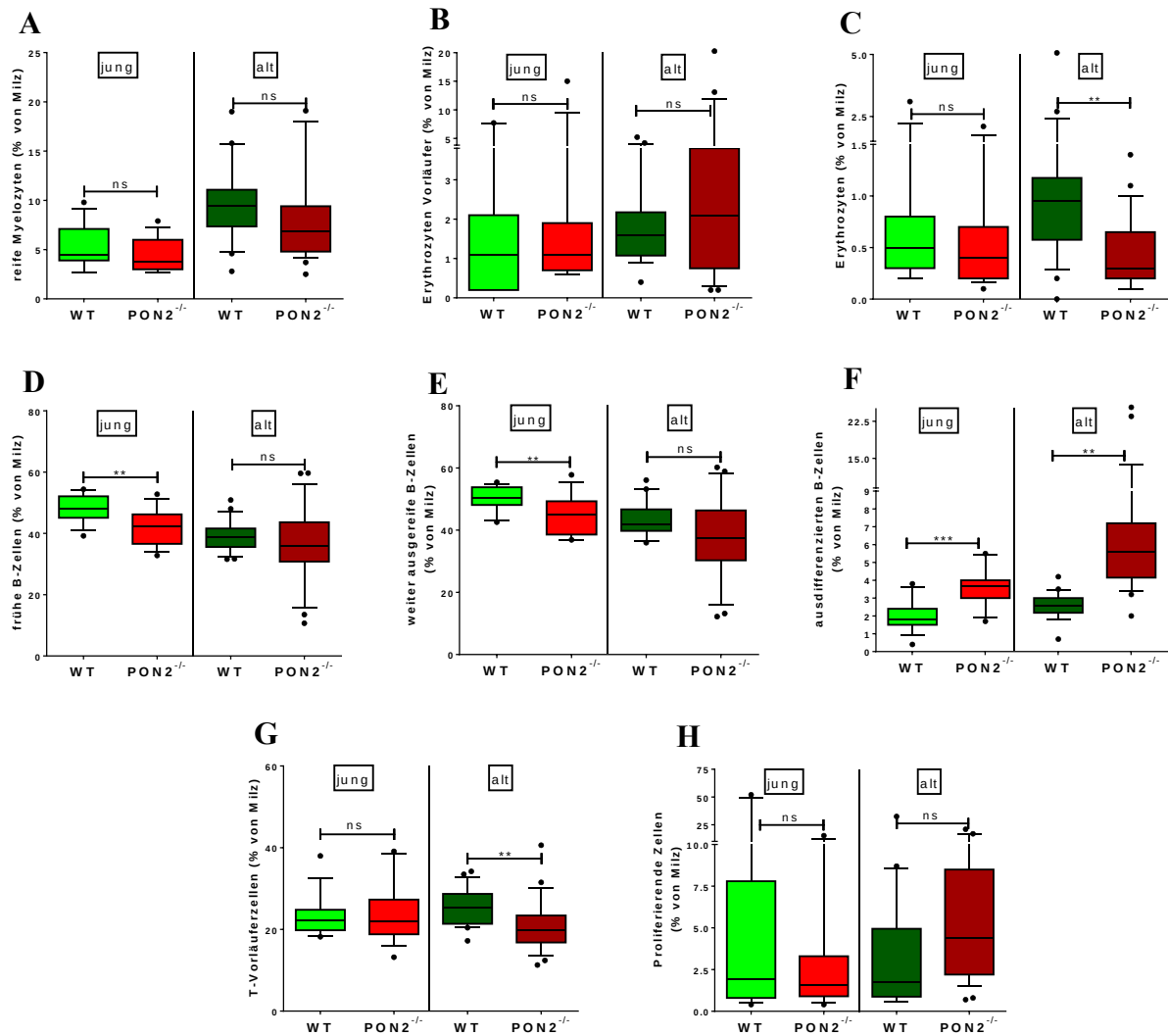


Abbildung 18: Befunde aus durchflusszytometrischen Analysen der Milz junger und alter WT- und PON2^{-/-}-Mäuse. Im Anschluss an die Isolierung wurden die Zellen der Milz mittels Oberflächenmarkern angefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Gezeigt wird der prozentuale Anteil der (A) ausgereiften Myelozyten, (B) Erythrozyten- Vorläufer, (C) Erythrozyten, (D) frühen B-Zellen, (E) weiter ausgereiften B-Zellen, (F) ausdifferenzierten B-Zellen, (G) T-Vorläuferzellen und (H) proliferierenden Zellen in der Milz von WT- bzw. PON2^{-/-}-Mäusen. Box-Diagramm. Median ± unteres/oberes Quartil mit 10/90 Wert; Ausreißer = Kreise; n = 15-29. ** p<0,01; *** p<0,001; n.s.= nicht signifikant; T-Test.

5.1.2 PON2^{-/-}-Mäuse zeigen eine verlangsamte Thymusinvolution und veränderte T-Zell-Reifung

Der Thymus gehört neben dem Knochenmark zu den primären lymphatischen Organen. Seine Aufgabe ist der Abschluss der Reifung der aus dem Knochenmark stammenden und über die Blutbahn eingewanderten T-Vorläuferzellen. Diese reifen T-Zellen werden für den Kampf gegen Infektionen und für den Erhalt der Gewebeintegrität benötigt. Aufgrund dieser wichtigen Funktion wurde der Thymus ebenfalls in die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen eingeschlossen.

Während des Alterungsprozesses kommt es sowohl bei Mäusen also auch bei allen anderen Säugetieren zu einer Thymus-Involution, also einer Rückbildung des Organs, was dafür spricht, dass dieser Prozess stammesgeschichtlich sehr alt ist, und evolutionär konserviert blieb.¹⁵⁴ Ebenfalls in verschiedenen Säugetierarten konserviert ist die Tatsache, dass der weibliche Thymus langsamer altert als der männliche, was höchst wahrscheinlich darin begründet ist, dass männliche Hormone die Involution beschleunigen^{155, 156}.

Dieser geschlechtsspezifische Unterschied war in den Analysen des Organgewichtes in jungen und alten, weiblichen und männlichen PON2^{-/-}- und WT-Tieren deutlich zu erkennen (siehe Abbildung 19). Des Weiteren zeigten die Ergebnisse, dass in jungen weiblichen sowie in mehr als 9 Monate alten männlichen PON2^{-/-}-Tieren im Vergleich zu entsprechenden Wildtypen ein erhöhtes Thymusgewicht vorlag. Dieses gesteigerte Gewicht des Thymus in alten PON2^{-/-}-Männchen lässt auf eine verlangsamte Thymusinvolution schließen.

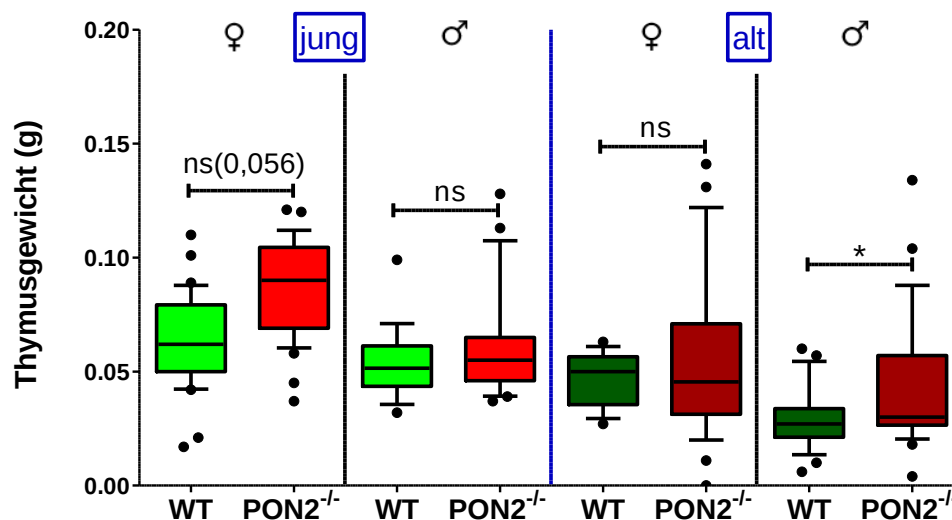


Abbildung 19: Durchschnittliches Thymusgewicht von weiblichen und männlichen, jungen und alten PON2^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Wildtypen. Für die Analyse wurde das Gewicht der Thymi von PON2^{-/-}- und WT-Tieren bestimmt und nach Geschlecht und Alter getrennt statistisch verglichen. Box-Diagramm. Median $\pm$ unteres/oberes Quartil mit 10/90 Wert; Ausreißer = Kreise; n = 13-37. ** p<0,01; *** p<0,001; n.s.= nicht signifikant; T-Test.

Im Anschluss an die äußerliche Examination wurden die verschiedenen Zellpopulationen aus dem Thymus von PON2^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen isoliert (siehe Abschnitt 4.1.2) und mit den in Tabelle 12 aufgeführten spezifischen Antikörper-Kombinationen gefärbt.

Die durchflusszytometrischen quantitativen Analysen ergaben keine Auffälligkeiten in jungen $PON2^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu Wildtypen, jedoch unterschiedliche Modifikationen in der Anzahl verschiedener T-Zell-Entwicklungsstufen sowie früher B-Zellen in alten Tieren. Innerhalb der $CD3^{+}/B220^{-}$ -Subpopulation, den T-Vorläuferzellen, sowie der $CD4^{+}/CD8^{+}$ -Subpopulation, auch als „doppelt-positive“ T-Zellen bezeichnet, konnte eine signifikante Verringerung der prozentualen Zellzahl im Thymus alter $PON2$ -defizienter Mäuse festgestellt werden (siehe Abbildung 20 A und C). Im Gegensatz dazu waren die $CD4^{-}/CD8^{-}$ -Subpopulation, also die frühen T-Zellen, sowie die beiden „einfach positiven“ Subpopulationen, T-Helferzellen ($CD4^{+}/CD8^{-}$) und zytotoxische T-Zellen ($CD4^{-}/CD8^{+}$), in alten $PON2^{-/-}$ -Tieren signifikant vergrößert.

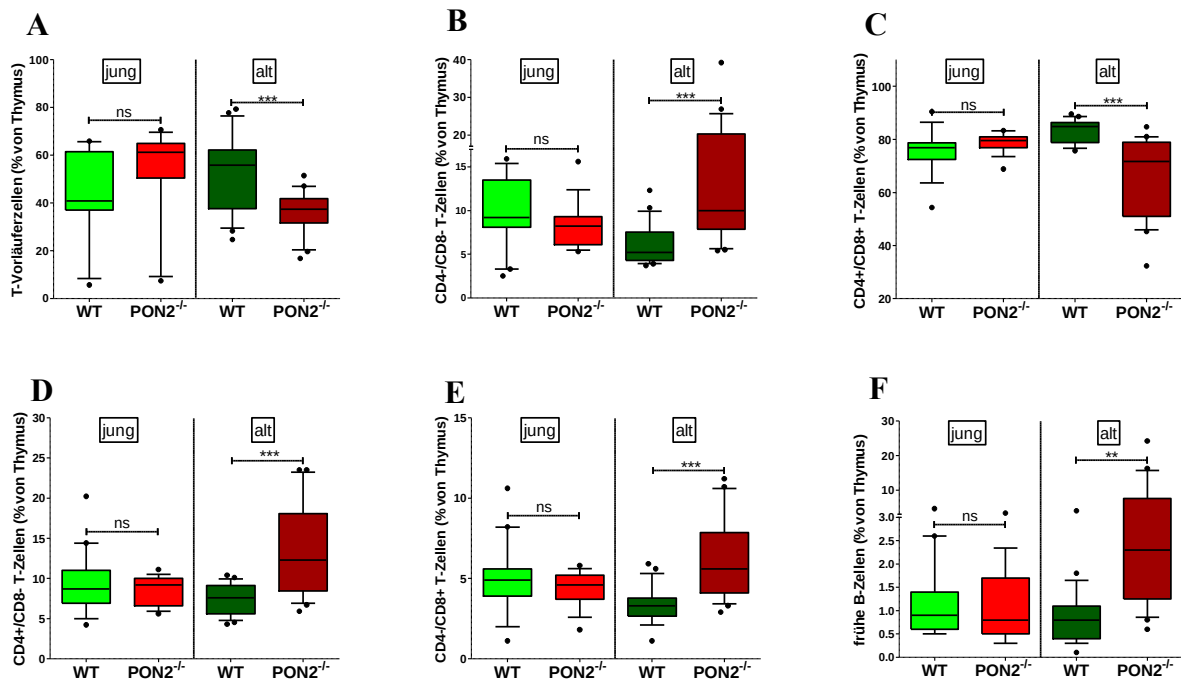


Abbildung 20: Immunologische Analysen des Thymus junger und alter Wildtyp- und $PON2^{-/-}$ -Mäuse. Im Anschluss an die Isolierung wurden die Zellen des Thymus mittels Oberflächenmarkern angefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Gezeigt wird der prozentuale Anteil der (A) T-Vorläuferzellen, (B) frühen T-Zellen, (C) T-Zellen, (D) T-Helferzellen, (E) zytotoxischen T-Zellen und (F) frühen B-Zellen im Thymus von WT- bzw. $PON2^{-/-}$ -Mäusen. Box-Diagramm. Median $\pm$ unteres/oberes Quartil mit 10/90 Wert; Ausreißer = Kreise; n = 15-22. ** p<0,01; *** p<0,001; n.s.= nicht signifikant; T-Test.

5.2 Divergenter PON2-Expressionslevel in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen von jungen und alten WT-Mäusen

Im Anschluss an die Evaluation der Effekte einer PON2-Defizienz auf die Milz und den Thymus wurden die vergleichenden Analysen auf das Knochenmark und das periphere Blut der Tiere erweitert. Zunächst wurde der PON2-Expressionslevel in den hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen von jungen und alten WT Mäusen bestimmt. Dafür wurden die verschiedenen Zelltypen mittels fluoreszenz-gekoppelter Oberflächenmarker angefärbt (siehe 4.1.4), am Institut für molekulare Biologie (IMB) sortiert (siehe 4.1.4.1) und anschließend mittels RNA-Isolierung (siehe 4.2.1) mit darauffolgender reverser Transkription (siehe 4.2.3) und qRT-PCR (siehe 4.2.4) auf ihren basalen PON2-mRNA-Expressionslevel analysiert. Diese Analysen dienten der allgemeinen Aufklärung, ob PON2 in HSPCs nachweisbar ist und in welchen Mengen das Enzym in den jeweiligen Zellpopulationen exprimiert wird. Die Ergebnisse sollten anschließend genutzt werden um zu beurteilen, ob bei einem PON2 *knock-out* von etwa 95% ein Effekt auf den jeweiligen Zelltyp zu erwarten ist. Verglichen wurden alle Messwerte mit der durchschnittlichen PON2-mRNA-Expression in den LT-HSCs von jungen Tieren. Als Referenzwert wurde außerdem die PON2-mRNA-Expression von Leberzellen betrachtet, da die Leber neben dem Dünndarm und der Lunge über einen relativ hohen basalen PON2-Expressionslevel verfügt ¹⁶.

Im direkten Vergleich war der Expressionslevel in der Leber 4-fach höher als jener in LT-HSCs von etwa 3 Monate alten WT C57BL/6J Mäusen. In Abbildung 21 ist deutlich sichtbar, dass sich der Expressionslevel der PON2 in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen im Laufe des Alterungsprozesses verändert, während der Expressionslevel in der Leber unverändert bleibt.

In jungen Tieren konnte sowohl für die LT-HSCs, ST-HSCs als auch die MPPs, CMPs und die GMPs ein sehr ähnlicher, relativ niedriger PON2-Expressionslevel nachgewiesen werden. Die Werte variierten von circa einem Viertel bis zu etwa einem Drittel gegenüber der Expression in der Leber. Eine Ausnahme bildeten hierbei die Megakaryozyten/Erythrozyten Vorläufer (MEPs) der jungen Mäuse. Im Einzelnen wiesen die ST-HSCs mit einer durchschnittlich 0,57-fachen Expression im Vergleich zu den LT-HSCs den niedrigsten PON2-mRNA-Level aller HSPCs auf. Danach folgten die GMPs mit einer 0,85-fachen Expression und die LT-HSCs, deren Expressionslevel auf 1 gesetzt wurde. Die nächst höheren Werte zeigten die CMPs mit einer 1,54-fachen und die MPPs mit einer 1,64-fachen PON2-mRNA-Expression. Den höchsten Wert im Vergleich zur Expression in LT-HSCs wiesen die

MEPs auf. Sie zeigten eine 5,47-fach erhöhte, und damit über dem Vergleichswert der Leber liegende, PON2-mRNA-Expression.

Im Gegensatz zu jungen Tieren zeigten sich in mehr als 9 Monate alten WT-Tieren divergente PON2-Expressionslevel. Die Expression in LT- und ST-HSCs war numerisch gesteigert, während der Level in MEPs signifikant verringert war und mit einer 0,33-fachen Expression den niedrigsten PON2-mRNA-Level aller HSPCs in alten Tieren aufwies. Darauf folgten die CMPs, mit einer durchschnittlich 0,56-fachen und die MPPs mit einer 0,65-fachen Expression verglichen mit der PON2-mRNA-Expression in LT-HSCs junger Mäuse. Die GMPs zeigten mit einem durchschnittlich 1,29-fachen Expressionslevel den nächst höheren Wert, während die LT-HSCs mit einer 2,95-fachen und die ST-HSCs mit einer 3,36-fachen Expression den höchsten PON2-mRNA-Level der HSPCs aus alten Mäusen aufwiesen (siehe Abbildung 21).

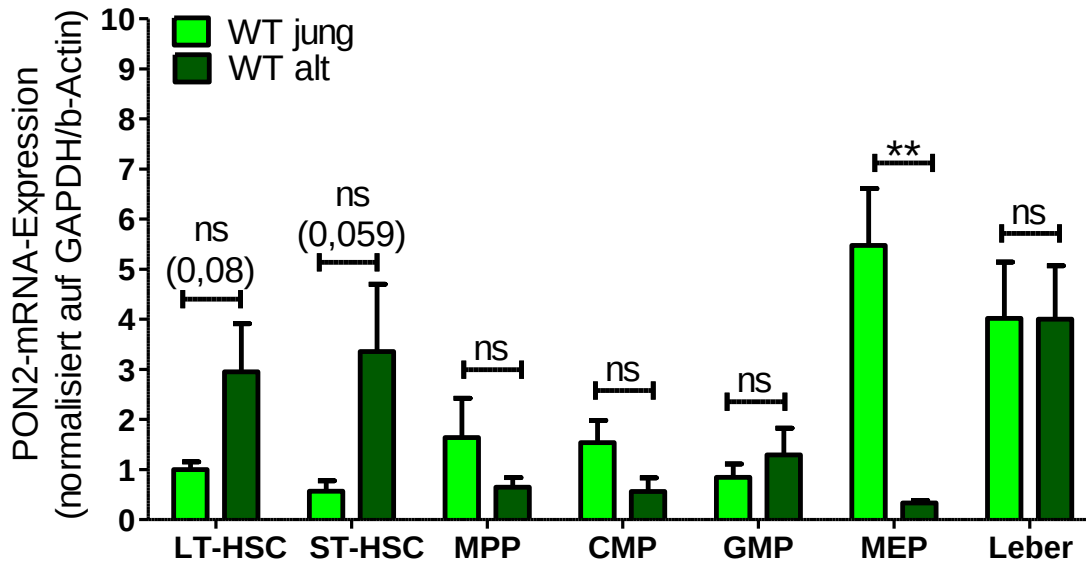


Abbildung 21: Der PON2-mRNA-Expressionslevel in HSPCs und Leberzellen von WT C57BL/6J Mäusen. Zur Bestimmung des PON2-mRNA-Expressionslevels mussten die verschiedenen Zelltypen zunächst sortiert werden, bevor ihre RNA isoliert und anschließend qRT-PCR Analysen durchgeführt wurden. Die Expressionsraten wurden auf Gapdh und β -Actin normalisiert und sind im Graphen als x-fach von LT-HSCs aus jungen WT-Mäusen dargestellt. n = 3-6 Assays mit 2-6 Mäusen pro Gruppe. Mittelwert + SEM. ** p<0,01; n.s., nicht signifikant; T-Test.

Aufgrund des Nachweises der PON2-Expression in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen in Wildtyp-Mäusen verschiedenen Alters wurden im weiteren Verlauf des Projektes vergleichende Analysen der Knochenmarkzellen sowie des peripheren Blutes von WT sowie PON2-defizienten Mäusen durchgeführt. Basierend auf den in Abbildung 21 dargestellten Unterschieden des PON2-Expressionslevels in HSPCs junger und älterer Mäuse, wurde die altersspezifische Unterteilung in den nachfolgenden Studien beibehalten.

5.3 Junge $PON2^{-/-}$ -Mäuse weisen verschiedenste Modifikationen in der Hämatopoese auf

5.3.1 Quantitative und morphologische Auffälligkeiten des Knochenmarks und des Blutbildes $PON2$ -defizienter Mäuse

Um einen tieferen Einblick in die Hämatopoese $PON2$ -defizienter Mäuse zu erhalten, wurden durchflusszytometrische Analysen differenzierender Knochenmarkszellen aus $PON2^{-/-}$ - und WT C57BL/6J-Mäusen durchgeführt. Darüber hinaus wurde durch den Einsatz von Sysmex- bzw. HEMAVET-Geräten der Einfluss von $PON2$ im peripheren Blut untersucht und quantitativ analysiert. Dies erlaubt eine weitergehende Identifizierung und Verifizierung $PON2$ -abhängiger Modifikationen der HSPCs sowie der peripheren Blutzellen, die zum Teil bereits in Vorarbeiten dieses Projektes offengelegt wurden.

5.3.1.1 $PON2$ -Mangel führt zu quantitativen Änderungen in Zellen des Knochenmarks

Wie in den Abschnitten 1.3 und 1.3.2 beschrieben, bilden HSCs die Basis der Hämatopoese. Aus diesem Grund wurden zunächst die prozentualen Anteile der verschiedenen multipotenten HSPC-Subpopulationen des Knochenmarks analysiert. Diese Zellen machen quantitativ weniger als 0.1 % der kernhaltigen Zellen des Knochenmarks aus. Sie sind die einzigen Zellen des hämatopoetischen Systems, die noch die Fähigkeit besitzen sowohl in die myeloische als auch in die lymphatische Linie zu differenzieren (siehe Abbildung 5).

Die Analysen konzentrierten sich auf die sogenannte LSK-Fraktion, die sowohl die LT-, ST-HSCs als auch die MPPs enthält, also all jene Zellen, die für liniendeterminierte Antigene negativ und für die Stammzellantigene *Sca1* und *ckit* (CD117) positiv sind (siehe auch Tabelle 13 und Tabelle 14). Die genaue *Gating*-Strategie zur Diskriminierung zwischen LT-, ST-HSCs und MPPs ist in Abbildung 22 dargestellt.

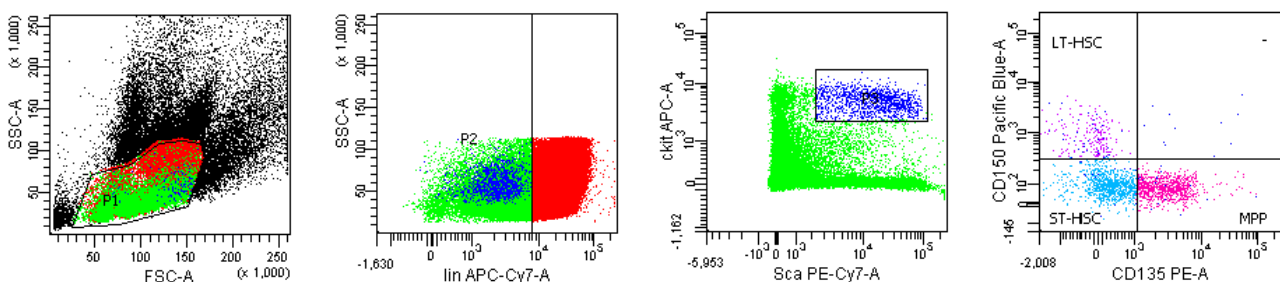


Abbildung 22: *Gating*-Strategie zur durchflusszytometrischen Unterscheidung zwischen den verschiedenen Subpopulationen innerhalb der LSK-Fraktion des Knochenmarks. Zu sehen sind repräsentative Punktdiagramme (*Dotplots*), erstellt mit der FACSDiva Software.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten durchflusszytometrischen Analysen der prozentualen Knochenmarkzellzahl ergaben Auffälligkeiten innerhalb der LSK-Fraktion. Die Gesamtzahl der LSK-Zellen innerhalb der *lineage*-negativen Population blieb hierbei unverändert (siehe Abbildung 23 A). Im Einzelnen befanden sich im Vergleich zum Wildtyp signifikant mehr LT-HSCs (*lin*⁻, *Sca1*⁺, *ckit*⁺, *CD150*⁺, *CD135*⁻) im Knochenmark von PON2-defizienten Mäusen (siehe Abbildung 23 B), während die Analyse des prozentualen Anteils der ST-HSCs (*lin*⁻, *Sca1*⁺, *ckit*⁺, *CD150*⁻, *CD135*⁻) keine Normabweichung ergab (siehe Abbildung 23 C). Des Weiteren war die prozentuale Menge der MPPs (*lin*⁻, *Sca1*⁺, *ckit*⁺, *CD150*⁻, *CD135*⁺) im Gesamtknochenmark von PON2^{-/-}-Tieren signifikant verringert, verglichen mit WT-Tieren (siehe Abbildung 23 D). Die erhöhte Zahl an LT-HSCs in Kombination mit der verringerten Zahl an MPPs erklärt die unveränderte Anzahl der Zellen innerhalb der gesamten LSK-Fraktion.

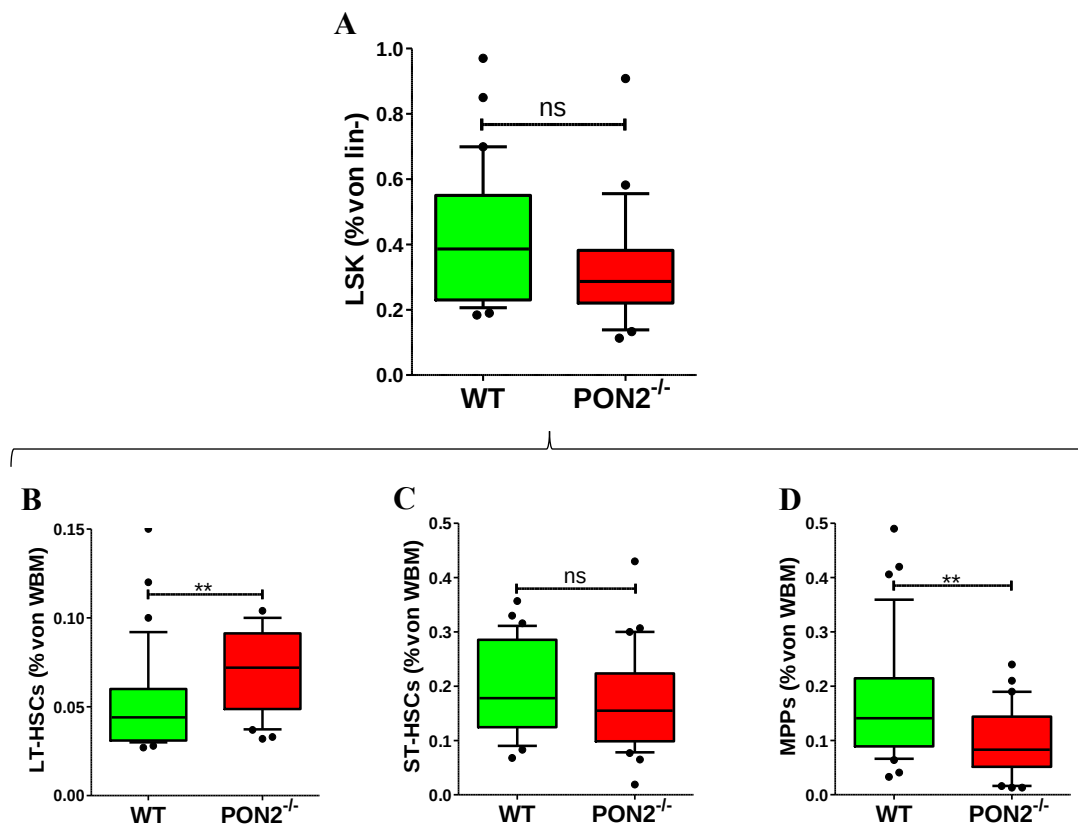


Abbildung 23: Befunde aus Analysen der Zellen innerhalb der LSK-Fraktion von Wildtyp- und PON2^{-/-}-Mäusen. Die Knochenmarkszellen von WT- und PON2^{-/-}-Mäusen wurden zunächst isoliert, anschließend mit zellspezifischen Oberflächenmarkern gefärbt und am FACSCantoTM II Durchflusszytometer analysiert. Die Graphen zeigen (A) die Größe der LSK-Fraktion innerhalb der *lineage*-negativen Population, sowie die prozentualen Mengen an (B) LT-, (C) ST-HSCs, und (D) MPPs, bezogen auf die Gesamtzahl an Knochenmarkszellen (WBM = *whole bone marrow*) aus jungen WT- und PON2^{-/-}-Tieren. Box-Diagramm. Median ± unteres/oberes Quartil mit 10/90 Wert; Ausreißer = Kreise; n = 24-29. ** p < 0,01; n.s. = nicht signifikant; T-Test.

Mit zunehmender Differenzierung verlieren die Zellen ihre Pluripotenz, und es entwickeln sich Vorläuferzellen, die im Verlauf ihrer weiteren Differenzierung auf bestimmte hämatopoetische Zelllinien determiniert sind. Aus diesem Grund bezeichnet man sie als linienspezifische Vorläuferzellen (Progenitorzellen). Unterschieden werden können sie anhand ihrer spezifischen Oberflächenantigene, mithilfe der in Tabelle 14 aufgeführten Antikörper. Innerhalb dieser Arbeit wurde der Hauptfokus auf die oligopotenten Vorläuferzellen der myeloischen Linie gelegt, zu denen die myeloischen Vorläuferzellen (CMPs, *common myeloid progenitors*) sowie die Megakaryozyten/Erythrozyten Vorläufer (MEPs, *megakaryocyte/erythroid progenitors*) und die Granulozyten/Makrophagen Vorläufer (GMPs, *granulocyte/macrophage progenitors*) zählen.

Die genaue *Gating*-Strategie zur Diskriminierung zwischen CMPs, GMPs und MEPs ist in Abbildung 24 dargestellt.

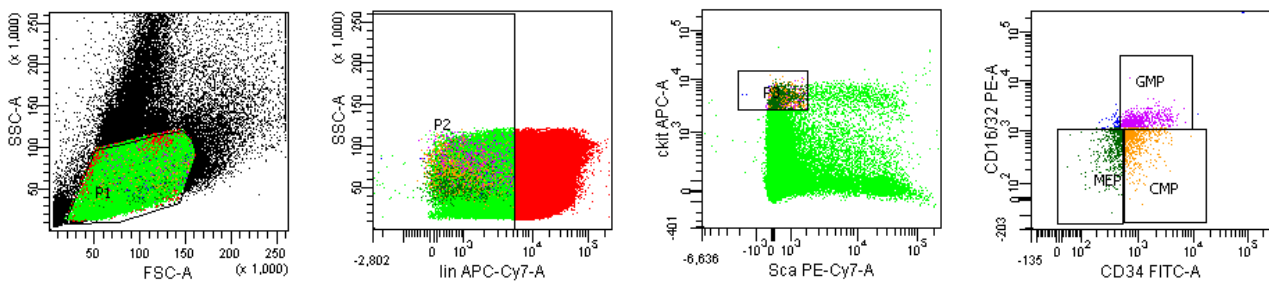


Abbildung 24: *Gating*-Strategie zur durchflusszytometrischen Unterscheidung zwischen den verschiedenen oligopotenten Vorläuferzellen innerhalb des Knochenmarks. Zu sehen sind repräsentative Punktdiagramme (*Dotplots*), erstellt mit der FACSDiva Software.

Der Grund für die Fokussierung der Studien auf die Vorläuferzellen der myeloischen Linie liegt in der Hypothese, dass PON2 an der Erhaltung des Redox-Gleichgewichts in Knochenmarkzellen beteiligt ist (siehe Abschnitt 2). Erhöhte Level an reaktiven Sauerstoffspezies, potenziell infolge einer PON2-Defizienz, sind wiederum dafür bekannt, die Differenzierung in myeloische Zellen begünstigen zu können¹⁵⁷.

In Abbildung 25 ist die Quantifizierung des prozentualen Anteils an CMPs, GMPs und MEPs innerhalb des Gesamtknochenmarks von PON2-defizienten und wildtypischen Mäusen dargestellt. Auffällig ist, dass die prozentuale Menge an CMPs (lin⁻, Sca1⁻, ckit⁺, CD16/32⁻, CD34⁺) in PON2^{-/-}-Tieren signifikant verringert war (siehe Abbildung 25 A), während die aus den CMPs differenzierenden MEPs (lin⁻, Sca1⁻, ckit⁺, CD16/32⁻, CD34⁻) und GMPs (lin⁻, Sca1⁻, ckit⁺, CD16/32⁺, CD34⁺) keine Änderungen der Zellzahl aufwiesen (siehe Abbildung 25 B und C).

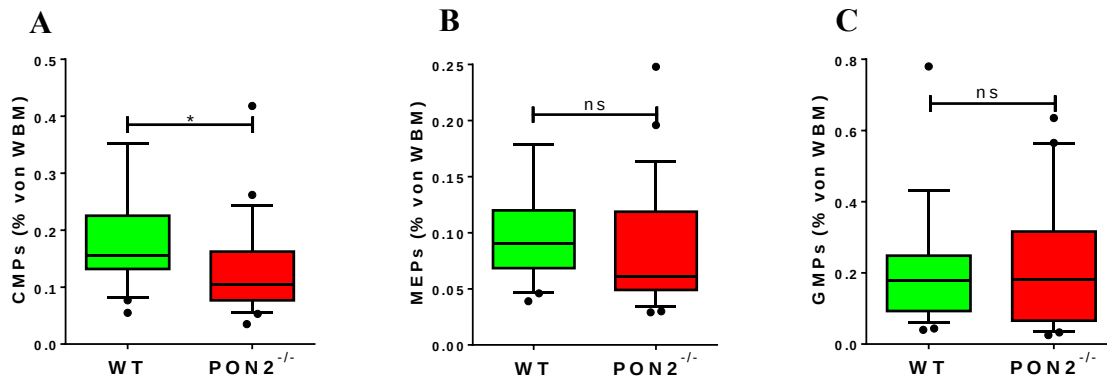


Abbildung 25: Befunde aus Analysen der oligopotenten Vorläuferzellen der myeloiden Linie. Die Knochenmarkszellen von WT- und $PON2^{-/-}$ -Mäusen wurden zunächst isoliert, anschließend mit zellspezifischen Oberflächenmarkern gefärbt und am FACSCanto™ II Durchflusszytometer analysiert. Die Graphen zeigen die prozentualen Mengen an (A) CMPs, (B) MEPs und (C) GMPs, bezogen auf die Gesamtzahl an Knochenmarkszellen (WBM = *whole bone marrow*) aus jungen WT- und $PON2^{-/-}$ -Tieren. Box-Diagramm. Median ± unteres/oberes Quartil mit 10/90 Wert; Ausreißer = Kreise; n = 24-29. * $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant; T-Test.

Zusätzlich zu den Stamm- und Vorläuferzellen des hämatopoetischen Systems wurden die *lineage*-positiven Zellen des Knochenmarks analysiert. Zu ihnen zählen die weiter ausdifferenzierten Zellen, wie beispielsweise die verschiedenen reifen Blutzellen oder deren direkte Vorläufer, die prozentual den größten Teil der Knochenmarkszellen ausmachen. Zur Unterscheidung der verschiedenen Zellen wurden die in 4.1.4 bzw. Tabelle 11 aufgeführten Zelltyp-spezifischen Oberflächenmarker in den Kombinationen angewendet, die bereits bei der Analyse der Zellen aus Milz und Thymus verwendet wurden (siehe Tabelle 12).

Wie in den zuvor beschriebenen Analysen der HSPCs wurde auch hier der prozentuale Anteil der jeweiligen Zellpopulation innerhalb des Gesamtknochenmarks ermittelt. Auffälligkeiten konnten dabei in der prozentualen Menge proliferierender Zellen festgestellt werden. Hier wiesen junge $PON2^{-/-}$ -Tiere im Vergleich zu Wildtypen signifikant verringerte Werte auf (siehe Abbildung 26 E). In den prozentualen Anteilen der übrigen analysierten Zellpopulationen wie T-Vorläuferzellen (siehe Abbildung 26 A), reifen Myelozyten (siehe Abbildung 26 B), frühen B-Zellen (siehe Abbildung 26 C) und Erythrozyten-Vorläufern (siehe Abbildung 26 D) waren keine Veränderungen sichtbar.

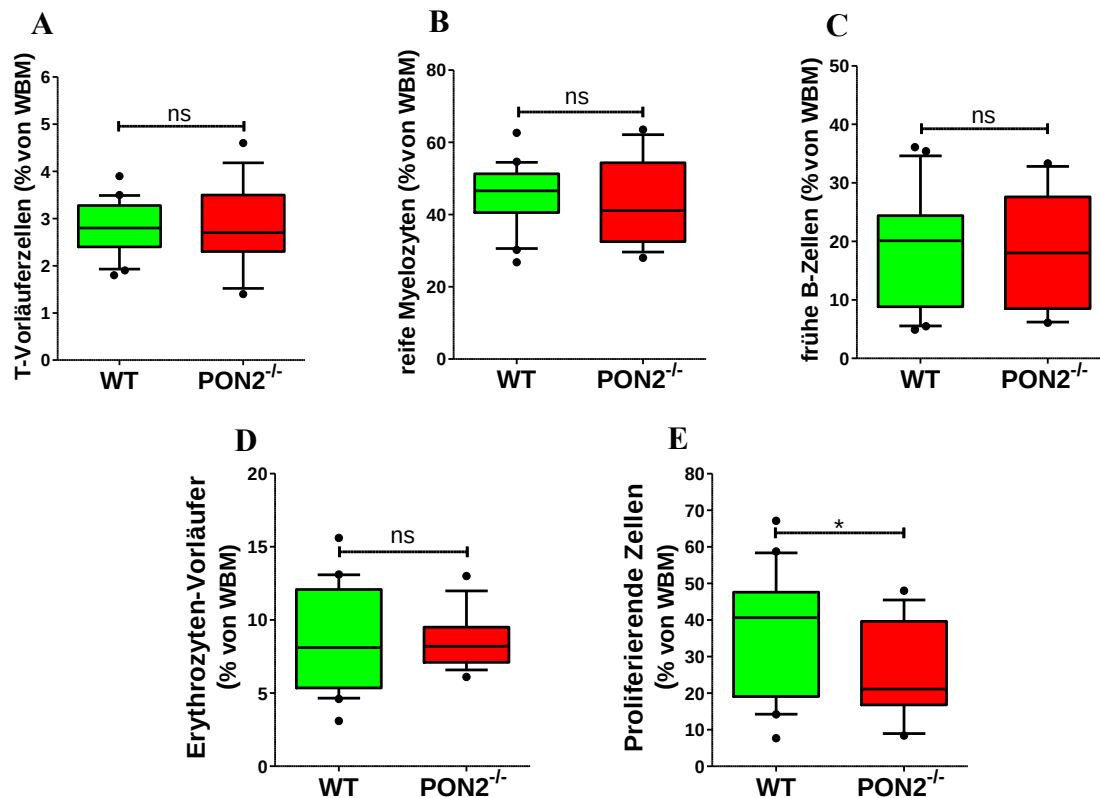


Abbildung 26: Befunde aus Analysen weiter ausgereifter Blutzellen innerhalb des Knochenmarks. Die Knochenmarkszellen von WT- und PON2^{-/-}-Mäusen wurden isoliert, mit zellspezifischen Oberflächenmarkern gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Die Graphen zeigen die prozentualen Mengen an (A) T-Lymphozyten, (B) reifen Myelozyten, (C) B-Zellen, (D) Erythrozyten-Vorläufern und (E) proliferierenden Zellen bezogen auf die Gesamtzahl an Knochenmarkszellen (WBM = *whole bone marrow*) aus jungen WT- und PON2^{-/-}-Tieren. Box-Diagramm. Median $\pm$ unteres/oberes Quartil mit 10/90 Wert; Ausreißer = Kreise; n = 15-19. * p<0,05; n.s.= nicht signifikant; T-Test.

5.3.1.2 Das Blutbild PON2-defizienter Mäuse zeigt quantitative und morphologische Veränderungen

Neben Auswirkungen auf die verschiedenen Subpopulationen innerhalb des Knochenmarks, wurde im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich die Rolle der PON2 im peripheren Blutsystem analysiert. Mit Ausnahme von Makrophagen ist die Funktion von PON2 in jeglichen peripheren Blutzellen bisher unbekannt. Die Analyse des Blutbildes wurde nach Blutentnahme mittels Herzpunktion oder Punktion des retrobulbären Venenplexus an einem Sysmex *Automated Hematology Analyzer* durchgeführt. Quantitativ ausgewertet wurde der *white blood cell count* (WBC), die Menge weißer Blutzellen, der *red blood cell count* (RBC), die Menge roter Blutzellen sowie der *platelet count* (PLT), die Menge der Blutplättchen. Neben dem RBC wurde zusätzlich der Hämatokrit (HCT)-Wert analysiert. Des Weiteren wurden das mittlere Einzelvolumen der Erythrozyten (MCV = *mean corpuscular volume*) und der Thrombozyten (MPV = *mean platelet volume*) sowie die Erythrozytenverteilungsbreite

(RDW = *red blood cell distribution width*), das Gesamt-Hämoglobin (Hb), das mittlere korpuskuläre Hämoglobin (MCH) und die mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC) ermittelt.

Zusammengefasst konnten innerhalb dieser Arbeit sowohl quantitative als auch morphologische Änderungen in peripheren Blutzellen PON2-defizienter Mäuse aufgedeckt werden. Von besonderer Relevanz waren dabei die gesteigerten Zellvolumina der Thrombozyten (siehe Abbildung 27 J) und der Erythrozyten (siehe Abbildung 27 E) im Blut von PON2^{-/-}-Tieren. Im Falle der Thrombozyten konnte außerdem eine Verringerung der Zellzahl festgestellt werden (siehe Abbildung 27 I), während die Anzahl der Leukozyten (siehe Abbildung 27 A) und Erythrozyten (siehe Abbildung 27 B) keine Auffälligkeiten aufwies. Dieses Ergebnis spiegelt sich auch im unveränderten Hämatokrit-Wert (siehe Abbildung 27 D) wider. Jedoch zeigten PON2^{-/-}-Mäuse signifikant erhöhte Hb- (siehe Abbildung 27 C), MCH- (siehe Abbildung 27 F) und MCHC- (siehe Abbildung 27 G) Werte, sowie eine signifikant verringerte Erythrozyten-verteilungsbreite (siehe Abbildung 27 H). Da das stark erhöhte Erythrozytenvolumen bei gesteigerter Hämoglobinmenge/Erythrozyt sowie das gesteigerte Thrombozytenvolumen bei verringertem *platelet count* (PLT) auf eine Störung der Erythropoese bzw. der Thrombopoese hindeuten könnte, sollte zu einem späteren Zeitpunkt sowohl der Erythrozyten- und Thrombozytenumsatz als auch die Bildung der Erythrozyten (Erythropoese) und Thrombozyten (Thrombopoese) analysiert werden (siehe 5.3.7).

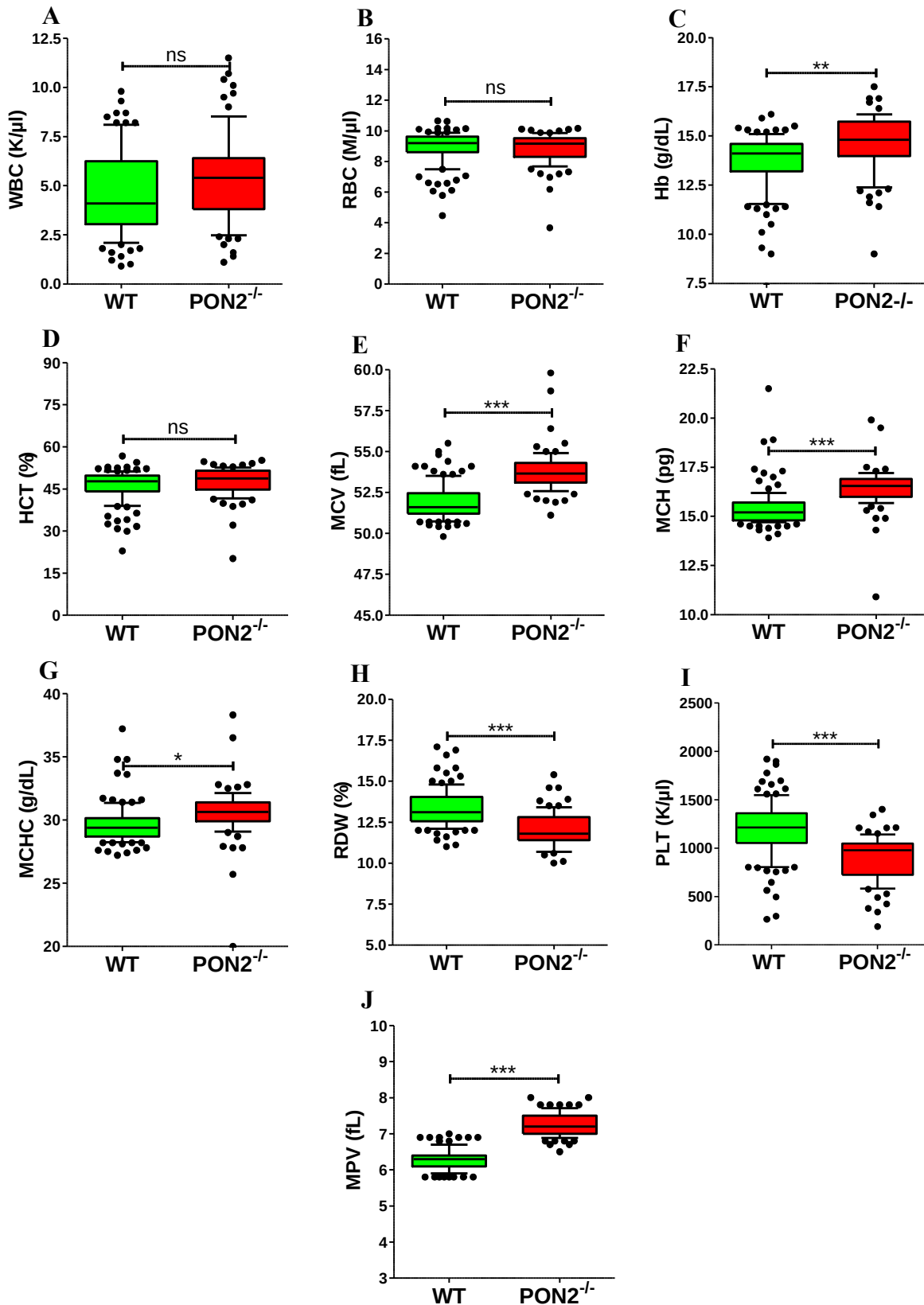


Abbildung 27: Befunde aus Analysen des Blutbildes junger $PON2^{-/-}$ -Mäuse verglichen mit gleichaltrigen Wildtypen. Dargestellt ist (A) die Anzahl der Leukozyten, (B) die Anzahl der Erythrozyten, (C) das Hämoglobin, (D) der prozentuale Hämatokrit-Wert, (E) das mittlere Erythrozytenvolumen, (F) das mittlere zelluläre Hämoglobin, (G) die mittlere zelluläre Hämoglobinkonzentration, (H) die Erythrozytenverteilungsbreite sowie (I) die Anzahl der Thrombozyten und (J) das Thrombozytenvolumen aus Blut von jungen Wildtyp- und $PON2^{-/-}$ -Mäusen. WBC = white blood cell count; RBC = red blood cell count; Hb = hemoglobin; HCT = hematocrit; MCV = mean corpuscular volume; MCH = mean cellular hemoglobin; MCHC = mean cellular hemoglobin concentration; RDW = red blood cell distribution width; PLT = platelet count; MPV = mean platelet volume. Box-Diagramm. Median $\pm$ unteres/oberes Quartil mit 10/90 Wert; Ausreißer = Kreise; n = 78-113. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; n.s.= nicht signifikant; T-Test.

5.3.1.2.1 Unveränderte myeloid/lymphoid-Verteilung in jungen $PON2^{-/-}$ -Mäusen

In Ergänzung zu den in 5.3.1.2 beschriebenen bzw. in Abbildung 27 dargestellten allgemeinen Blutanalysen wurde mithilfe des Differentialblutbildes, erstellt an einem HEMAVET-Gerät, das myeloid/lymphoid-Verhältnis der Blutzellen berechnet. Dabei setzt sich die lymphoid-Fraktion aus B-, T- und natürlichen Killerzellen zusammen, während sich die myeloid-Fraktion aus Monozyten sowie neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten zusammensetzt. Das Verhältnis zwischen myeloiden und lymphoiden Zellen im Blut dient als diagnostischer Marker für verschiedene Pathologien. Die normale myeloid/lymphoid-Verteilung liegt bei einem Verhältnis von etwa 1:3. Eine Steigerung des prozentualen Anteils lymphoider Zellen deutet beispielsweise auf Entzündungen hin und wurde in Studien außerdem mit einer schlechten Prognose in verschiedenen Krankheitsbildern assoziiert ¹⁵⁸.

Die durchgeführten Analysen des Blutes junger $PON2$ -defizienter Mäuse belegten, dass keine Verschiebung des myeloid/lymphoid-Verhältnisses im Vergleich zum Wildtyp vorliegt (siehe Abbildung 28).

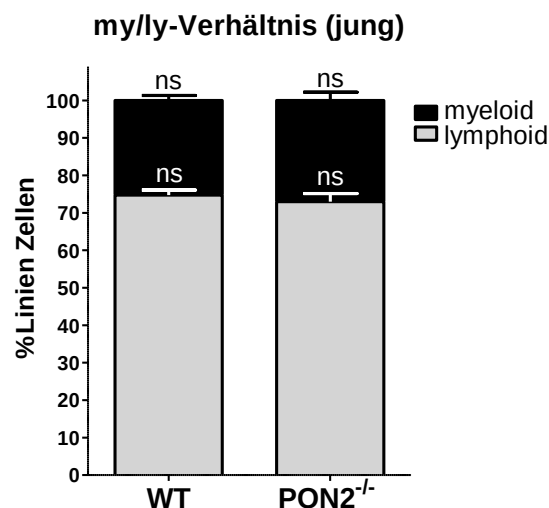


Abbildung 28: Unveränderte myeloid/lymphoid-Verteilung im Blut junger $PON2$ -defizienter Mäuse. Die beiden Säulen zeigen jeweils den prozentualen Anteil lymphoider (B-, T-, NK-Zellen) und myeloider (MO, NE, EO, BA) Leukozyten innerhalb des Blutes von 10-14 Wochen alten WT- und $PON2^{-/-}$ -Mäusen. $n = 16-25$; NK = *natural killer cells*, MO = Monozyten, NE = neutrophile Granulozyten, EO = eosinophile Granulozyten, BA = basophile Granulozyten. Mittelwert + SEM; n.s.= nicht signifikant; T-Test.

5.3.2 Reziproke Knochenmarktransplantation weist zellspezifische- sowie Mischeffekte nach

In Abschnitt 5.3.1 konnte nachgewiesen werden, dass eine PON2-Defizienz Auswirkungen auf die Quantität beziehungsweise Morphologie verschiedener Zellen des hämatopoetischen Systems hat. Für eine Differenzierung zwischen zellspezifischen und umgebungsvermittelten Effekten war es nötig, die Untersuchungen der Knochenmark-Subpopulationen sowie des Blutes an Knochenmark-transplantierten Chimären zu wiederholen.

Generiert wurden die Chimären durch die in Abschnitt 4.3.4.1 beschriebene reziproke Knochenmarktransplantation. Dafür wurden die Empfängertiere zunächst bestrahlt, bevor eine intravenöse Injektion der Spender-Knochenmarkzellen erfolgte. Je nach Genotyp des Empfängertieres bzw. der Spenderzellen entstanden sowohl Kontrolltiere als auch reziproke WT- bzw. PON2^{-/-}-Chimären (siehe Abbildung 11). Etwa drei Wochen nach der Transplantation wurden die beiden Kontrollgruppen, WT/WT (BM) und PON2^{-/-}/PON2^{-/-} (BM), sowie die beiden reziproken Gruppen, WT/PON2^{-/-} (BM) und PON2^{-/-}/WT (BM), parallel analysiert, um reine Transplantationseffekte von intrazellulären- bzw. Nischeneffekten unterscheiden zu können.

Zur Verifizierung des *Engraftments* und der damit verbundenen re-Initiierung der Hämatopoese durch die Spender-Knochenmarkzellen, wurden den Empfängertieren am Tag der Analyse Blutproben entnommen. Anschließend wurden die Blutzellen isoliert und die PON2-mRNA-Expression mittels qRT-PCR bestimmt. Als Referenz diente die Expression in WT/WT Kontrolltieren.

Die ermittelten, in Abbildung 29 graphisch dargestellten PON2-mRNA-Level entsprachen der erwarteten Wiederherstellung bzw. Deletion der PON2-Expression in den hämatopoetischen Zellen der Empfängertiere und bestätigten somit den Erfolg der Generierung von Chimären. Anschließend durchgeführte quantitative Analysen der Knochenmarkzellen sowie labormedizinische Analysen des Vollblutes dienten dazu, zellspezifische, Nischen- oder Mischeffekte aufzudecken.

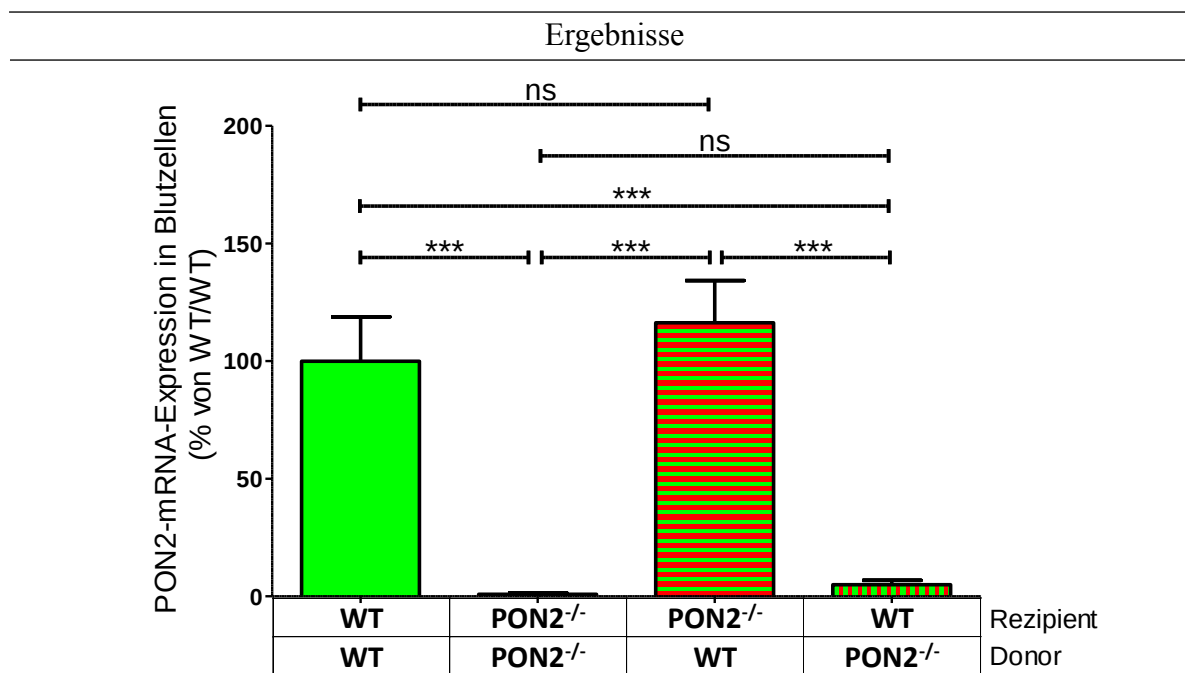


Abbildung 29: Überprüfung des *Engraftments* in Kontrolltieren und Knochenmark-transplantierten Chimären. Zur Verifizierung der Einnistung des Spenderknochenmarks in die Empfängertiere und der damit verbundenen re-Initiierung der Hämatopoese durch die Spenderzellen wurden qRT-PCR-Analysen durchgeführt. Dafür wurden allen Individuen der verschiedenen Versuchsgruppen 3 Wochen nach der Transplantation Vollblut-Proben entnommen. Anschließend wurden die im Vollblut befindlichen Blutzellen isoliert und der PON2-mRNA-Expressionslevel mittels qRT-PCR bestimmt. Die Expressions-raten wurden auf Gapdh und β -Actin normalisiert und sind im Graphen als % von WT/WT dargestellt; n = 10-13; Mittelwert + SEM. *** p<0,001; n.s., nicht signifikant; One-way ANOVA mit Bonferroni's multiple comparison test.

Die durchflusszytometrischen quantitativen Analysen der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen sowie der weiter ausdifferenzierten Zellen des Knochenmarks der WT- bzw. PON2^{-/-}-Chimären wiesen überwiegend zellspezifische sowie Mischeffekte auf. Reine Nischeneffekte konnten hingegen nicht nachgewiesen werden.

Im Einzelnen zeigten LT-HSCs deutliche zellspezifische Effekte, was daran zu erkennen war, dass die signifikant erhöhte Anzahl an Zellen in PON2^{-/-}-Kontrolltieren in den reziproken Chimären mit PON2^{-/-}-Knochenmark konserviert war (siehe Abbildung 30 A). Die Analysen der ST-HSCs ergaben genau wie in naiven Tieren (siehe Abbildung 23 C) keine Unterschiede zwischen PON2^{-/-} und WT, weshalb in diesem Fall keine Aussage über zellspezifische bzw. Nischeneffekte getroffen werden konnte (siehe Abbildung 30 B). In der prozentualen Anzahl der MPPs waren Transplantationseffekte erkennbar. In den in Abbildung 23 D dargestellten Analysen dieser Subpopulation in naiven PON2^{-/-}-Tieren wurde eine signifikante Verringerung der Zellzahl im Vergleich zum WT festgestellt, während die Messungen des prozentualen Anteils am Gesamtknochenmark der kontrolltransplantierten PON2^{-/-}-Tiere eine signifikante Steigerung im Vergleich zu kontrolltransplantierten Wildtypen ergaben. Ursache dafür könnte der durch die Transplantation auf die Zellen ausgeübte Stress sein. Im Gegensatz zu den Kontrolltieren wiesen die reziproken Chimären keine signifikanten Unterschiede auf, was auf einen Mischeffekt, also eine Kombination aus intrazellulären und umgebungs-vermittelten Effekten schließen lässt (siehe Abbildung 30 C). Gleiches traf auch auf die in

Abbildung 30 E dargestellte prozentuale Anzahl an MEPs zu. Auch hier waren in kontrolltransplantierten Tieren Transplantationseffekte erkennbar, die in reziproken Chimären nicht konserviert waren, was auf Mischeffekte hindeutete. Die Quantifizierung der CMPs im Gesamtknochenmark offenbarte ebenfalls Transplantationseffekte, da die prozentuale Anzahl an Zellen in den kontroll-transplantierten $PON2^{-/-}$ -Tieren im Gegensatz zu den WT-Kontrollen erhöht war, während in naiven Tieren das Gegenteil der Fall war. Im Kontrast zu den zuvor beschriebenen MPPs und MEPs war dieser Effekt jedoch auch in reziproken Chimären ausgeprägt, was einen zellspezifischen Effekt anzeigte (siehe Abbildung 30 D). In GMPs und T-Vorläuferzellen konnte hingegen wie in ST-HSCs keine Aussage über die potentielle Effektherkunft getroffen werden, da keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen detektiert werden konnten (siehe Abbildung 30 F & G). Reife Myelozyten, deren prozentualer Anteil im WBM von naiven $PON2^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu WT nicht verändert war, wiesen wie einige zuvor beschriebene Subpopulationen Transplantationseffekte auf. Ihre Anzahl war in kontrolltransplantierten $PON2^{-/-}$ -Tieren numerisch verringert, was dem Effekt in reziproken Chimären entsprach und dadurch wiederum eine Zellspezifität des Effektes vermuten lässt (siehe Abbildung 30 H). In frühen B-Zellen innerhalb des Knochenmarks der beiden Kontrollgruppen wurden, wie auch in nicht transplantierten Tieren, keine Abweichungen zwischen $PON2^{-/-}$ und WT festgestellt. Im Gegensatz dazu wiesen jedoch die beiden Chimären-Gruppen signifikante Divergenzen auf, was weder durch Misch- noch durch umgebungs-vermittelte Effekte erklärt werden konnte (siehe Abbildung 30 I). Der in Abbildung 30 J dargestellte prozentuale Anteil an Erythrozyten-Vorläufern im Gesamtknochenmark der Kontrolltiere wies erneut auf Transplantationseffekte hin, da die signifikante Verringerung der Zellzahl in $PON2^{-/-}$ -Kontrollen in naiven Tieren nicht erkennbar war. Die Chimären zeigen hingegen keine Manifestation dieses Effektes und sind damit ein weiteres Beispiel für sogenannte Mischeffekte. Die letzte betrachtete Zellgruppe, die Gesamtheit der proliferierenden Zellen, ließ keinen Rückschluss auf Effektherkunft zu, da genau wie in ST-HSCs, GMPs und T-Vorläuferzellen keine signifikanten Änderungen zwischen den Versuchsgruppen bestanden (siehe Abbildung 30 K). Dies war allerdings auf einen Transplantationseffekt zurückzuführen, da die prozentuale Menge proliferierender Zellen in naiven $PON2^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen signifikant verringert war (siehe Abbildung 26 E).

Insgesamt konnte aus diesen Daten die Erkenntnis gewonnen werden, dass die in Abschnitt 5.3.1.1 beschriebenen Effekte hauptsächlich auf zellspezifisches *signaling* zurückzuführen sind, die Nische aber auch einen Teilbeitrag leistet.

Ergebnisse

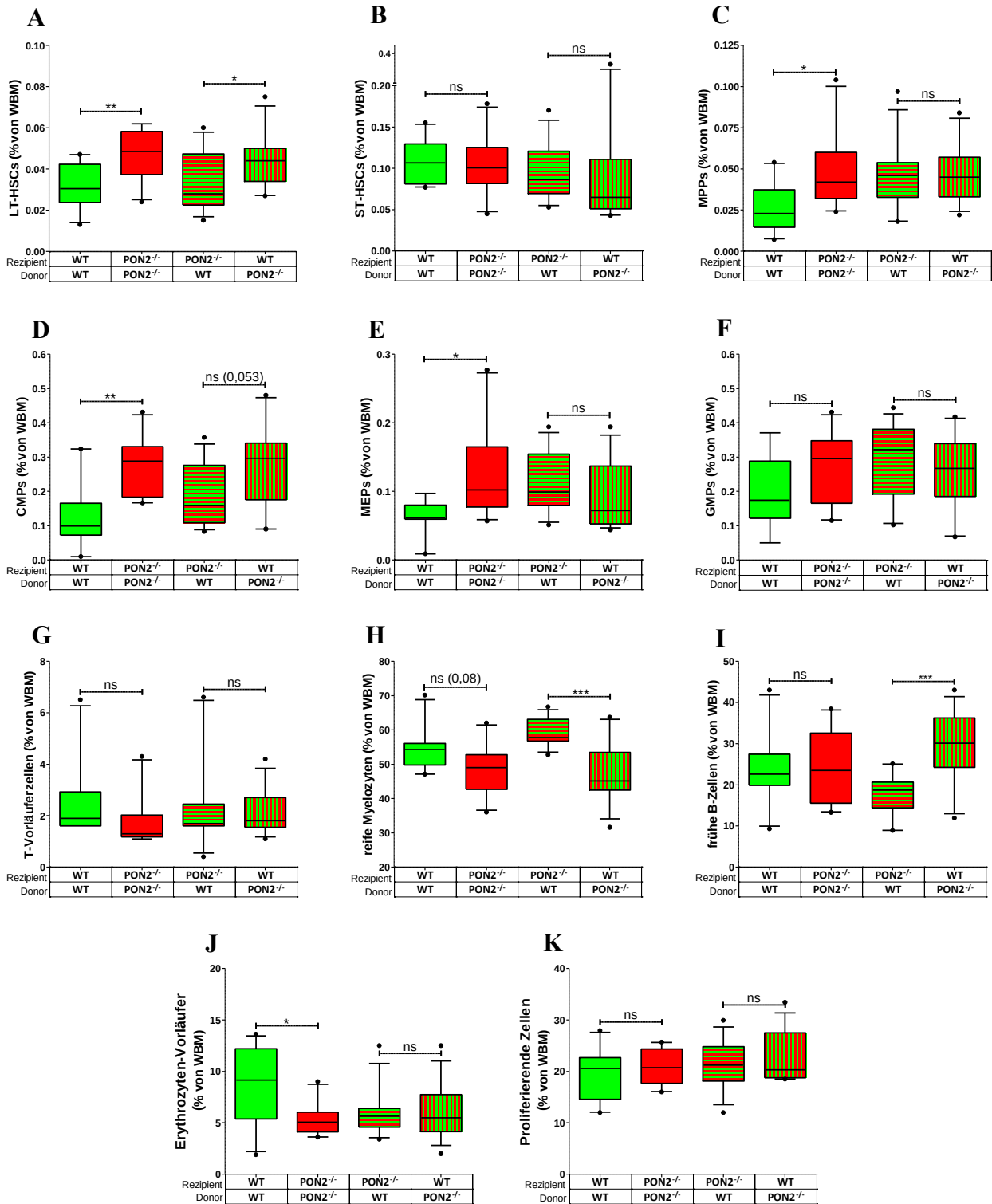


Abbildung 30: Befunde aus Analysen der Knochenmarkzellen von kontrolltransplantierten Tieren sowie Chimären. Drei Wochen nach der reziproken Transplantation wurden die Knochenmarkzellen der Empfängertiere isoliert, mittels Oberflächenmarkern gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Die Graphen zeigen den prozentualen Anteil der (A) LT-HSCs, (B) ST-HSCs, (C) MPPs, (D) CMPs, (E) MEPs, (F) GMPs, (G) T-Vorläuferzellen, (H) reifen Myelozyten, (I) frühen B-Zellen, (J) Erythrozyten-Vorläufer und (K) proliferierenden Zellen bezogen auf die Gesamtzahl an Knochenmarkszellen (WBM = *whole bone marrow*) aus Chimären und Kontroll-Mäusen. Box-Diagramm. Median $\pm$ unteres/oberes Quartil mit 10/90 Wert; Ausreißer = Kreise; n = 10-12. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; n.s.= nicht signifikant; T-Test.

Neben dem prozentualen Anteil der verschiedenen Subpopulationen innerhalb des Gesamtknochenmarks wurde auch das Blutbild der beiden Kontrollgruppen sowie der beiden reziproken Gruppen im Anschluss an die Knochenmarktransplantation analysiert. Aus Abbildung 31 ist zu ersehen, dass in diesen Untersuchungen zahlreiche Transplantationseffekte aufgedeckt werden konnten. Beispielsweise wurde in nicht transplantierten Tieren eine Steigerung des Zellvolumens der Erythrozyten um zwei Femtoliter (fl) (siehe Abbildung 27 E) sowie der Thrombozyten um einen Femtoliter (siehe Abbildung 27 J) festgestellt, die nach der Transplantation weder in den beiden Kontrollgruppen, noch in den reziproken Chimären nachweisbar war (siehe Abbildung 31 E und J). Ebenfalls auf Transplantationseffekte zurückzuführen war der um mehr als 10 % erhöhte Hämatokrit in kontrolltransplantierten Tieren (HTC; vergleiche Abbildung 27 D und Abbildung 31 D), die unveränderte mittlere zelluläre Hämoglobinkonzentration (MCHC; vergleiche Abbildung 27 G und Abbildung 31 G), die in nicht transplantierten Tieren um etwa 1 g/dL erhöht war, sowie die unveränderte Anzahl an Thrombozyten (PLT; vergleiche Abbildung 27 I und Abbildung 31 I), die in nicht transplantierten Tieren um ca. 250 K/dL verringert war. Andere Parameter wie beispielsweise die Anzahl der weißen (WBC) und der roten Blutzellen (RBC) blieben im Vergleich zu naiven Tieren unverändert (vergleiche Abbildung 27 A & B mit Abbildung 31 A & B). Insgesamt ließen sich vier Parameter, darunter das gesamt-Hämoglobin (Hb), der Hämatokrit, das mittlere zelluläre Hämoglobin (MCH) und die Erythrozytenverteilungsbreite (RDW), auf zellspezifische-, beziehungsweise Nischen- oder Mischeffekte zurückführen. Während sowohl der Hb- als auch der HCT- und der MCH-Wert Mischeffekte anzeigten, war der RDW-Wert der einzige in dieser Studie identifizierte Parameter, der auf einen rein umgebungsvermittelten Effekt hinwies (siehe Abbildung 31 C, D, F und H).

Zusammengefasst konnte durch die Blutanalysen im Anschluss an die reziproke Knochenmarktransplantation nachgewiesen werden, dass sowohl zellintrinsische als auch umgebungsvermittelte Faktoren bei der Manifestation der in Abbildung 27 beobachteten Effekte eine Rolle spielen.

Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die Erythrozyten einer Maus laut Putten und Croon eine Lebensdauer von etwa $40,7 \pm 1,9$ Tagen aufweisen ¹⁴⁷. Da der hier beschriebene reziproke Transplantationsversuch nach 3 Wochen, also 21 Tagen, mit der finalen Probenentnahme beendet wurde, ist nicht auszuschließen, dass ein kleiner Teil der im peripheren Blut befindlichen Erythrozyten noch von den HSCs des Empfängertieres abstammen anstatt derer des Spenders. Diese Tatsache könnte zumindest teilweise die beobachteten Diskrepanzen erklären.

Ergebnisse

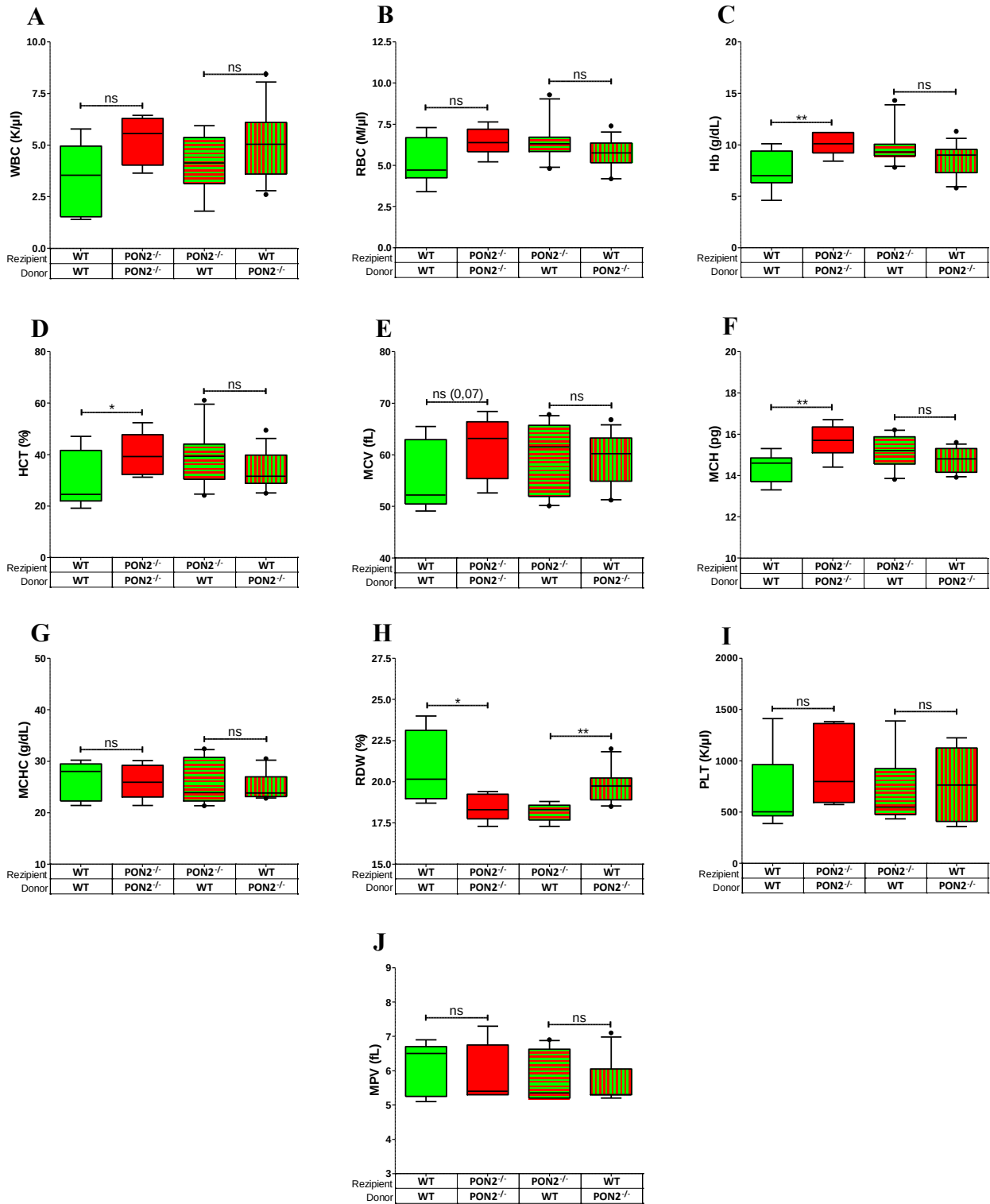


Abbildung 31: Befunde aus Analysen des Blutbildes der kontrolltransplantierten Tiere sowie der Chimären. Drei Wochen nach der reziproken Transplantation wurden den Empfängertiere Blutproben entnommen und an einem Sysmex-Gerät labormedizinisch untersucht. Dargestellt ist (A) die Anzahl der Leukozyten, (B) die Anzahl der Erythrozyten, (C) das Hämoglobin, (D) der prozentuale Hämatokrit-Wert, (E) das mittlere Erythrozytenvolumen, (F) das mittlere zelluläre Hämoglobin, (G) die mittlere zelluläre Hämoglobinkonzentration, (H) die Erythrozytenverteilungsbreite sowie (I) die Anzahl der Thrombozyten und (J) das Thrombozytenvolumen aus Blut von Chimären und Kontroll-Mäusen. WBC = *white blood cell count*; RBC = *red blood cell count*; Hb = *hemoglobin*; HCT = *hematocrit*; MCV = *mean corpuscular volume*; MCH = *mean cellular hemoglobin*; MCHC = *mean cellular hemoglobin concentration*; RDW = *red blood cell distribution width*; PLT = *platelet count*; MPV = *mean platelet volume*. Box-Diagramm. Median $\pm$ unteres/oberes Quartil mit 10/90 Wert; Ausreißer = Kreise; n = 4-13. * p<0,05; ** p<0,01; n.s.= nicht signifikant; T-Test.

5.3.3 PON2-Defizienz verursacht oxidativen Stress

Nachdem in Abschnitt 5.3.2 nachgewiesen werden konnte, dass die in PON2-defizienten Tieren manifestierten Effekte hauptsächlich zellspezifische- sowie Mischeffekte darstellen, wurden im weiteren Verlauf der Studien verschiedene Analysen auf zellspezifischem Level durchgeführt. Dazu zählten unter anderem die Validierungen des zellulären ROS-Levels.

Wie bereits in 1.1.1 angesprochen, haben verschiedene Studien in der Vergangenheit gezeigt, dass PON2 im endoplasmatischen Retikulum und in Mitochondrien lokalisiert ist und dort die Produktion von Superoxid inhibiert ²¹. Im Umkehrschluss führt eine PON2-Defizienz zu einer gesteigerten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, was erst kürzlich von Ebert et al. an Endothelzellen aus PON2^{-/-}-Mäusen gezeigt werden konnte ³¹. Da ROS unter anderem Proliferation, Differenzierung und Apoptose von HSCs stimuliert, stützt die vorliegende Arbeit auf der Hypothese, dass die anti-oxidative Funktion der PON2 bei der Regulation der Blutbildung eine wichtige Rolle spielt (siehe Abschnitt 2). Zur Prüfung dieser Hypothese wurde zunächst der zelluläre Level an reaktiven Sauerstoffspezies in Knochenmarkzellen bestimmt. Um den basalen ROS-Level unter möglichst geringem Stresslevel analysieren zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei unterschiedliche, sehr sensitive Methoden der ROS-Bestimmung angewendet. Einerseits wurde der gesamt-ROS-Gehalt innerhalb der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen mittels CM-H₂DCFDA-Färbung durchflusszytometrisch untersucht (siehe 4.1.5), und andererseits wurde speziell der Superoxid-Gehalt in WBMCs (*whole bone marrow cells*) mithilfe des Luminol-Derivats L-012 mittels Chemilumineszenz-Signalen quantifiziert (siehe 4.1.6).

5.3.3.1 PON2 Defizienz führt zu einem gesteigerten ROS-Level in Knochenmarkzellen

Um den gesamt-ROS-Level in HSPCs analysieren zu können, wurden die frisch isolierten Zellen mittels Oberflächenmarkern gefärbt, bevor die Inkubation mit dem ROS-Indikator CM-H₂DCFDA durchgeführt werden konnte (siehe 4.1.5). Der Farbstoff CM-H₂DCFDA ist FACS-kompatibel und fluoresziert nach Reaktion mit O₂*-, H₂O₂, OH*, oder ONOO-. Als Indikation der Änderung des ROS-Levels dient die Änderung der Fluoreszenzintensität des Farbstoffs. Dabei weist eine Steigerung der Fluoreszenzintensität in den gefärbten Zellen auf einen erhöhten ROS-Gehalt hin (siehe Abbildung 32 A und B).

Die Quantifizierung des Fluoreszenzsignals offenbarte einen signifikant gesteigerten ROS-Level in ST-HSCs aus $PON2^{-/-}$ -Tieren im Vergleich zu WT-Tieren. Außerdem konnte eine numerische Steigerung des ROS-Levels in MPPs beobachtet werden (siehe Abbildung 32 C).

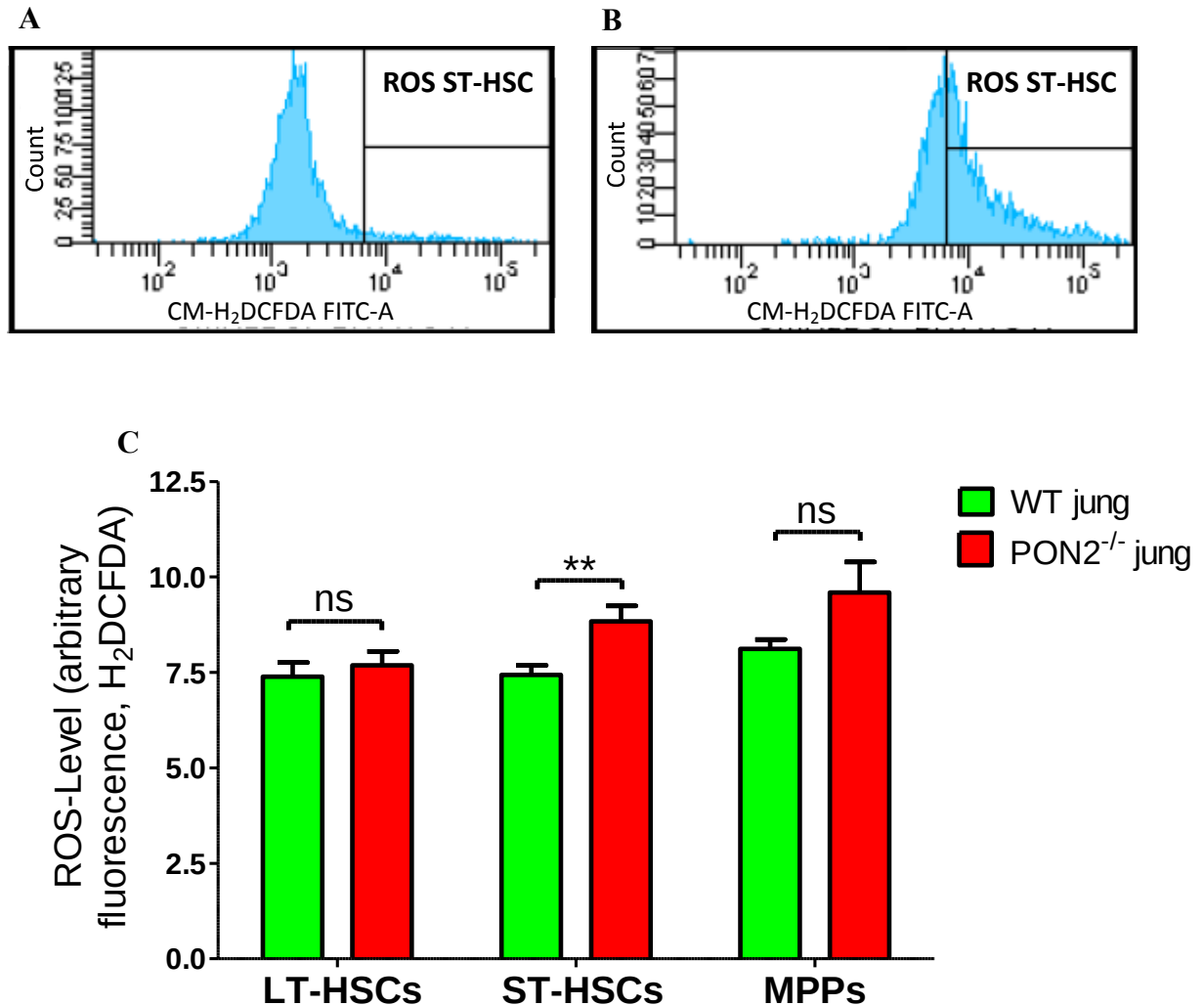


Abbildung 32: Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen aus jungen $PON2^{-/-}$ -Mäusen weisen gesteigerte basale ROS-Level auf. Die verschiedenen Subpopulationen der LSK-Fraktion des Knochenmarks, LT-, ST-HSCs und MPPs, wurden mit zellspezifischen Oberflächenmarkern sowie CM-H₂DCFDA gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dabei wurde die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes nach der Reaktion mit ROS detektiert. (A) Repräsentatives Beispiel des CM-H₂DCFDA Fluoreszenzsignals in ST-HSCs aus (A) WT- und (B) $PON2^{-/-}$ -Mäusen. (C) Quantifizierung der H₂DCFDA-Fluoreszenzintensität in HSPCs. n = 12-13, Mittelwert + SEM. ** p<0,01; n.s.= nicht signifikant; T-Test.

Betrachtet man den gesamt-ROS-Level in HSPCs (siehe Abbildung 32) und den $PON2$ -mRNA-Expressionslevel in LT-, ST-HSCs und MPPs (siehe Abbildung 21) im direkten Vergleich, so fällt auf, dass zwischen dem ROS-Level und dem $PON2$ -Expressionslevel keine Korrelation zu bestehen scheint.

5.3.3.2 Gesteigerter Superoxid-Level im Gesamtknochenmark von PON2^{-/-}-Mäusen

Da frühere Studien eine spezifische Inhibierung der O₂*-Produktion durch PON2 belegten ²¹, sollte in Ergänzung zum gesamt-ROS-Gehalt auch speziell der O₂*-Gehalt im Gesamtknochenmark ermittelt werden. Dafür wurden frisch isolierte Zellen mit dem Indikator L-012 versetzt, der durch die Reaktion mit Superoxid bzw. ROS zur Chemilumineszenz angeregt wird (siehe auch 4.1.6). Einige Zellen wurden zusätzlich mit dem Redox-Zyklus-Reagens DMNQ behandelt, das intrazellulär die Bildung von Superoxid induziert.

Die Analysen des anhand des Chemilumineszenzsignals gemessenen Superoxid-Gehaltes über die Zeit ergaben einen signifikant erhöhten Superoxid-Level in Knochenmarkzellen von PON2^{-/-}-Mäusen gegenüber der WT-Kontrolle (siehe Abbildung 33 A). Die Behandlung der Zellen mit DMNQ zur Induktion der intrazellulären Superoxid-Produktion bewirkte eine Angleichung des Superoxid-Levels in WT-Zellen an jenes in PON2-defizienten Zellen, da die PON2^{-/-}- im Gegensatz zu den WT-Zellen keine Steigerung der Superoxid-Produktion vorwiesen, wodurch der in unbehandelten Zellen eruierte Unterschied behoben wurde (siehe Abbildung 33 B).

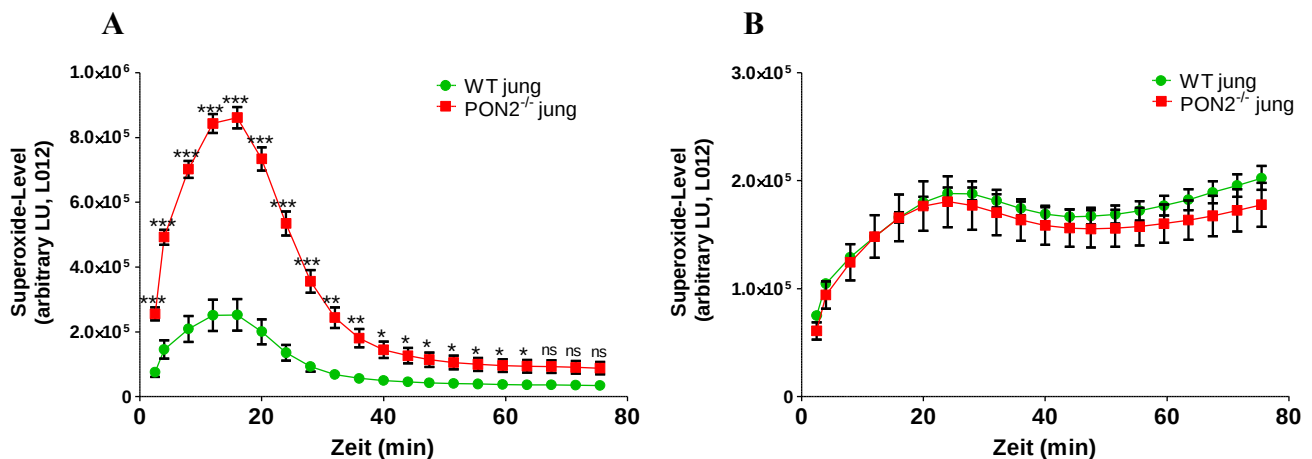


Abbildung 33: Differentieller Superoxid-Level in WT- und PON2^{-/-}-Knochenmarkzellen. (A) Frisch isolierte Knochenmarkzellen von PON2^{-/-}- und WT-Mäusen wurden mit L-012 versetzt um den Superoxid-Gehalt anhand der L-012-Chemilumineszenz über die Zeit zu messen. (B) Chemilumineszenzsignal nach Inkubation der Zellen mit L-012 und anschließender Behandlung mit DMNQ. Die beiden Graphen zeigen jeweils ein repräsentatives Beispiel von 5 unabhängig durchgeführten Messungen mit jeweils 2-4 Mäusen pro Gruppe. Mittelwert ± SEM; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; n.s.= nicht signifikant; T-Test.

5.3.4 Oxidativer Stress bewirkt weder DNA-Schädigung noch Induktion der Apoptose in HSPCs aus PON2^{-/-}-Mäusen

5.3.4.1 Keine Korrelation von DNA-Schädigung und erhöhtem ROS-Level in PON2-defizienten LSK-Zellen

Wie in den Abschnitten 5.3.3.1 und 5.3.3.2 beschrieben bzw. in den Abbildung 32 und Abbildung 33 grafisch dargestellt wurde, wiesen PON2-defiziente Knochenmarkszellen im Gegensatz zum Wildtyp signifikant gesteigerte ROS- bzw. Superoxid-Level auf. Aufgrund der Tatsache, dass stark erhöhte Level an reaktiven Sauerstoffspezies zu Schäden an Proteinen, Membranen und der DNA führen⁵⁰, wurde innerhalb der Studie eine vergleichende Analyse von DNA-Doppel-strangbrüchen in LSK-Zellen aus PON2^{-/-}- und WT-Tieren vorgenommen. Dafür wurde das Gesamtknochenmark der Mäuse zunächst frisch isoliert oder kryokonserviertes Knochenmark aufgetaut (siehe 4.1.1 und 4.1.3), bevor die Zellen der LSK-Fraktion mittels Oberflächenmarkern angefärbt wurden (siehe 4.1.4). Im Anschluss erfolgte eine Fixierung und Permeabilisierung der Zellen, um dem Fluorochrom-gekoppelten Antikörper gamma-H2A.X, der als Biomarker für DNA-Doppelstrangbrüche dient¹⁴⁰, das Eindringen in die Zellen zu ermöglichen (siehe 4.1.9).

Das Ergebnis der durchflusszytometrischen Analyse der gefärbten LSK-Zellen des jeweiligen Genotyps wird in Abbildung 34 graphisch dargestellt.

Die Überlagerung der beiden Histogramme (WT = grün; PON2^{-/-} = rot) verdeutlicht, dass es in den Zellen der LSK-Fraktion aus PON2-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtypen, trotz des gesteigerten ROS- bzw. Superoxid-Levels, zu keiner Steigerung der Menge an DNA-Doppelstrangbrüchen gekommen ist.

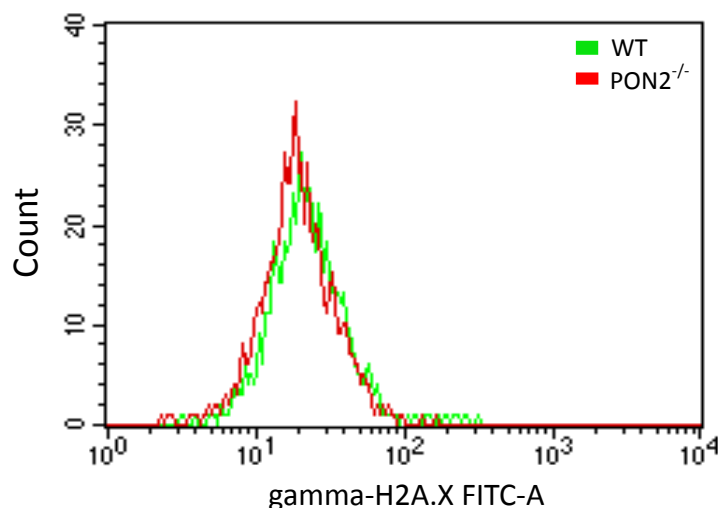


Abbildung 34: Histogramm des gamma-H2A.X Fluoreszenzsignals zur Analyse von DNA-Doppelstrangbrüchen in LSK-Zellen. Im Anschluss an die Messung der gefärbten LSK-Zellen aus PON2^{-/-}- und WT-Mäusen an einem FACSCanto™ II-Durchflusszytometer erfolgte die Auswertung der Daten mithilfe der FACSDiva Software. Dabei wurde ein Histogramm der Zellzahl gegen die γ -H2A.X Phospho-Signalintensität erstellt. Um die Ergebnisse der Messungen von PON2^{-/-}- und WT-Knochenmarkzellen besser vergleichen zu können, wurde anschließend mithilfe der CellQuest Pro Software (BD) ein *Overlay* von jeweils 2 Histogrammen erstellt. Repräsentatives Beispiel von 5 unabhängigen Analysen. n = 9-10.

5.3.4.2 PON2-Mangel bewirkt keine Steigerung der Apoptose-Raten in HSCs

Erst 2010 wurde von Altenhöfer et al. der anti-oxidative Mechanismus der PON2 aufgedeckt, welche über eine Bindung an Coenzym-Q10 in der inneren Mitochondrienmembran die Bildung von Superoxid ($O_2^{\bullet-}$) verhindert ²¹. Aufgrund der Tatsache, dass die mitochondriale ROS-Produktion die Cytochrom C-Freisetzung reguliert, fungiert sie auch als Regulator der Apoptose (siehe auch 1.1.1 bzw. Abbildung 4) ³². Angesichts der in 5.3.3.1 und 5.3.3.2 beschriebenen Steigerung des gesamt-ROS- beziehungsweise Superoxid-Levels in HSPCs und WBCs, wurde im Rahmen dieser Arbeit die prozentuale Apoptoserate in HSCs mithilfe von Annexin V-Färbungen am Durchflusszytometer quantifiziert.

Dafür wurden die frisch isolierten oder nach Kryokonservierung aufgetauten Knochenmarkzellen zunächst mit zellspezifischen Oberflächenmarkern angefärbt (siehe 4.1.4), bevor die Inkubation mit dem Apoptose-Marker Annexin V erfolgen konnte. Annexin V detektiert dabei Phosphatidylserin (PS), das bei apoptotischen Zellen, im Gegensatz zu gesunden Zellen, auf der Zelloberfläche lokalisiert ist (siehe 4.1.7). Diese Externalisierung des PS leitet als sogenanntes „eat-me“-Signal die Phagocytose apoptotischer Zellen mittels Makrophagen ein

137

Die Analysen an WT- und PON2^{-/-}-Knochenmarkzellen ergaben eine signifikante Verringerung in der prozentualen Anzahl apoptotischer LT-HSCs, jedoch nicht in der Anzahl apoptotischer ST-HSCs (siehe Abbildung 35 A und B). Der Unterschied zwischen der Apoptoserate in WT und PON2^{-/-}-LT-HSCs belief sich dabei auf etwa 4 %. Dieses Resultat ist eine mögliche Erklärung für die in Abschnitt 5.3.1.1 beschriebene und in Abbildung 23 graphisch dargestellte prozentuale Steigerung der LT-HSCs innerhalb des Knochenmarks PON2-defizienter Mäuse.

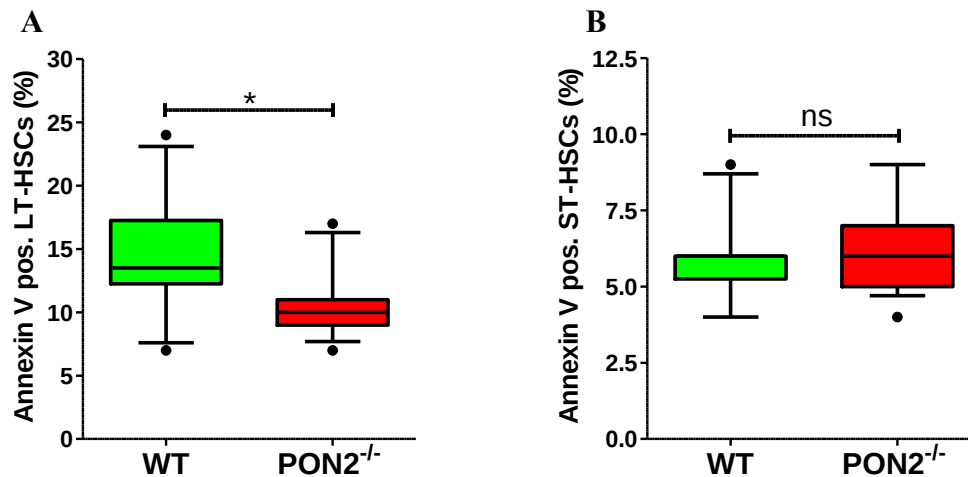


Abbildung 35: Signifikant verringerte Apoptoserate in LT-HSCs PON2-defizienter Mäuse. Prozentuale Anzahl Annexin V positiver (A) LT-HSCs und (B) ST-HSCs von jungen WT- und PON2^{-/-}-Mäusen. Box-Diagramm. Median ± unteres/oberes Quartil mit 10/90 Wert; Ausreißer = Kreise; n = 12-16. * p<0,05; n.s.= nicht signifikant; T-Test.

5.3.5 Orale Applikation von NAC führt zu einer Verminderung bzw. Aufhebung verschiedener Modifikationen im hämatopoetischen System PON2-defizienter Mäuse

Die in den Abschnitten 5.3.1 bis 5.3.4 aufgeführten Analysen bilden einen potentiellen Bezug zwischen der Quantität bzw. der Morphologie der verschiedenen hämatopoetischen Zellpopulationen und dem intrazellulären Level reaktiver Sauerstoffspezies sowie der Apoptoserate der Stamm- und Vorläuferzellen. Um eruieren zu können, ob die beobachteten Effekte auf den veränderten ROS-Level zurückzuführen sind oder ob es sich um „direkte“ Effekte des Proteins PON2 handelt, wurden innerhalb dieses Projektes PON2^{-/-}-Mäuse mit Antioxidantien behandelt und maßgebliche Analysen wiederholt.

Die Behandlung PON2-defizienter Mäuse erfolgte oral mit dem Antioxidant N-Acetylcystein (abgekürzt NAC) und diente speziell der Unterscheidung ROS-abhängiger versus anderer PON2-vermittelter Effekte im Knochenmark und Blut der Tiere. Für unsere Studien wurden die PON2^{-/-}-Tiere beginnend in der pränatalen Phase (durch Behandlung der Mütter) und nach der Geburt bis hin zur Analyse der hämatopoetischen Zellen im Alter von 10-14 Wochen kontinuierlich mit zunächst 7 mg/ml, im späteren Versuchsaufbau 10 mg/ml NAC versorgt (siehe 4.3.3).

Studien dieser Art wurden in der Vergangenheit beispielsweise in *knock-out* Mäusen von ATM und FoxOs erfolgreich durchgeführt¹⁵⁹.

5.3.5.1 HSPCs NAC-behandelter $PON2^{-/-}$ -Tiere weisen leicht verringerte ROS-Level auf

Nach der Behandlung der $PON2$ -defizienten Mäuse mit NAC, wurden die in 5.3.3.1 beschriebenen Analysen des ROS-Levels in HSPCs mithilfe des Indikators CM- H_2 DCFDA durchgeführt. Dabei wurde die CM- H_2 DCFDA-Signalintensität der Zellen aus behandelten $PON2^{-/-}$ -Tieren mit den Zellen unbehandelter $PON2^{-/-}$ - sowie Wildtyp-Mäuse verglichen.

Wie in Abbildung 36 graphisch dargestellt, wurde durch die Behandlung der in $PON2^{-/-}$ -ST-HSCs und MPPs festgestellte Anstieg der ROS-Produktion aufgehoben. Allerdings wiesen die Messungen des Fluoreszenzsignals der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen aus NAC behandelten $PON2^{-/-}$ -Tieren große Schwankungen auf, wodurch eine numerische, jedoch keine signifikante Steigerung des ROS-Levels im Vergleich zum Wildtyp und Verringerung im Vergleich zu unbehandelten $PON2^{-/-}$ -Tieren detektiert werden konnte.

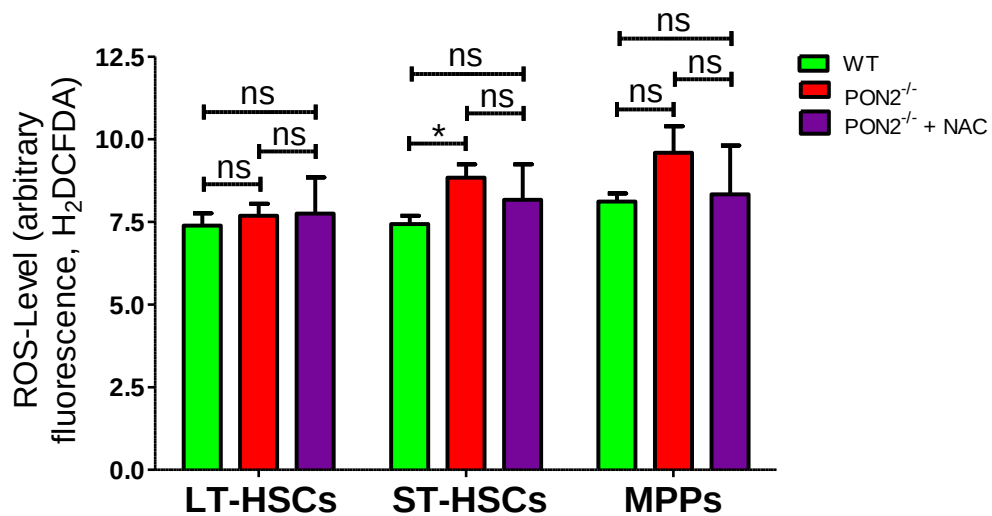


Abbildung 36: Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen NAC-behandelter $PON2^{-/-}$ -Mäuse weisen verringerte basale ROS-Level auf. Die verschiedenen Subpopulationen der LSK-Fraktion des Knochenmarks, LT-, ST-HSCs und MPPs, wurden mit zellspezifischen Oberflächenmarkern sowie CM- H_2 DCFDA gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dabei wurde die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes nach der Reaktion mit ROS detektiert. Das Säulendiagramm zeigt die Quantifizierung der H_2 DCFDA-Fluoreszenzintensität in HSPCs. $n = 7-13$, Mittelwert $\pm$ SEM. * $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant; One-way ANOVA mit Fisher's LSD-Test.

5.3.5.2 Verringerung des ROS-Levels führt zu einer Verminderung bzw. Aufhebung mancher Effekte in Knochenmarkszellen sowie zum Auftreten neuer Effekte

Im Anschluss an die Bestimmung des intrazellulären ROS-Gehaltes wurden die in 5.3.1.1 beschriebenen quantitativen Analysen der Zellen des Knochenmarks durchgeführt. Wie in Abbildung 37 zu erkennen ist, wurden während der Untersuchungen verschiedenste Effekte bei den NAC behandelten Tieren festgestellt. In einem Fall wurde der in unbehandelten $PON2^{-/-}$ -Tieren auftretende Effekt im Vergleich zum Wildtyp durch die kontinuierliche Antioxidant-Versorgung aufgehoben. Hierbei handelte es sich um die signifikant gesteigerte Anzahl der LT-HSCs in $PON2^{-/-}$ -Tieren, die in behandelten Individuen nicht mehr detektiert werden konnte (siehe Abbildung 37 A). Im Fall der CMPs kam es zu einer Annäherung der Messwerte aus NAC behandelten Tieren an den Wildtyp, wodurch der statistisch signifikante Unterschied, der in unbehandelten $PON2^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zum Wildtyp aufgedeckt wurde, lediglich numerisch festgestellt werden konnte. Die Annäherung war jedoch gering, wodurch kein signifikanter Unterschied zur Gruppe der unbehandelten $PON2^{-/-}$ -Tiere bestand (siehe Abbildung 37 D). Abgesehen von den LT-HSCs und den CMPs erlaubten die meisten der durchflusszytometrischen Analysen keine Aussage über die Kausalität von ROS. Sowohl in ST-HSCs, MPPs, MEPs, GMPs, reifen Myelozyten als auch in proliferierenden Zellen lagen keine quantitativen Änderungen der Zellzahl im Knochenmark aus WT-, $PON2^{-/-}$ - und NAC behandelten $PON2^{-/-}$ -Mäusen vor (siehe Abbildung 37 B, C, E, F, G und K). In frühen B-Zellen, T-Vorläuferzellen und Erythrozyten-Vorläuferzellen kam es durch die NAC-Applikation hin-gegen zum Auftreten neuer Effekte, die weder in unbehandelten *knock-outs* noch in Wildtypen festgestellt wurden und demnach reine Nebenerscheinungen der Behandlung darstellten. Zu jenen Nebenerscheinungen zählten die Verringerung der Anzahl früher B-Zellen im Knochenmark NAC-behandelter $PON2^{-/-}$ -Tiere im Vergleich zum Wildtyp (siehe Abbildung 37 H) und die Verringerung der prozentualen Menge an T-Vorläuferzellen (siehe Abbildung 37 I) sowie Erythrozyten-Vorläuferzellen NAC-behandelter Tiere im Vergleich zum Wildtyp und zu unbehandelten $PON2^{-/-}$ -Tieren (siehe Abbildung 37 J).

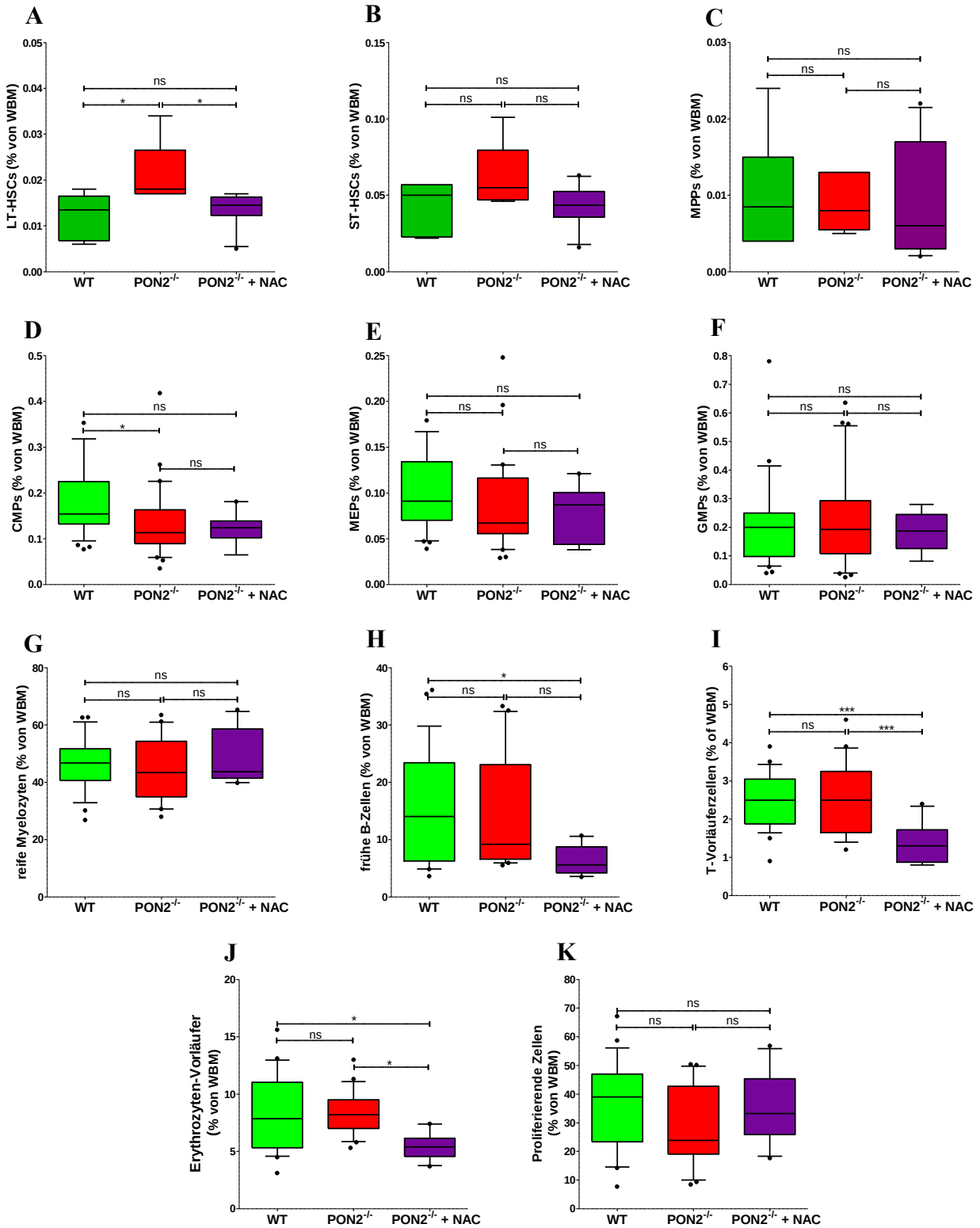


Abbildung 37: Befunde aus Analysen der Knochenmarkzellen NAC behandelter PON2^{-/-}-Tiere im Vergleich zu unbehandelten WT- und PON2^{-/-}-Mäusen. Aus Wildtypen, unbehandelten PON2^{-/-}- und NAC behandelten PON2^{-/-}-Tieren wurden Knochenmarkzellen isoliert, mittels Oberflächenmarkern gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Die Graphen zeigen den prozentualen Anteil der (A) LT-HSCs, (B) ST-HSCs, (C) MPPs, (D) CMPs, (E) MEPs, (F) GMPs, (G) reifen Myelozyten, (H) frühen B-Zellen, (I) T-Vorläuferzellen, (J) Erythrozyten-Vorläufer und (K) proliferierenden Zellen, bezogen auf die Gesamtzahl an Knochenmarkszellen (WBM = *whole bone marrow*). Box-Diagramm. Median $\pm$ unteres/oberes Quartil mit 10/90 Wert; Ausreißer = Kreise; n = 5-26. * p < 0,05; *** p < 0,001; n.s. = nicht signifikant; One-way ANOVA.

5.3.5.3 Senkung des ROS-Levels führt zu Veränderungen des Blutbildes

Neben den Analysen der Knochenmarkzellen wurden die in Abschnitt 5.3.1.2 beschriebenen Analysen des Blutbildes durchgeführt. Wie in 5.3.5.2 in Knochenmarkzellen eruiert, konnten auch durch die labormedizinischen Analysen des Blutes verschiedenste Folgen der NAC-Behandlung aufgedeckt werden. Im Fall des Gesamt-Hämoglobins (Hb), kam es durch die dauerhafte orale Applikation des Antioxidans zu einer Verstärkung der in unbehandelten PON2^{-/-}-Tieren beobachteten Steigerung des Hb-Wertes (siehe Abbildung 38 C). Bei der Analyse der mittleren zellulären Hämoglobinkonzentration (MCHC) und des mittleren Thrombozyten-volumens (MPV), konnte hingegen eine Annäherung der Messwerte an die Normwerte in Wildtyp-Tieren festgestellt werden (siehe Abbildung 38 G und J). Des Weiteren konnte die Analyse der Anzahl weißer (WBC) und roter Blutzellen (RBC) sowie des prozentualen Hämatokrit-Wertes (HCT) das Auftreten neuer Effekte belegen, die auf PON2- und ROS-unabhängige Effekte der N-Acetylcystein-Behandlung hindeuteten (siehe Abbildung 38 A, B, D). Bei der Analyse des mittleren Erythrozytenvolumens (MCV), des mittleren zellulären Hämoglobins (MCH), der Erythrozytenverteilungsbreite (RDW) sowie der Anzahl an Thrombozyten (PLT) konnte im Gegensatz zu den zuvor genannten Parametern keine Steigerung bzw. Verminderung der in PON2^{-/-}-Tieren in Vergleich zum Wildtyp beobachteten Effekte durch die Senkung des ROS-Levels mithilfe von NAC erzielt werden (siehe Abbildung 38 E, F, H, I).

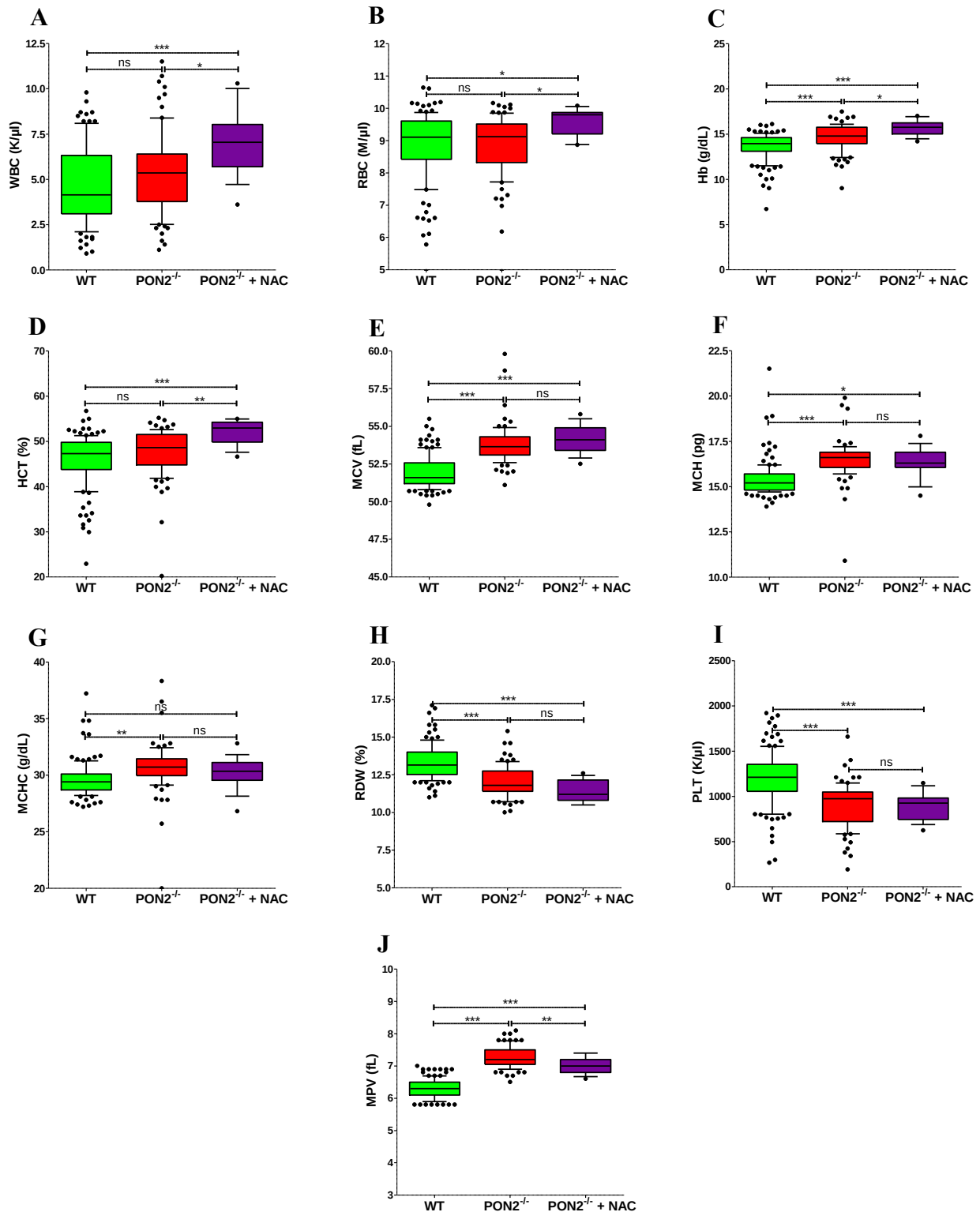


Abbildung 38: Befunde aus Analysen des Blutbildes NAC behandelter PON2^{-/-}-Tiere im Vergleich zu unbehandelten Mäusen. Dargestellt ist (A) die Anzahl der Leukozyten, (B) die Anzahl der Erythrozyten, (C) das Hämoglobin, (D) der prozentuale Hämatokrit-Wert, (E) das mittlere Erythrozytenvolumen, (F) das mittlere zelluläre Hämoglobin, (G) die mittlere zelluläre Hämoglobinkonzentration, (H) die Erythrozytenverteilungsbreite sowie (I) die Anzahl der Thrombozyten und (J) das Thrombozytenvolumen aus Blut von WT, unbehandelten PON2^{-/-} und NAC behandelten PON2^{-/-}-Tieren. WBC = *white blood cell count*; RBC = *red blood cell count*; Hb = *hemoglobin*; HCT = *hematocrit*; MCV = *mean corpuscular volume*; MCH = *mean cellular hemoglobin*; MCHC = *mean cellular hemoglobin concentration*; RDW = *red blood cell distribution width*; PLT = *platelet count*; MPV = *mean platelet volume*. Box-Diagramm. Median ± unteres/oberes Quartil mit 10/90 Wert; Ausreißer = Kreise; n = 16-120. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; n.s. = nicht signifikant; *One-way ANOVA*.

5.3.6 PON2-defiziente Knochenmarkszellen zeigen eine verbesserte Repopulationsfähigkeit in kompetitiven Transplantationen

Um die Fähigkeit von Knochenmarkszellen zur *multilineage*-Rekonstruktion analysieren zu können, wurde das in 4.3.4.2 beschriebene System der kompetitiven Transplantation angewendet. Dabei diente die prozentuale Anzahl an Blutzellen, die aus den Stammzellen des jeweiligen Genotyps resultierten, als Maß für die biologische Funktionsfähigkeit (auch Repopulationsfähigkeit oder *Engraftment* genannt) der Zellen. Die Zuordnung der Zellen erfolgte mithilfe des in 4.3.4.2.1 beschriebenen Ptpcr a/b-Chimärismus, unter Anwendung der Oberflächenmarker CD45.1 und CD45.2. Zur besseren Veranschaulichung wurden in Abbildung 39 jedoch lediglich die CD45.2 positiven Zellen aus den beiden Versuchsgruppen WT CD45.1/WT CD45.2 und WT CD45.1/PON2^{-/-} CD45.2 dargestellt.

Wie in 1.3.2 bereits angesprochen, unterscheidet man in der Transplantationsterminologie zwischen kurzzeit-repopulierenden (ST-) und langzeit-repopulierenden (LT-) hämatopoetischen Stammzellen. Erstere führen nach der Transplantation in zuvor letal bestrahlte Empfängertiere zur ersten Regeneration der Hämatopoese. Einige Monate nach der Transplantation sind diese Zellklone jedoch nicht mehr nachweisbar. Zu diesem Zeitpunkt erfolgt die dauerhafte Repopulation aus zweitgenannten, nämlich den langzeit-repopulierenden HSCs. Sie tragen erst mehrere Wochen bis Monate nach der Transplantation nachweisbar zur Blutbildung bei, sind jedoch in der Lage, diese ein Leben lang aufrecht zu erhalten.

Die vorliegenden Studien ergaben eine insgesamt gesteigerte Repopulationsfähigkeit der HSCs aus PON2^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Wildtypen. Besonders deutlich und statistisch signifikant war der Unterschied zwischen den in Abbildung 39 A dargestellten CD45.2 positiven peripheren Blutzellen, die von PON2-defizienten (rot) bzw. WT- (grün) Stammzellen abstammen, in den ersten 15 Wochen nach der Transplantation. Dieses Ergebnis weist auf eine bessere Funktionsfähigkeit der PON2^{-/-}-ST-HSCs hin. Im weiteren Versuchsverlauf, also zwischen der 15. und der 22. Woche nach der Knochenmarkinjektion, wies die Anzahl der CD45.2 positiven Blutzellen mit PON2^{-/-}-Ursprung immer noch einen numerisch gesteigerten Mittelwert auf, der Unterschied zu den CD45.2 positiven Blutzellen mit WT-Ursprung war allerdings nicht mehr signifikant. Da zu diesem Zeitpunkt bereits die LT-HSCs die dauerhafte Repopulation initiiert haben, scheinen diese nur eine bedingt gesteigerte Funktionsfähigkeit im Gegensatz zu den WT-LT-HSCs aufzuweisen.

Eine Retransplantation der kompetitiv transplantierten Knochenmarkzellen in zuvor letal bestrahlte Empfängertiere lieferte ein ähnliches Ergebnis. Der Mittelwert der von PON2-defizienten HSCs abstammenden Blutzellen lag deutlich über dem Mittelwert der von WT-HSCs abstammenden Blutzellen, durch die hohe Standardabweichung war der detektierte Unterschied jedoch nicht statistisch signifikant (siehe Abbildung 39 B).

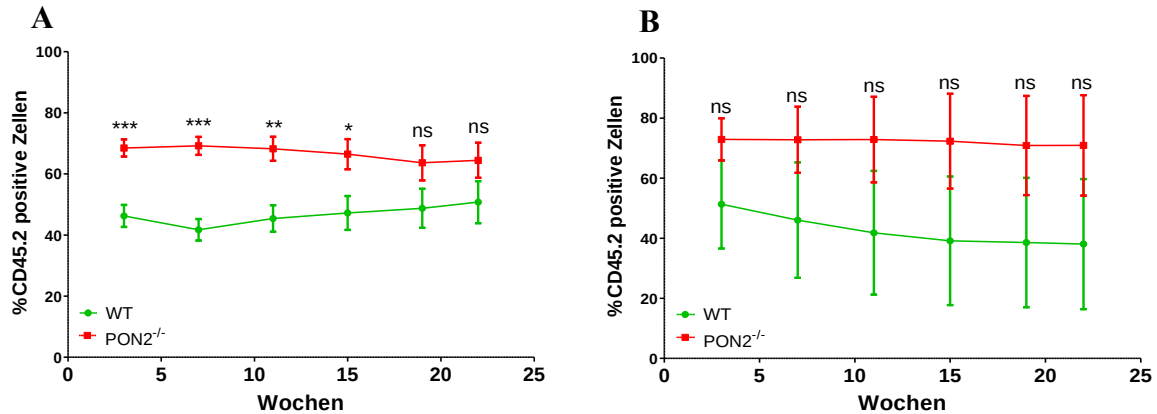


Abbildung 39: Repopulationsfähigkeit PON2-defizienter HSCs im Vergleich zu WT-HSCs. Im Anschluss an die kompetitive Knochenmarktransplantation wurden den Individuen der Versuchsgruppen WT/WT (Kontrolle) und WT/PON2^{-/-} (kompetitiv) über einen Zeitraum von 22 Wochen in Abständen von 3-4 Wochen Blutproben entnommen. Die daraus isolierten Blutzellen wurden anschließend mithilfe der Oberflächenmarker CD45.1 und CD45.2 ihren jeweiligen Ursprungstammzellen zugeordnet, was eine Aussage über die Repopulationsfähigkeit der Stammzellen des jeweiligen Genotyps erlaubt. **(A)** Gezeigt wird die prozentuale Anzahl CD45.2 positiver Blutzellen in der Kontrollgruppe und der kompetitiven Gruppe. n = 9; **(B)** Gezeigt wird die prozentuale Anzahl CD45.2 positiver Blutzellen in der Kontrollgruppe und der kompetitiven Gruppe nach der Retransplantation der Knochenmarkzellen in bestrahlte Empfängertiere. n = 4. Mittelwert $\pm$ SEM. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; n.s.= nicht signifikant; T-Test.

Auf Grundlage der Resultate dieses Versuches sollten im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit mögliche Ursachen für die verbesserte Repopulationsfähigkeit der PON2-defizienten Stammzellen abgeklärt werden. Überprüft wurde der Zellzyklusstatus der Zellen (siehe Abschnitt 5.3.6.1), die Zielfindungsfähigkeit (*homing*, siehe Abschnitt 5.3.6.2) sowie die Fähigkeit der Zellen zur Ausbildung von Kolonien (*colony forming ability*, siehe Abschnitt 5.3.6.3).

5.3.6.1 Keine Änderung des prozentualen Anteils quieszenter bzw. zyklischer LSK-Zellen und LT-HSCs in PON2-defizienten Mäusen

LT-HSCs befinden sich zumeist in der osteoblastischen Nische, in der sie in einem ruhenden Zustand verharren, der auch als Quieszenz bezeichnet wird (siehe 1.3.1). Erhöhte ROS-Mengen stören diesen Ruhezustand und können HSCs zur Proliferation und Differenzierung stimulieren¹⁵⁷. Aufgrund dessen wurde im Rahmen dieser Arbeit der prozentuale Anteil von LSK-Zellen bzw. LT-HSCs in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus bestimmt. Auf diese Weise sollte abgeklärt werden, ob die PON2-defizienten Zellen als Reaktion auf die erhöhten intrazellulären ROS- bzw. Superoxid-Level (siehe 5.3.3.1 und 5.3.3.2) in einem aktiven anstelle eines ruhenden Zustandes vorliegen.

Um den jeweiligen Zellzyklus-Status der Knochenmarkzellen bestimmen zu können, wurden neben den in Tabelle 15 genannten Oberflächenmarkern zur Diskriminierung der verschiedenen Knochenmark-Subpopulationen die intrazellulären Marker Hoechst und Ki-67 angewendet (siehe 4.1.8). Der Fluoreszenzfarbstoff Hoechst dient dem Anfärben der DNA, während der fluoreszenz-markierte Antikörper Ki-67 als Proliferationsmarker fungiert. Die genaue *Gating*-Strategie zur Unterscheidung zwischen den verschiedenen Zellzyklusphasen ist in Abbildung 40 dargestellt.

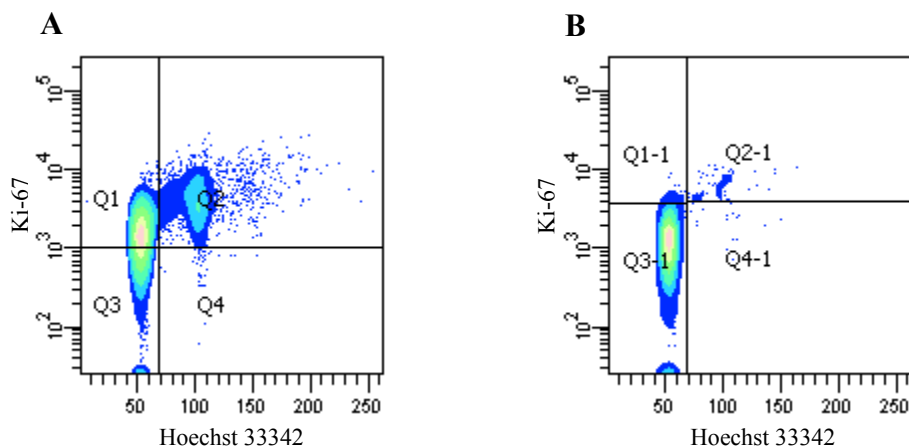


Abbildung 40: Gating-Strategie zur durchflusszytometrischen Unterscheidung der Zellzyklusphasen mittels Hoechst und Ki-67. Zu sehen sind repräsentative Dichtediagramme (*density plots*), erstellt mit der FACSDiva Software. **(A)** LSK-Zellen und **(B)** LT-HSCs gefärbt mit Hoechst 33342 sowie Ki-67. Die Gates Q1 bzw. Q1-1 enthalten Zellen in der G1-Phase, die Gates Q2 bzw. Q2-1 enthalten Zellen in der G2-, S- & M-Phase und die Gates Q3 bzw. Q3-1 enthalten Zellen in der G0-Phase.

Die am Durchflusszytometer gewonnenen Daten wurden in Abbildung 41 als gestapeltes Säulen-diagramm (*stacked column graph*) dargestellt.

Die Zellen der LSK-Fraktionen wiesen mit einer Verteilung von etwa 35,5 % in G0, 42,5 % in G1 und 22 % in G2, S, M in WT-Tieren im Vergleich zu einer Verteilung von etwa 32,5 % in G0, 44 % in G1 und 23,5 % in G2, S, M in $PON2^{-/-}$ -Tieren keine statistisch signifikante Änderung auf (siehe Abbildung 41 A). Gleiches galt für die LT-HSCs. Auch hier konnte mit einer Verteilung von etwa 84 % in G0, 8 % in G1 und 8 % in G2, S, M in Wildtypen sowie etwa 87 % in G0, 6,5 % in G1 und 6,5 % in G2, S, M in $PON2$ -defizienten Mäusen keine Änderung des Zellzyklusstatus festgestellt werden (siehe Abbildung 41 B).

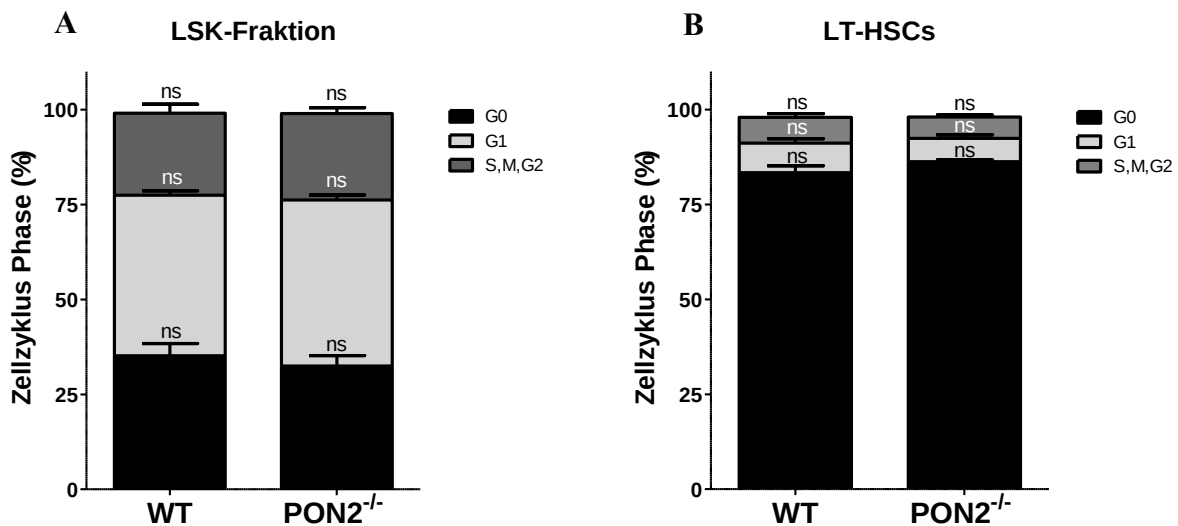


Abbildung 41: Zellzyklusanalysen an HSPCs aus WT- und $PON2^{-/-}$ -Mäusen. Die gestapelten Säulendiagramme stellen den prozentualen Anteil an (A) LSK-Zellen und (B) LT-HSCs innerhalb der G0-, G1- bzw. G2-, S-, M-Phase des Zellzyklus dar. n = 6; Mittelwert + SEM; n.s.= nicht signifikant; T-Test.

5.3.6.2 Die Zielfindungsfähigkeit (*homing*) der $PON2^{-/-}$ -Knochenmarkzellen weist keine Unterschiede zum Wildtyp auf

Neben den im vorherigen Abschnitt beschriebenen Zellzyklusanalysen wurden im Rahmen dieser Arbeit Zielfindungsanalysen, auch *homing assays* genannt, durchgeführt. Diese Untersuchungen waren deshalb von großer Bedeutung, da in einer Studie von Wang et al. aus dem Jahr 2012 eine negative Korrelation zwischen ROS und der Expression verschiedener Zielfindungsmoleküle (*homing adhesive molecules*) wie beispielsweise CD44, VLA4 und CXCR4 festgestellt wurde ¹⁶⁰. Ihre Analysen führten zu der Schlussfolgerung, dass ein

erhöhter ROS-Level einer der Gründe für die Reduktion der Zielfindungsfähigkeit von hämatopoetischen Stammzellen darstellen könnte. In den Studien in Abschnitt 5.3.6 wurde jedoch eine gesteigerte Repopulationsfähigkeit der $PON2^{-/-}$ -HSCs festgestellt, was unter anderem ein Zeichen für eine gesteigerte Zielfindungsfähigkeit sein könnte.

Im Rahmen dieses Versuches wurden Knochenmarkzellen aus $PON2$ -defizienten und Wildtyp- Tieren frisch isoliert, mit dem fluoreszierenden lipophilen Membranfarbstoff DiI gefärbt und anschließend intravenös in zuvor letal bestrahlte Empfängertiere injiziert (siehe 4.3.4.4). Bereits 48 Stunden nach der Transplantation wurden die Knochenmarkzellen aus den Hinterläufen der Empfängertiere isoliert und durchflusszytometrisch auf die prozentuale Anzahl gefärbter Zellen in Relation zur Gesamt-Zellzahl analysiert.

Wie in Abbildung 42 deutlich zu erkennen ist, konnte in diesen Studien keine Modulation der Zielfindungsfähigkeit von $PON2$ -defizienten HSCs festgestellt werden. Sowohl WT als auch $PON2^{-/-}$ -Empfängertiere wiesen einen prozentualen Anteil von etwa 30 % gefärbter Zellen auf.

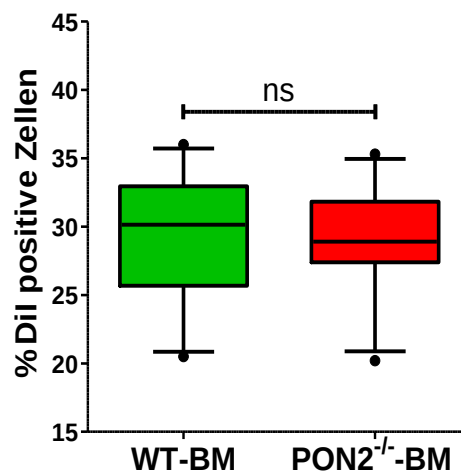


Abbildung 42: Zielfindungsfähigkeit $PON2$ -defizienter Knochenmarkzellen im Vergleich zum Wildtyp. 48 Stunden nach der Transplantation DiI-gefärbter Knochenmarkzellen in letal bestrahlte Empfängertiere wurde deren Knochenmark isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt wird die prozentuale Anzahl DiI positiver Knochenmarkzellen im Gesamt-knochenmark. Box-Diagramm. Median $\pm$ unteres/oberes Quartil mit 10/90 Wert; Ausreißer = Kreise. $n = 10$. n.s.= nicht signifikant; T-Test.

5.3.6.3 PON2-defiziente Knochenmarkszellen zeigen keine gesteigerten Differenzierungseigenschaften *in vitro*

Um die Differenzierungseigenschaften von Knochenmarkszellen zu analysieren wurden sogenannte *colony forming assays* durchgeführt. Dafür wurden Knochenmarkszellen aus WT- und PON2^{-/-}-Mäusen frisch isoliert und anschließend in einem Methylzellulosemedium (MethoCult) ausplattiert. Nach zehn- bis zwölf-tägiger Inkubation bei 37 °C wurde die Gesamtanzahl der entstandenen Kolonien sowie die Anzahl der entstandenen gemischten (CFU-GEMM; enthalten Granulozyten, Makrophagen, Megakaryozyten und Erythrozyten), Granulozyten/Makrophagen (CFU-GM), Granulozyten (CFU-G), Makrophagen (CFU-M) und Erythrozyten (BFU-E) Kolonien bestimmt (siehe 4.3.5).

In diesen Studien wurde weder eine signifikant veränderte Anzahl der Gesamt-Kolonien (siehe Abbildung 43 A) noch eine veränderte Anzahl an GEMM-, GM-, G-, M- oder E-Kolonien (siehe Abbildung 43 B) festgestellt. Diese Untersuchungen wiesen darauf hin, dass PON2 keinen Einfluss auf die Fähigkeit der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen zur Ausbildung von Kolonien (*colony forming ability*) hat.

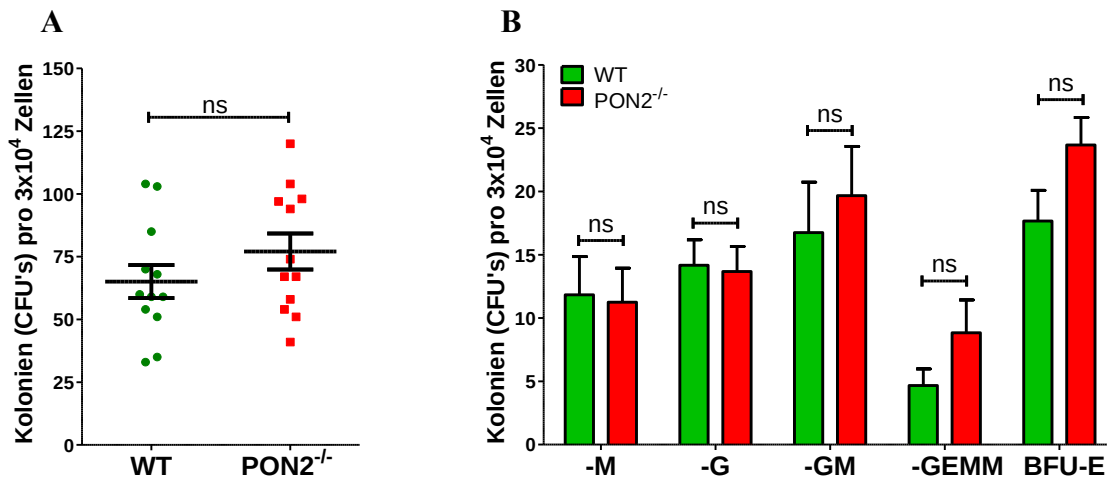


Abbildung 43: Colony forming assays mit PON2^{-/-} und WT-Knochenmarkszellen. 10-12 Tage nach dem Ausplattieren von 3x10⁴ Zellen in MethoCult war die (A) Gesamtanzahl der Kolonien sowie die (B) Anzahl an Makrophagen (-M), Granulozyten (-G), Granulozyten/Makrophagen (-GM), Granulozyten/Erythrozyten/Makrophagen/Megakaryozyten (-GEMM) und Erythrozyten (-E) Kolonien in PON2^{-/-}-Kulturen verglichen zum Wildtyp unverändert. n = 12; Mittelwert ± SEM. n.s.= nicht signifikant; T-Test.

5.3.7 Modifikation der Erythropoese und potenziell der Thrombopoese durch PON2-Defizienz

Aufgrund der in Abschnitt 5.3.1.2 beschriebenen morphologischen Auffälligkeiten der Erythrozyten und Thrombozyten in PON2-defizienten Mäusen, sollten in diesem Teilprojekt verschiedene Parameter, wie beispielsweise der Umsatz von Erythrozyten und Thrombozyten, die Stress-Erythropoese, die prozentuale Menge verschiedener Erythrozyten-Vorläufer sowie der Zellzyklusstatus in MEPs analysiert werden.

5.3.7.1 Verlängerte Lebensdauer von Erythrozyten in PON2^{-/-}-Mäusen

Das in Abbildung 27 E und J dargestellte, signifikant erhöhte Volumen der Erythrozyten und Thrombozyten aus PON2-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtypen könnte in Kombination mit der gesteigerten Hämoglobinemenge pro Erythrozyt (MCH, siehe Abbildung 27 F) und der verringerten Thrombozytenzahl (PLT, siehe Abbildung 27 I) auf eine Störung der Erythropoese beziehungsweise der Thrombopoese (auch Thrombozytopoese genannt) hindeuten. Da diese beiden Prozesse von Redox-sensiblen Signalwegen gesteuert und offenbar durch PON2 moduliert werden, sollte zunächst die Lebensdauer von Erythrozyten sowie Thrombozyten bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurde eine *in vivo* Biotinylierung mithilfe von sulfo-N-hydroxysuccinimide-*long chain*-Biotin (sulfo-NHS-LC-Biotin) durchgeführt (siehe 4.3.1). Die intravenöse Injektion des Biotins in Wildtyp beziehungsweise PON2^{-/-}-Mäuse führte zu einer Markierung nahezu aller peripheren Blutzellen. Im Anschluss wurde den Versuchstieren in regelmäßigen Abständen eine geringe Menge Blut entnommen, dessen Zellen isoliert und mit fluoreszenz-gekoppeltem Streptavidin sowie einem spezifischen Erythrozyten- (Ter119) beziehungsweise Thrombozyten-Marker (CD41) gefärbt und daraufhin durchflusszytometrisch analysiert wurden. Auf diese Weise konnte der Erythrozyten- bzw. Thrombozytenumsatz bzw. die Zirkulationsdauer der Zellen im Blut gemessen werden.

Die Analysen der Thrombozyten-Lebensdauer wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Julia Ebert durchgeführt, wodurch die erlangten Ergebnisse ebenfalls in Ebert et al. 2018³¹ sowie in ihrer Dissertation¹⁶¹ zu finden sind.

Die in Abbildung 44 graphisch dargestellten Analysen ergaben eine signifikant verlängerte Lebensspanne der Erythrozyten von PON2-defizienten Mäusen (HWZ: PON2^{-/-} = ca. 16 Tage, WT = ca. 11 Tage, siehe Abbildung 44 A), während die Lebensspanne der Thrombozyten nahezu unverändert blieb (siehe Abbildung 44 B). Dieses Ergebnis ließ darauf schließen, dass der Erythrozytenumsatz von PON2 beeinflusst wird, der Thrombozytenumsatz jedoch nicht.

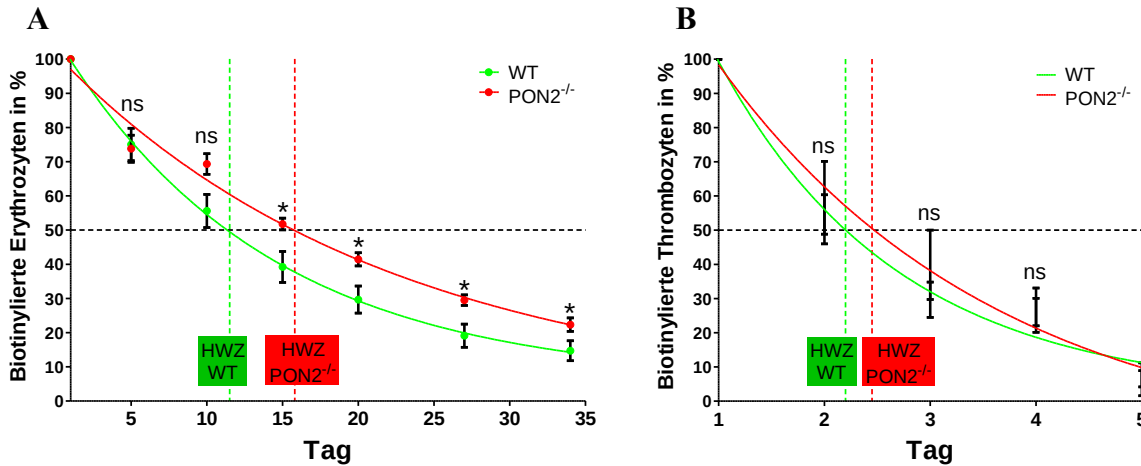


Abbildung 44: Die Lebensdauer von Erythrozyten und Thrombozyten. Die Erythrozyten und Thrombozyten-Degradation und -Neubildung wurde anhand einer *in vivo* Biotinylierung bestimmt. PON2-defizienten und WT-Mäusen wurde intravenös sulfo-NHS-Biotin injiziert und anschließend über einen Zeitraum von 34 (Erythrozyten) bzw. 5 Tagen (Thrombozyten) regelmäßig Blut entnommen. Anschließend wurden die aus dem Vollblut isolierten Blutzellen mit Fluoreszenz-konjugiertem Streptavidin sowie dem Erythrozytenmarker Ter119 bzw. dem Thrombozytenmarker anti-CD41 gefärbt und durchfluss-zytometrisch auf die Anzahl der biotinylierten **(A)** Erythrozyten bzw. **(B)** Thrombozyten untersucht (n Thrombozyten = 3-6, n Erythrozyten = 7-8 Mäuse). Die Ergebnisse sind als Prozent der biotinylierten Erythrozyten bzw. Thrombozyten aller Biotin-markierten Erythrozyten/Thrombozyten an Tag 1, unmittelbar nach der Biotin-Injektion, dargestellt; Mittelwert $\pm$ SEM. Es wurde eine nichtlineare Regression erstellt (R^2 Erythrozyten=0,90; R^2 Thrombozyten=0,89); Vertikale gestrichelte Linien stellen die Halbwertszeit (HWZ) der jeweiligen Zellen aus WT- (grün) bzw. PON2^{-/-}- (rot) Mäusen dar. * $p < 0,05$; n.s., nicht signifikant; T-Test.

5.3.7.2 PON2-defiziente Mäuse zeigen eine gesteigerte Stress-Erythropoese

Aufgrund der in 5.3.7.1 aufgedeckten veränderten Lebensdauer von Erythrozyten in PON2-defizienten Mäusen, sollte im nächsten Schritt die sogenannte Stress-Erythropoese analysiert werden. Die Stress-Erythropoese ist dann von großer Bedeutung, wenn es beispielsweise durch Blutungen oder Hämolyse zu einem starken Verlust von Erythrozyten kommt. Ist dies der Fall, kommt es zu einem Abfall der Sauerstoffkonzentration, der im Gewebe der Niere festgestellt wird. Als Antwort auf einen festgestellten Bedarf an roten Blutzellen wird Erythropoetin (kurz EPO), ein Glykoprotein-Hormon, ausgeschüttet, das die unreifen erythropoetischen Zellen zur Proliferation anregt¹⁶².

Zur Analyse dieses Prozesses wurde PON2^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen wie in 4.3.2 beschrieben intraperitoneal Phenylhydrazin appliziert, das eine hämolytische Anämie verursacht und dadurch die stressinduzierte Erythropoese antreibt. An den Tagen 1, 3 und 5 des Versuches wurde den behandelten Tieren sowie den Kontrolltieren, welchen lediglich PBS injiziert wurde, Blut entnommen und an einem Sysmex-Gerät labormedizinisch analysiert. Im Anschluss wurde die Anzahl der Erythrozyten (RBC) in Prozent vom Mittelwert zunächst separat, also für die Phenylhydrazin-Gruppe (siehe Abbildung 45 A) und die Kontrollgruppe

(siehe Abbildung 45 B) ausgewertet. Dabei zeigten die Erythrozyten-Werte der Phenylhydrazin-Gruppe den Effekt der induzierten Hämolyse in Kombination mit dem Blutungseffekt, der durch die Blutentnahmen entstanden war, während die Erythrozyten-Werte der Kontrollgruppe den reinen Blutungseffekt darstellten. Um mithilfe dieser beiden Datensätze den reinen Effekt des Phenylhydrazins ermitteln zu können, wurde jeweils der Mittelwert der prozentualen Erythrozyten-Anzahl in der Kontrollgruppe des entsprechenden Genotyps vom Messwert jedes Individuums der Phenylhydrazin-Gruppe subtrahiert. Auf diese Weise entstand die in Abbildung 45 C dargestellte Kastengrafik (*box plot*), die den reinen Effekt des Phenylhydrazins repräsentiert.

Vergleicht man die verschiedenen Grafiken miteinander, fällt auf, dass $PON2^{-/-}$ -Mäuse weniger sensitiv auf die Induktion einer hämolytischen Anämie durch Injektion von Phenylhydrazin reagieren als WT-Mäuse. Sowohl in Abbildung 45 A als auch in Abbildung 45 C wiesen die $PON2$ -defizienten Mäuse an Tag 5 eine signifikant höhere prozentuale Erythrozytenzahl auf als die gleichermaßen behandelten Wildtypen.

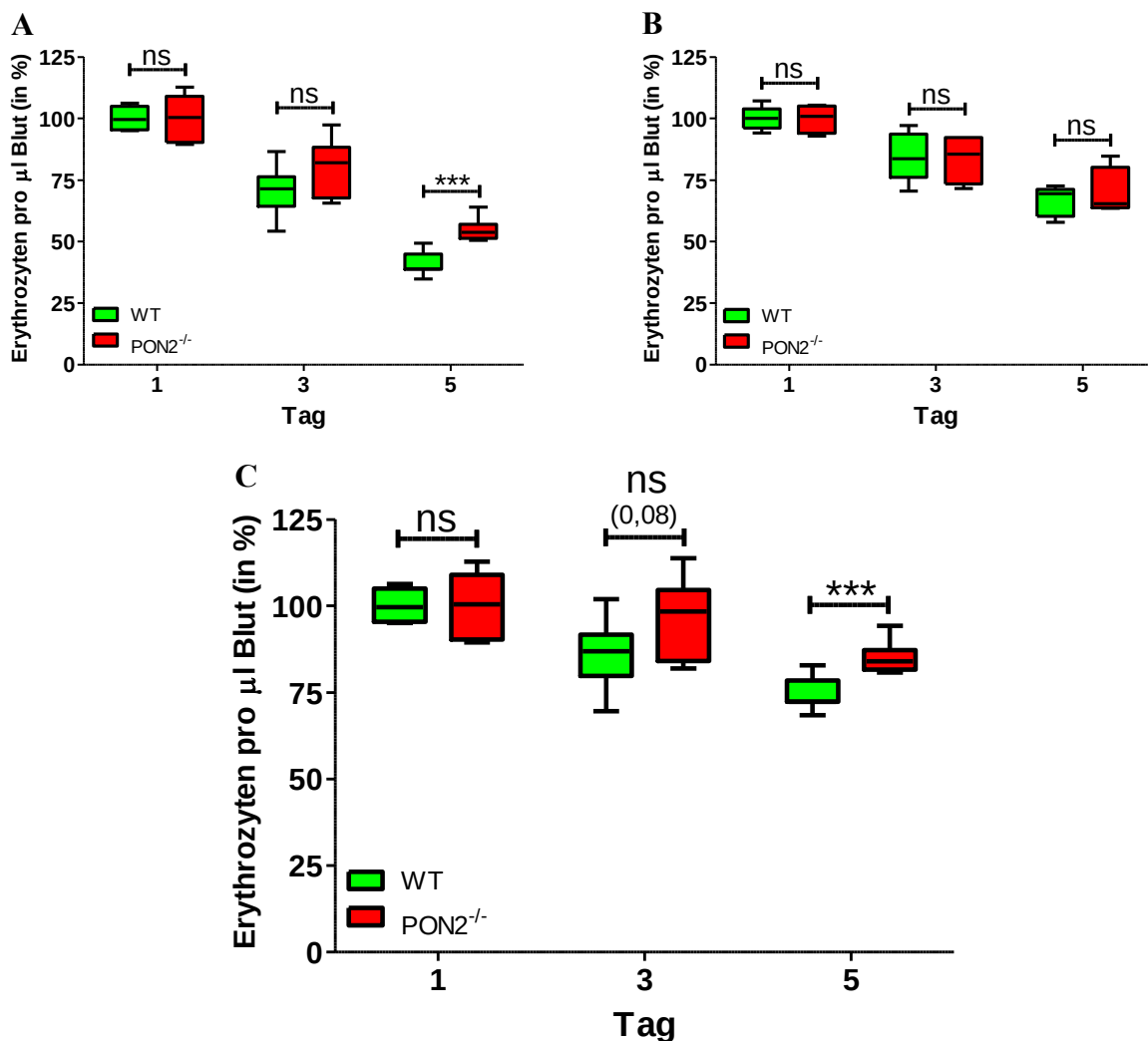


Abbildung 45: Prozentuale Erythrozytenzahl im Blut von PON2^{-/-}-und WT-Mäusen während der Induktion einer hämo-lytischen Anämie durch Phenylhydrazin. PON2-defizienten sowie Wildtyp-Mäusen wurde an Tag 1 und 3 *i.p.* entweder Phenylhydrazin oder PBS (Kontrollgruppe) injiziert. An Tag 1 (vor Beginn der Behandlung) sowie an Tag 3 und 5 wurde den Versuchstieren durch Anritzen der *Vena caudalis mediana* eine kleine Menge Blut entnommen, um die Anzahl der Erythrozyten zu analysieren. Dargestellt wird die prozentuale Anzahl der Erythrozyten im Blut (A) der Phenylhydrazin-Gruppe und (B) der Kontrollgruppe im Vergleich zum Mittelwert der jeweiligen Ausgangsmenge. Durch Subtraktion des Mittelwertes der jeweiligen Kontrollgruppe von den Erythrozyten-Werten der Individuen innerhalb der Phenylhydrazin-Gruppe, wurde (C) der reine Phenylhydrazin-Effekt ermittelt. n = 4-8. Mittelwert ± SEM. *** p<0,001; n.s.= nicht signifikant; T-Test.

5.3.7.3 Erhöhter prozentualer Anteil verschiedener Erythrozyten-Entwicklungsstufen im Knochenmark von PON2^{-/-}-Mäusen.

In Erythroblasten ist eine hohe Apoptoserate keine Ausnahme. Der Prozess wird kontrolliert durch die Interaktion von Erythropoetin (Epo) mit seinem Transmembranrezeptor EpoR. In späten Erythroid-Vorläufern (CFU-E) und Erythroblasten wird EpoR am höchsten exprimiert. Durch die Bindung von Epo an EpoR kommt es zu einer Konformationsänderung der EpoR Untereinheiten, woraufhin eine Signaltransduktions-Machinerie aktiviert wird. Unter anderem kommt es zur Mobilisierung einer Januskinase (JAK2), die wiederum multiple Signalwege aktiviert, die gemeinsam die Inhibierung der Apoptose und die Unterstützung der terminalen Erythroidproliferation und -differenzierung arrangieren¹⁶³. In verschiedenen Studien wurde deshalb geschlossen, dass das Gleichgewicht zwischen Überleben und Apoptose in Erythrozyten-Vorläufern durch die Stärke des EpoR vermittelten Überlebenssignals, das wiederum von der Erythropoetin-Konzentration sowie Stress abhängig ist, und von der angeborenen Sensibilität des Großteils der Vorläuferzellen gegenüber Apoptose gesteuert wird. Im Basalzustand führt die Apoptose der Mehrzahl Erythroider-Vorläufer zu einer niedrigen erythropoetischen Rate, während in Stresssituationen die Mehrheit der Vorläufer überlebt und die erythropoetische Rate ansteigt⁹⁶.

Im Hinblick auf die in 5.3.7.2 beschriebene geringere Sensibilität PON2-defizienter Mäuse gegenüber einer induzierten Hämolyse, sollte in diesem Abschnitt überprüft werden, ob eine Modulation der prozentualen Anzahl verschiedener Erythrozyten-Vorläuferzellen im Knochenmark der Tiere vorliegt. Da in Abschnitt 5.3.4.2 bereits eine verringerte Apoptoserate in PON2^{-/-}-LT-HSCs festgestellt werden konnte, wurde auch hier ein PON2-abhängiger Eingriff in das Gleichgewicht zwischen Überleben und Apoptose vermutet.

Die durchflusszytometrische Analyse der Erythrozyten-Vorläufer im Gesamtknochenmark mithilfe der fluoreszenz-gekoppelten Antikörper CD71 und Ter119 ergab eine Steigerung der Anzahl an Proerythroblasten (siehe Abbildung 46 A), basophilen Erythroblasten (siehe Abbildung 46 B) sowie polychromatischen Erythroblasten (siehe Abbildung 46 C) in PON2^{-/-}-Tieren.

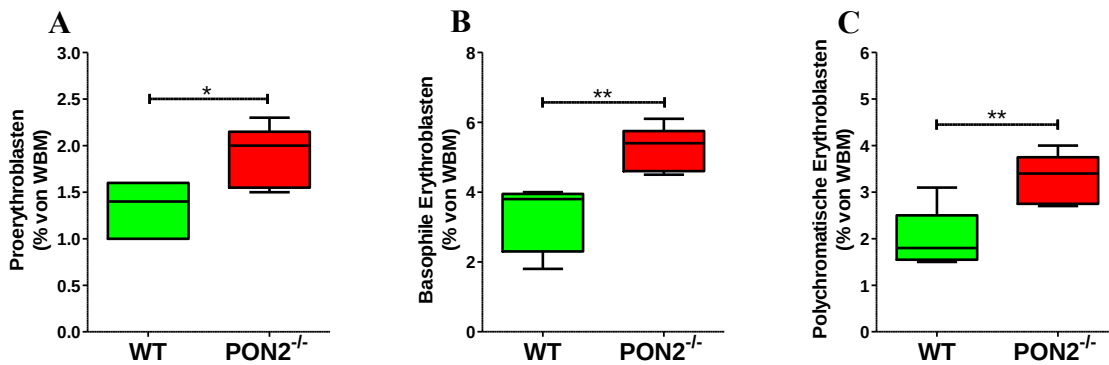


Abbildung 46: Befunde aus der Analyse der verschiedenen Erythrozyten-Entwicklungsstufen im Knochenmark von WT- und PON2^{-/-}-Mäusen. Im Anschluss an die Isolierung des Knochenmarks wurden die Zellen mit den Antikörpern CD71 und Ter119 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Graphen zeigen den prozentualen Anteil von (A) Proerythroblasten (CD71 high/Ter119 mid), (B) basophilen Erythroblasten (CD71 high/Ter119 high) und (C) polychromatischen Erythroblasten (CD71 mid/Ter119 mid). Die Standardabweichung in WT ist teilweise so gering, dass sie graphisch mit dem Boxplot zusammenfällt. Box-Diagramm. Median $\pm$ unteres/oberes Quartil mit 10/90 Wert; n = 5. * p<0,05; ** p<0,01; T-Test.

5.3.7.4 PON2 Defizienz führt zu Modifikationen im Zellzyklus von Megakaryozyten/ Erythrozyten Vorläufern (MEPs)

Neben den in 5.3.7.1 bis 5.3.7.3 beschriebenen Analysen der Lebensdauer von Erythrozyten und Thrombozyten, der Stress-Erythropoese sowie der Anzahl verschiedener Erythrozyten-Entwicklungsstufen im Knochenmark wurde innerhalb der vorliegenden Studien außerdem der Zellzyklus in den Megakaryozyten/Erythrozyten Vorläufern (MEPs) untersucht. Dabei sollte festgestellt werden, ob die Abwesenheit von PON2 Auswirkungen auf den prozentualen Anteil an MEPs in den verschiedenen Zellzyklusphasen hat. Eine Modifikation im Zellzyklus dieser Vorläuferzellen, die sowohl in Erythrozyten als auch in Megakaryozyten, die Vorläufer der Thrombozyten, differenzieren können, könnte eine der Ursachen für die Bildung der in 5.3.1.2 beschriebenen "abnormen" Erythrozyten und Thrombozyten darstellen.

Die Analysen erfolgen analog zu den in 5.3.6.1 beschriebenen Zellzyklusanalysen in LSK-Zellen bzw. LT-HSCs durch die Färbung der Knochenmarkzellen mit zellspezifischen Oberflächenmarkern (siehe Tabelle 15) sowie den intrazellulären Markern Hoechst und Ki-67 (siehe 4.1.8).

Die Studien ergaben eine signifikant verringerte prozentuale Anzahl an MEPs aus PON2-defizienten Mäusen in der G0-Phase (Ruhephase) sowie eine signifikant gesteigerte Anzahl in der G1-Phase. Im Anteil der Zellen in der G2-, S- und M-Phase konnte hingegen kein Unterschied festgestellt werden (siehe Abbildung 47).

Dieses Ergebnis ließ den Schluss zu, dass PON2 eine Rolle bei der Regulation des Zellzyklus in Megakaryozyten/Erythrozyten Vorläufern spielt.

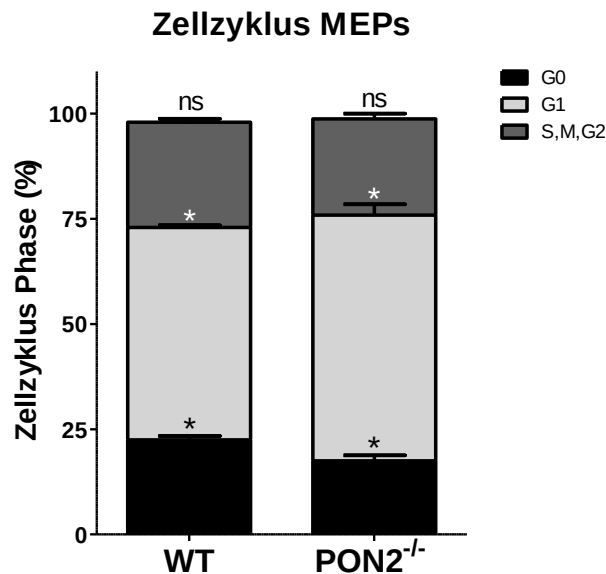


Abbildung 47: Zellzyklusanalysen an Megakaryozyten/Erythrozyten Vorläufern aus WT- und PON2^{-/-}-Mäusen. Die gestapelten Säulendiagramme stellen den prozentualen Anteil an MEPs innerhalb der G0-, G1- bzw. G2-, S-, M-Phase des Zellzyklus dar. n = 6; Mittelwert + SEM; * p<0,05; n.s.= nicht signifikant; T-Test.

5.4 Alte PON2^{-/-}-Mäuse weisen verstärkte Modifikationen der Hämatopoese auf

Aufgrund des in 5.2 beschriebenen divergenten PON2-Expressionslevels in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen junger und alter WT-Mäuse wurden einige der in Abschnitt 5.3 aufgeführten Analysen in älteren Mäusen wiederholt. Dabei wurden die Knochenmarkszellen sowie das Blut aus mehr als 9 Monate alten PON2^{-/-}-Tieren analysiert und mit gleichaltrigen Wildtyp-Tieren verglichen, um gegebenenfalls erst während der Alterung auftretende Effekte der PON2-Defizienz aufdecken zu können.

5.4.1 Während der Alterung kommt es zu vermehrten Auffälligkeiten des Knochenmarks und des Blutbildes PON2-defizienter Mäuse

Zunächst wurden analog zu den Analysen in jungen Tieren (siehe Abschnitt 5.3.1) die allgemeinen Analysen des Knochenmarks sowie des Blutbildes durchgeführt.

Verschiedene Publikationen, die sich mit der Alterung von wildtypischen HSCs befassen, beschreiben eine im Alter auftretende Dysfunktion der Selbsterneuerungsfähigkeit in HSCs⁸⁷,

die neben einer Steigerung der Apoptoserate auftritt und den Verlust an Stammzellen in alten Tieren ausgleicht beziehungsweise überkompensiert, wodurch es zu einer Expansion der beiden HSC-Subpopulationen kommt. Diese Expansion dient dem Ausgleich der verringerten HSC-Leistung auf einer pro-Zelle-Basis und sorgt dafür, dass auch im Alter die Blutbildung konstant aufrecht gehalten werden kann^{88, 89}. Neben dem beschriebenen quantitativen Zuwachs der HSCs, kommt es zu einem Vershub der Differenzierungsrichtung hin zu mehr myeloischen und weniger lymphatischen Zellen (auch *myeloid skewing* genannt). Die damit verbundene Immunseneszenz ist laut verschiedener Studien die Folge einer im Alter auftretenden klonalen Vermehrung myeloid-vorbestimmter auf Kosten lymphoid-vorbestimmter Stammzellen (siehe Abbildung 6)^{80, 164}.

Die in den folgenden Abschnitten beschriebenen quantitativen Analysen der verschiedenen Zellpopulationen des Knochenmarks sowie die labormedizinischen Analysen des Blutes von mehr als 9 Monate alten Mäusen dienten der Feststellung, ob die oben beschriebenen altersbedingten Modifikationen der Hämatopoese in Wildtyp-Mäusen in PON2-defizienten Tieren konserviert oder intensiviert bzw. vermindert sind.

5.4.1.1 Gesteigerte prozentuale Anzahl der LSK-Zellen sowie aller myeloischer Vorläuferzellen in alten PON2-defizienten Mäusen

Die verschiedenen Zellpopulationen des Knochenmarks von alten PON2^{-/-}- und WT-Mäusen wurden zunächst wie in Abschnitt 4.1.1 beschrieben isoliert, mittels zellspezifischer Oberflächenmarker gefärbt (siehe 4.1.4) und anschließend durchflusszytometrisch quantitativ analysiert.

Analog zu den in Abschnitt 5.3.1.1 beschriebenen Analysen der Knochenmarkzellen junger Mäuse zeichneten sich auch in den in Abbildung 48 graphisch dargestellten quantitativen Analysen des Knochenmarks älterer Tiere deutliche Modifikationen ab. Zu diesen Modifikationen zählte unter anderem die signifikante Steigerung des prozentualen Anteils langzeit- (siehe Abbildung 48 A), kurzzeit-repopulierender hämatopoetischer Stammzellen (siehe Abbildung 48 B) sowie multipotenter Vorläuferzellen (siehe Abbildung 48 C) innerhalb des Gesamtknochenmarks älterer PON2^{-/-}-Tiere. Diese Beobachtung stellte einen Unterschied zu den Analysen der jüngeren PON2-defizienten Tiere da, in deren LSK-Fraktion lediglich der Anteil an LT-HSCs gesteigert war, während der Anteil an ST-HSCs keine Änderungen und der Anteil an MPPs eine prozentuale Verringerung im Vergleich zum Wildtyp erkennen ließ

(siehe Abbildung 23 B-D). Zusätzlich zu den verschiedenen Subpopulationen der LSK-Fraktion wies auch die prozentuale Anzahl an CMPs (siehe Abbildung 48 D) sowie MEPs (siehe Abbildung 48 E) und GMPs (siehe Abbildung 48 F) eine signifikante Zunahme auf. Diese Zunahme stand im Kontrast zu einer Abnahme des Anteils an CMPs und einer unveränderten Anzahl an MEPs und GMPs, die in jungen $PON2^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtypen ermittelt wurde (siehe Abbildung 25 A-C). Im Hinblick auf die weiter ausdifferenzierten, *lineage*-positiven Zellen des Knochenmarks waren im Vergleich alter $PON2^{-/-}$ -Tiere zu entsprechenden Wildtypen sowie im Vergleich junger und älterer Tiere nur wenige Unterschiede ersichtlich. Der prozentuale Anteil an ausgereiften Myelozyten, frühen B-Zellen sowie Erythrozyten- Vorläufern wies in älteren $PON2$ -defizienten Mäusen, genau wie in jüngeren, keine Differenzen verglichen mit Wildtypen auf (siehe Abbildung 48 H-I und Abbildung 26 B-D). T-Vorläufer-zellen hingegen wiesen einen signifikant verringerten Anteil am Knochenmark alter $PON2^{-/-}$ -Mäuse auf, der in jüngeren Tieren nicht detektiert wurde (siehe Abbildung 48 G und Abbildung 26 A). Im Gegensatz dazu wies der prozentuale Anteil proliferierender Zellen im Knochenmark alter Tiere keine Unterschiede auf (siehe Abbildung 48 K), während er in jüngeren $PON2^{-/-}$ -Tieren signifikant verringert war (siehe Abbildung 26 E).

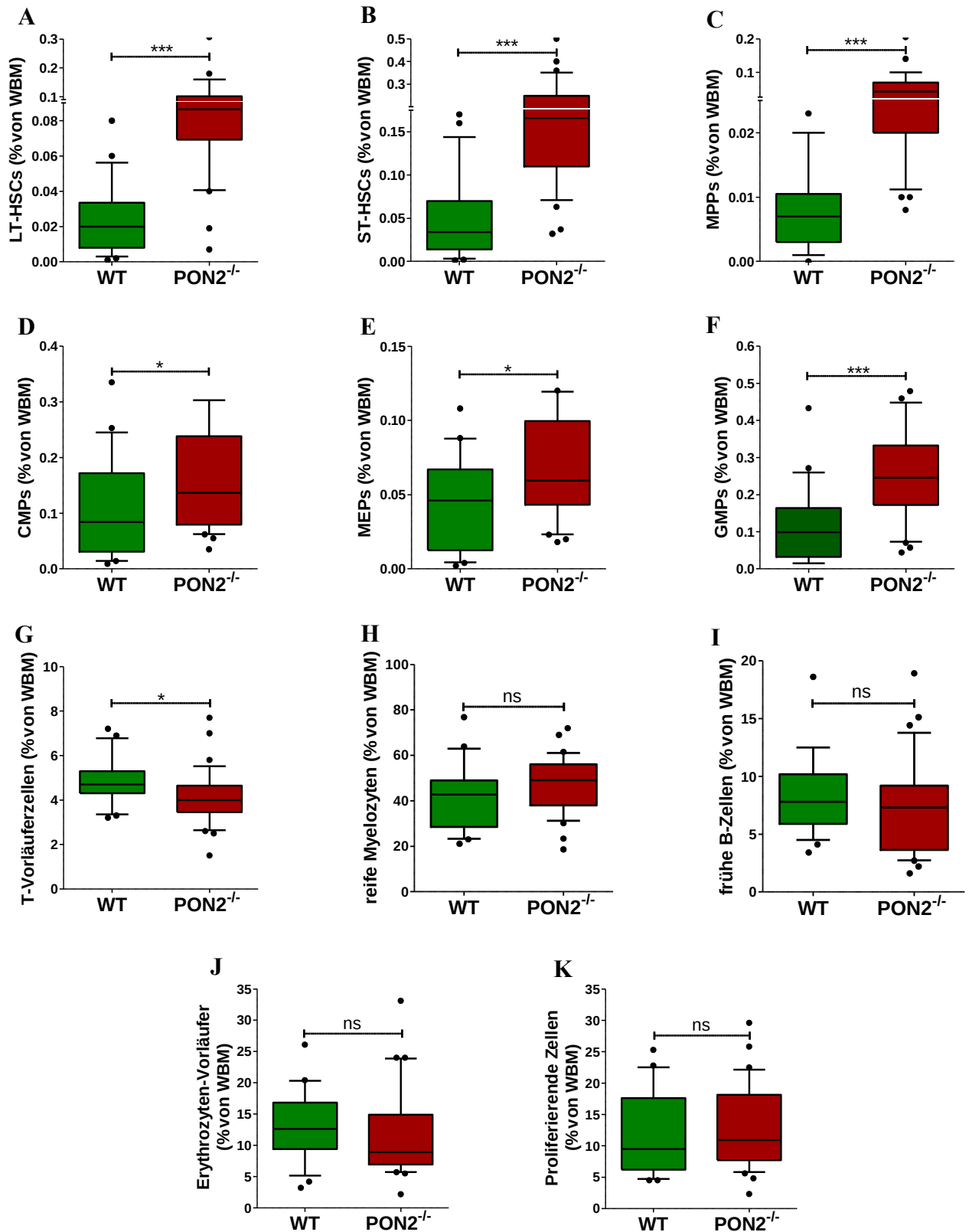


Abbildung 48: Befunde aus Analysen der Knochenmarkzellen aus alten WT- und PON2^{-/-}-Tieren. Aus mehr als 9 Monate alten Wildtypen sowie PON2-defizienten Tieren wurden Knochenmarkzellen isoliert, mittels Oberflächenmarkern gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Die Graphen zeigen den prozentualen Anteil der (A) LT-HSCs, (B) ST-HSCs, (C) MPPs, (D) CMPs, (E) MEPs, (F) GMPs, (G) T-Vorläuferzellen, (H) reifen Myelozyten, (I) frühen B-Zellen, (J) Erythrozyten-Vorläufer und (K) proliferierenden Zellen bezogen auf die Gesamtzahl an Knochenmarkszellen (WBM = whole bone marrow). Box-Diagramm. Median ± unteres/oberes Quartil mit 10/90 Wert; Ausreißer = Kreise; n = 21-32. * p<0,05; *** p<0,001; n.s.= nicht signifikant; T-Test.

5.4.1.2 Das Blutbild alter PON2^{-/-}-Mäuse zeigt verschiedene Auffälligkeiten

Ergänzend zu den quantitativen Analysen der Knochenmarkzellen wurde das Blutbild mehr als 9 Monate alter PON2^{-/-}-Mäuse gegenüber gleichaltrigen Wildtypen labormedizinisch untersucht. Dafür wurde zunächst mittels Herzpunktion oder Punktion des retrobulbären Venenplexus eine Vollblut-Probe entnommen, die anschließend an einem HEMAVET-Gerät analysiert wurde. Examiniert wurden jegliche in Abschnitt 5.3.1.2 genannten Blutparameter.

Analog zu den Analysen jüngerer Mäuse wurden in älteren Tieren verschiedene Modifikationen des Blutbildes PON2-defizienter Mäuse detektiert. Zu ihnen zählten unter anderem die größeren (MCV und MPV, siehe Abbildung 49 E und J), aber quantitativ unveränderten Erythrozyten (RBC, siehe Abbildung 49 B) und Thrombozyten (PLT, siehe Abbildung 49 I) älterer PON2^{-/-}-Mäuse. Die gesteigerten Zellvolumina sowie die unveränderte Erythrozytenzahl entsprachen den Ergebnissen der Blutanalysen jüngerer Tiere (siehe Abbildung 27 B, E und J), während die unveränderte Thrombozytenzahl eine Abweichung vom Blutbild 10-14 Wochen alter PON2-defizienter Mäuse darstellte (siehe Abbildung 27 I). Ebenfalls konstant zu den Werten jüngerer Tiere, wies die Anzahl an Leukozyten (WBC) im Vollblut alter PON2^{-/-}-Mäuse keine Änderung auf (vergleiche Abbildung 49 A und Abbildung 27 A), wohingegen das mittlere zelluläre Hämoglobin signifikant gesteigert war (vergleiche Abbildung 49 F und Abbildung 27 F). Andere Parameter, wie beispielsweise das Gesamt-Hämoglobin (Hb), der Hämatokrit (HCT), die mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC) sowie die Erythrozytenverteilungsbreite (RDW) zeigten hingegen Abweichungen zum Blutbild jüngerer Tiere. Das Gesamt-Hämoglobin, welches in jungen PON2-defizienten Tieren signifikant gesteigert war, wies in älteren Tieren keine Modifikationen auf (vergleiche Abbildung 49 C und Abbildung 27 C). Der Hämatokrit-Wert, der in jungen PON2^{-/-}-Mäusen keine Auffälligkeiten zeigte, war in alten PON2^{-/-}-Tieren im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtypen signifikant gesteigert (vergleiche Abbildung 49 D und Abbildung 27 D). Die mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration ließ in den vorliegenden Analysen die größte Abweichung zu jungen Tieren erkennen, denn sie wies in alten PON2^{-/-}-Tieren signifikant verringerte Werte auf, während die Konzentration in jungen PON2 *knock-outs* signifikant gesteigert war (vergleiche Abbildung 49 G und Abbildung 27 G). Die Erythrozytenverteilungsbreite, die in jungen PON2-defizienten Tieren signifikant verringert war, wies in den Analysen älterer Tiere keine Abweichungen vom wildtypischen Normwert mehr auf (vergleiche Abbildung 49 H und Abbildung 27 H).

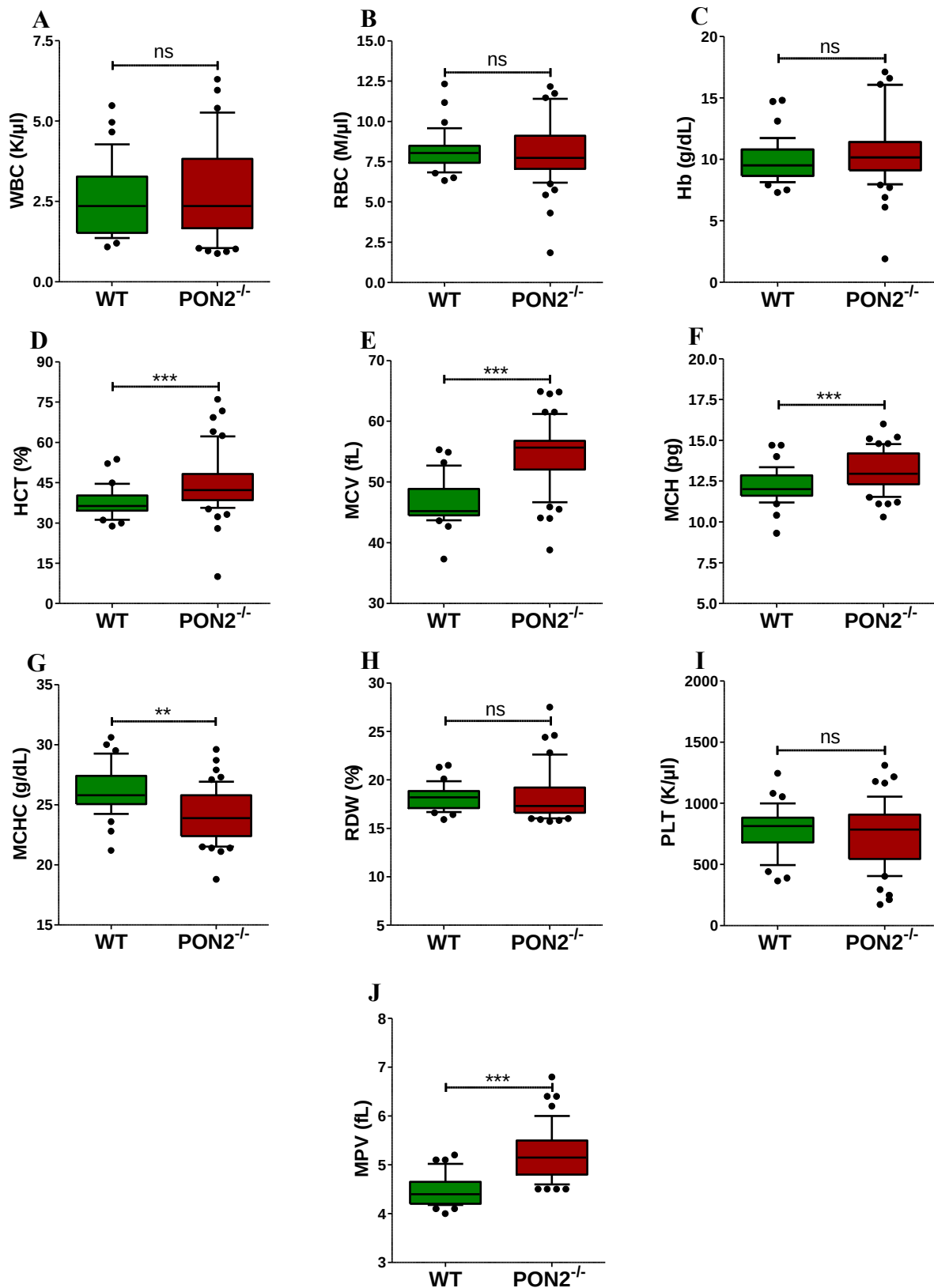


Abbildung 49: Befunde aus Analysen des Blutbildes alter $PON2^{-/-}$ -Mäuse verglichen mit gleichaltrigen Wildtypen. Dargestellt ist (A) die Anzahl der Leukozyten, (B) die Anzahl der Erythrozyten, (C) das Hämoglobin, (D) der prozentuale Hämatokrit-Wert, (E) das mittlere Erythrozytenvolumen, (F) das mittlere zelluläre Hämoglobin, (G) die mittlere zelluläre Hämoglobinkonzentration, (H) die Erythrozytenverteilungsbreite sowie (I) die Anzahl der Thrombozyten und (J) das Thrombozytenvolumen aus Blut von mehr als 9 Monate alten Wildtyp und $PON2^{-/-}$ -Mäusen. WBC = *white blood cell count*; RBC = *red blood cell count*; Hb = *hemoglobin*; HCT = *hematocrit*; MCV = *mean corpuscular volume*; MCH = *mean cellular hemoglobin*; MCHC = *mean cellular hemoglobin concentration*; RDW = *red blood cell distribution width*; PLT = *platelet count*; MPV = *mean platelet volume*. Box-Diagramm. Median $\pm$ unteres/oberes Quartil mit 10/90 Wert; Ausreißer = Kreise; n = 78-113. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s. = nicht signifikant; T-Test.

5.4.1.2.1 Veränderte my/ly-Verteilung im Blut alter $PON2^{-/-}$ -Mäuse weist auf Immunseneszenz hin

Wie in 1.3.2.2 und 5.4.1 bereits angesprochen, führt der während des Alterungsprozesses stattfindende Zuwachs an reaktiven Sauerstoffspezies zu einem Verschiebung der Differenzierungsrichtung hämatopoetischer Stammzellen. Infolge dessen terminieren die HSPCs alter Tiere in mehr myeloische und weniger lymphatische Zellen. Der dadurch entstehende Mangel an Lymphozyten und die resultierende Schwächung des Immunsystems werden auch als Immunseneszenz bezeichnet.

Aufgrund der in Abschnitt 5.3.3.1 beschriebenen gesteigerten ROS-Produktion in HSPCs junger $PON2$ -defizienter Mäuse sollte innerhalb der vorliegenden Arbeit ermittelt werden, ob das Ausmaß der Verschiebung hin zur myeloischen Reihe (*myeloid skewing*) in alten $PON2^{-/-}$ -Tieren stärker ausgeprägt ist als in gleichaltrigen Wildtypen.

In Abbildung 50 ist deutlich zu erkennen, dass mehr als 9 Monate alte $PON2^{-/-}$ -Tiere in Relation zu Wildtypen eine signifikant gesteigerte prozentuale Anzahl myeloider Zellen aufwiesen. Der Unterschied zwischen den beiden Genotypen belief sich dabei auf mehr als 10 %. Im direkten Vergleich der myeloid/lymphoid-Verteilung alter und junger Mäuse konnte außerdem festgestellt werden, dass in Wildtypen ein Wandel von durchschnittlich etwa 75 % lymphoider Zellen in jungen zu durchschnittlich etwa 65 % in alten Tieren durchlaufen wurde, während in $PON2$ -defizienten Tieren eine stärkere Dezimierung der lymphoiden Zellen von etwa 73 % in jungen zu etwa 55 % in älteren Tieren aufgedeckt wurde (vergleiche Abbildung 50 und Abbildung 28).

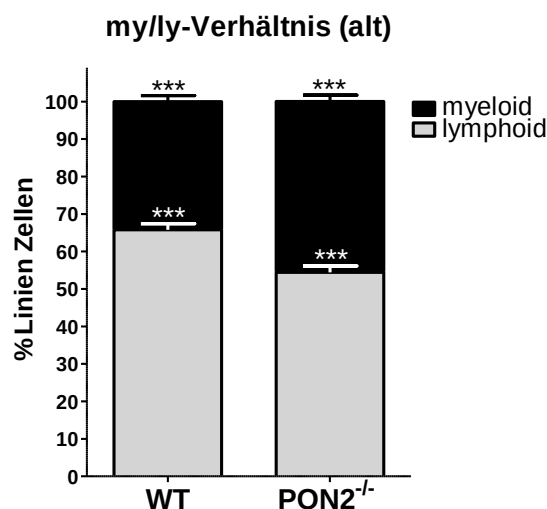


Abbildung 50: Veränderte myeloid/lymphoid-Verteilung im Blut alter $PON2^{-/-}$ -Mäuse im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtypen. Die beiden Säulen zeigen jeweils den prozentualen Anteil lymphoider (B-, T-, NK-Zellen) und myeloider (MO, NE, EO, BA) Leukozyten innerhalb des Blutes von mehr als 9 Monate alten WT- und $PON2^{-/-}$ -Mäusen. n = 37-50; NK = *natural killer cells*, MO = Monozyten, NE = neutrophile Granulozyten, EO = eosinophile Granulozyten, BA = basophile Granulozyten. Mittelwert + SEM; *** p<0,001; T-Test.

5.4.1.3 Alte $PON2^{-/-}$ -Tiere zeigen eine verringerte Anzahl verschiedener Erythrozyten-Vorläufer im Knochenmark

Aufgrund der Erhaltung des gesteigerten Erythrozytenvolumens in mehr als 9 Monate alten $PON2$ -defizienten Mäusen, das in Kombination mit der verringerten MCHC auf eine potenzielle Störung der Erythropoese hinwies, wurde in der vorliegenden Arbeit, analog zu den Analysen in jüngeren Tieren, der prozentuale Anteil verschiedener Erythrozyten-Entwicklungs-stufen im Knochenmark bestimmt.

Im Anschluss an die Isolierung und Färbung der Knochenmarkzellen aus alten $PON2^{-/-}$ - und WT-Mäusen erfolgte eine durchflusszytometrische Quantifizierung der Proerythroblasten, basophilen Erythroblasten und polychromatischen Erythroblasten. Der Vergleich des prozentualen Anteils am Gesamtknochenmark der beiden Genotypen offenbarte eine signifikant verringerte Anzahl an Proerythroblasten (siehe Abbildung 51 A), eine unveränderte Anzahl an basophilen Erythroblasten (siehe Abbildung 51 B) sowie eine signifikant verminderte Anzahl an polychromatischen Erythroblasten (siehe Abbildung 51 C) in alten $PON2^{-/-}$ -Tieren. Dieser Befund stand im Kontrast zu den in Abschnitt 5.3.7.3 beschriebenen quantitativen Analysen der verschiedenen Erythrozyten-Entwicklungsstufen im Knochenmark 10-14 Wochen alter Mäuse, die eine signifikante Steigerung des prozentualen Anteils aller drei analysierter Erythroblasten in $PON2^{-/-}$ -Tieren offenlegten (vergleiche Abbildung 51 A-C mit Abbildung 46 A-C).

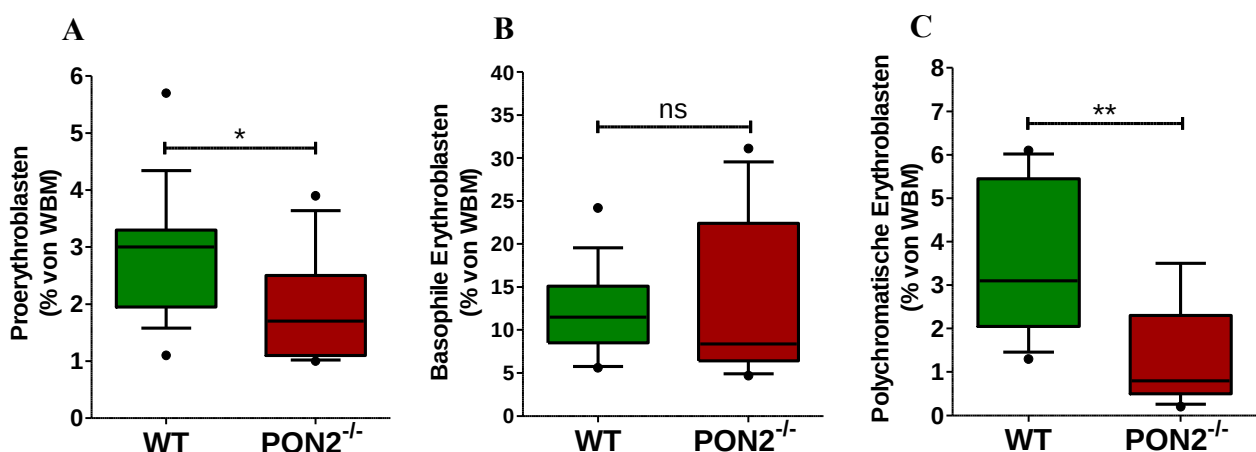


Abbildung 51: Befunde aus der Analyse der verschiedenen Erythrozyten-Entwicklungsstufen im Knochenmark von alten WT- und $PON2^{-/-}$ -Mäusen. Im Anschluss an die Knochenmarksisolierung wurden die Zellen mit den Antikörpern CD71 und Ter119 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Graphen zeigen den prozentualen Anteil von (A) Proerythroblasten (CD71 high/Ter119 mid), (B) basophilen Erythroblasten (CD71 high/Ter119 high) und (C) polychromatischen Erythroblasten (CD71 mid/Ter119 mid). Box-Diagramm. Median ± unteres/oberes Quartil mit 10/90 Wert; n = 11-17. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ns = nicht signifikant; T-Test.

5.4.2 Reziproke Transplantation alter Knochenmarkzellen deckt „Verjüngungseffekte“ sowie Mischeffekte und Effekt-Auflösungen auf

Im Laufe des Alterungsprozesses finden neben zellintrinsischen Modifikationen der HSCs, die deren Funktionalität beeinträchtigen, auch Veränderungen extrinsischer Faktoren, wie des Mikroumfeldes der HSCs, also der Knochenmarknische, statt. Aus diesem Grund wurde innerhalb der Studie die in 5.3.2 beschriebene Generierung von Chimären durch reziproke Knochenmarktransplantation wiederholt, jedoch mit dem Unterschied, dass die transplantierten Knochenmarkzellen von mehr als 9 Monate alten Spendertieren stammten.

Mithilfe dieser Methode konnte einerseits, analog zu der Transplantation des Knochenmarks junger Spendertiere, eine Diskriminierung zwischen zellspezifischen und umgebungsvermittelten Effekten erfolgen, und andererseits konnte eine Aussage darüber getroffen werden, ob das Einbringen alter Knochenmarkzellen in die Mikroumgebung junger Empfängertiere eine Verminderung der altersbedingten Effekte und somit eine „Verjüngung“ (*rejuvenation*) der Zellen zur Folge hat.

Drei Wochen nach der Injektion der Zellen alter Spender in junge Empfängertiere wurde zunächst das *Engraftment* der Zellen verifiziert, indem die PON2-mRNA-Expression in peripheren Blutzellen mittels qRT-PCR analysiert wurde. Als Referenz für die verschiedenen Versuchsgruppen diente dabei die Expression in WT/WT Kontrolltieren.

In Abbildung 52 ist deutlich zu erkennen, dass die in peripheren Blutzellen ermittelten PON2-mRNA-Level der erwarteten Wiederherstellung bzw. Deletion der PON2-Expression in den hämatopoetischen Zellen der Empfängertiere entsprachen. Dieses Ergebnis bestätigte den Erfolg der Generierung von reziproken Chimären und erfüllte somit die nötige Voraussetzung für die durchflusszytometrische quantitative Analyse der Knochenmarkzellen und die labormedizinische Analyse des Vollblutes der Empfängertiere.

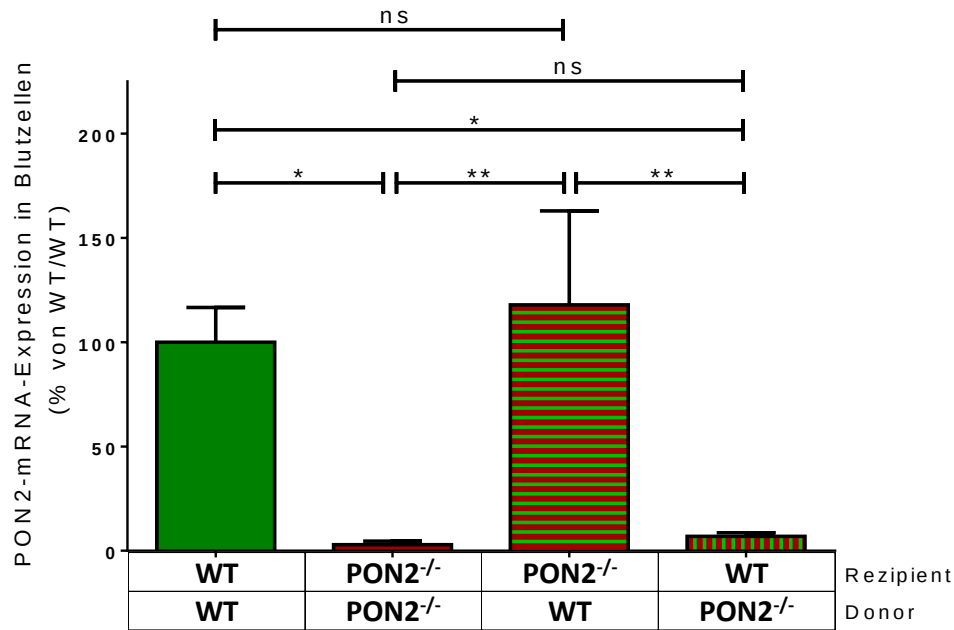


Abbildung 52: Überprüfung des *Engraftments* in Kontrolltieren und Chimären, transplantiert mit Zellen aus alten Knochenmarkspendern. Zur Verifizierung der Einnistung des Spenderknochenmarks in die Empfängertiere und der damit verbundenen re-Initiierung der Hämatopoese durch die Spenderzellen wurden qRT-PCR-Analysen durchgeführt. Dafür wurden allen Individuen der verschiedenen Versuchsgruppen 3 Wochen nach der Transplantation Vollblut-Proben entnommen. Anschließend wurden die im Vollblut befindlichen Blutzellen isoliert und der PON2-mRNA-Expressionslevel mittels qRT-PCR bestimmt. Die Expressionsraten wurden auf Gapdh und β -Actin normalisiert und sind im Graph als % von WT/WT dargestellt; n= 4-5; Mittelwert + SEM. * p<0,05; ** p<0,01; n.s., nicht signifikant; One-way ANOVA mit Bonferroni's multiple comparison test.

Insgesamt legten die quantitativen Analysen der Knochenmarkzellen aus kontrolltransplantierten Tieren sowie reziproken Chimären am Durchflusszytometer hauptsächlich zuvor angesprochene „Verjüngungseffekte“ sowie Mischeffekte offen. Zellspezifische- sowie reine Nischeneffekte konnten nicht aufgedeckt werden.

Im Einzelnen zeigte die Analyse des prozentualen Anteils der LT-HSCs Mischeffekte an, da die in kontrolltransplantierten und in naiven PON2^{-/-}-Tieren beobachtete signifikante Steigerung der Zellzahl im Vergleich zum Wildtyp in Chimären, denen PON2^{-/-}-Knochenmarkzellen transplantiert wurden, nicht mehr erkennbar war (siehe Abbildung 53 A und Abbildung 48 A). Ebenfalls Mischeffekte wurden in der prozentualen Anzahl der MPPs detektiert. Auch hier war die in kontrolltransplantierten und naiven PON2^{-/-}-Tieren aufgedeckte signifikante Expansion der Zellzahl in Chimären nicht konserviert (siehe Abbildung 53 C und Abbildung 48 C). Neben dem Mischeffekt, der ebenfalls in der prozentualen Anzahl früher B-Zellen im Gesamt-knochenmark abzulesen war, zeigte diese Subpopulation einen Transplantationseffekt. Die signifikante Steigerung der Zellzahl in PON2^{-/-}-kontrolltransplantierten Tieren stand im Kontrast zu einer unveränderten Zellzahl in

naiven Tieren (siehe Abbildung 53 H und Abbildung 48 I). Andere Zellpopulationen, in diesem Fall reife Myelozyten und proliferierende Zellen, wiesen sowohl in Kontrolltieren als auch in reziproken Chimären und naiven, mehr als 9 Monate alten Tieren keine Effekte auf, weshalb an dieser Stelle keine Aussage über zellspezifische bzw. Nischeneffekte getroffen werden konnte (siehe Abbildung 53 G und K sowie Abbildung 48 H und K). Erythrozyten-Vorläuferzellen ließen in Kontrolltieren, analog zu naiven Tieren, keine Änderung der prozentualen Zellzahl erkennen, während der Vergleich der reziproken Chimären mit WT- bzw. $PON2^{-/-}$ -Knochenmark eine signifikante Steigerung des Anteils an Wildtyp Erythrozyten-Vorläufern in der $PON2^{-/-}$ -Mikroumgebung anzeigte (siehe Abbildung 53 J und Abbildung 48 J). Jegliche noch nicht genannten Subpopulationen des Knochenmarks wiesen sowohl in kontrolltransplantierten Tieren als auch in Chimären sogenannte „Verjüngungseffekte“ auf. Dieser Begriff beschreibt die Gegebenheit, dass im Anschluss an eine Transplantation von Knochenmarkszellen aus alten Spendertieren in junge Empfängertiere, die in alten naiven Tieren beobachteten Effekte nicht, oder nur zum Teil, konserviert sind, da eine Annäherung an die in jungen Tieren vorliegenden Effekte stattfindet. Somit wies das Auftreten dieser „Verjüngungseffekte“ auf eine in verschiedenen Studien beschriebene, wichtige Rolle der alternden Nische bei der Entstehung der in alternden HSC beobachteten Effekte hin ^{165, 166}. Zu jenen Zellpopulationen, die Anzeichen dieser „Verjüngung“ aufwiesen, zählten die ST-HSCs, CMPs, MEPs, GMPs und T-Vorläuferzellen. Sowohl die ST-HSCs als auch die verschiedenen oligopotenten Vorläuferzellen der myeloischen Reihe (CMPs, MEPs und GMPs) lagen in naiven mehr als 9 Monate alten $PON2^{-/-}$ -Tieren in signifikant gesteigerter prozentualer Anzahl vor, während dieser Effekt im Anschluss an die Injektion der Zellen in junge Empfängertiere nicht mehr signifikant, in CMPs, MEPs und GMPs jedoch noch numerisch, nachgewiesen werden konnte (vergleiche Abbildung 53 B, D, E und F mit Abbildung 48 B, D, E und F). Umgekehrt wies die prozentuale Anzahl an T-Vorläuferzellen in naiven, alten $PON2^{-/-}$ -Tieren als Konsequenz der Verschiebung des myeloid/lymphoid-Verhältnisses (siehe Abbildung 50) eine signifikante Verringerung auf, die im Anschluss an die Transplantation des Knochenmarks in junge Empfängertiere ebenfalls nicht mehr detektiert wurde (vergleiche Abbildung 53 I und Abbildung 48 G).

Diese Ergebnisse zeigen, dass das Mikroumfeld bei der Ausprägung der in alten $PON2^{-/-}$ -Mäusen beobachteten Effekte eine zunehmend wichtige Rolle spielt.

Ergebnisse

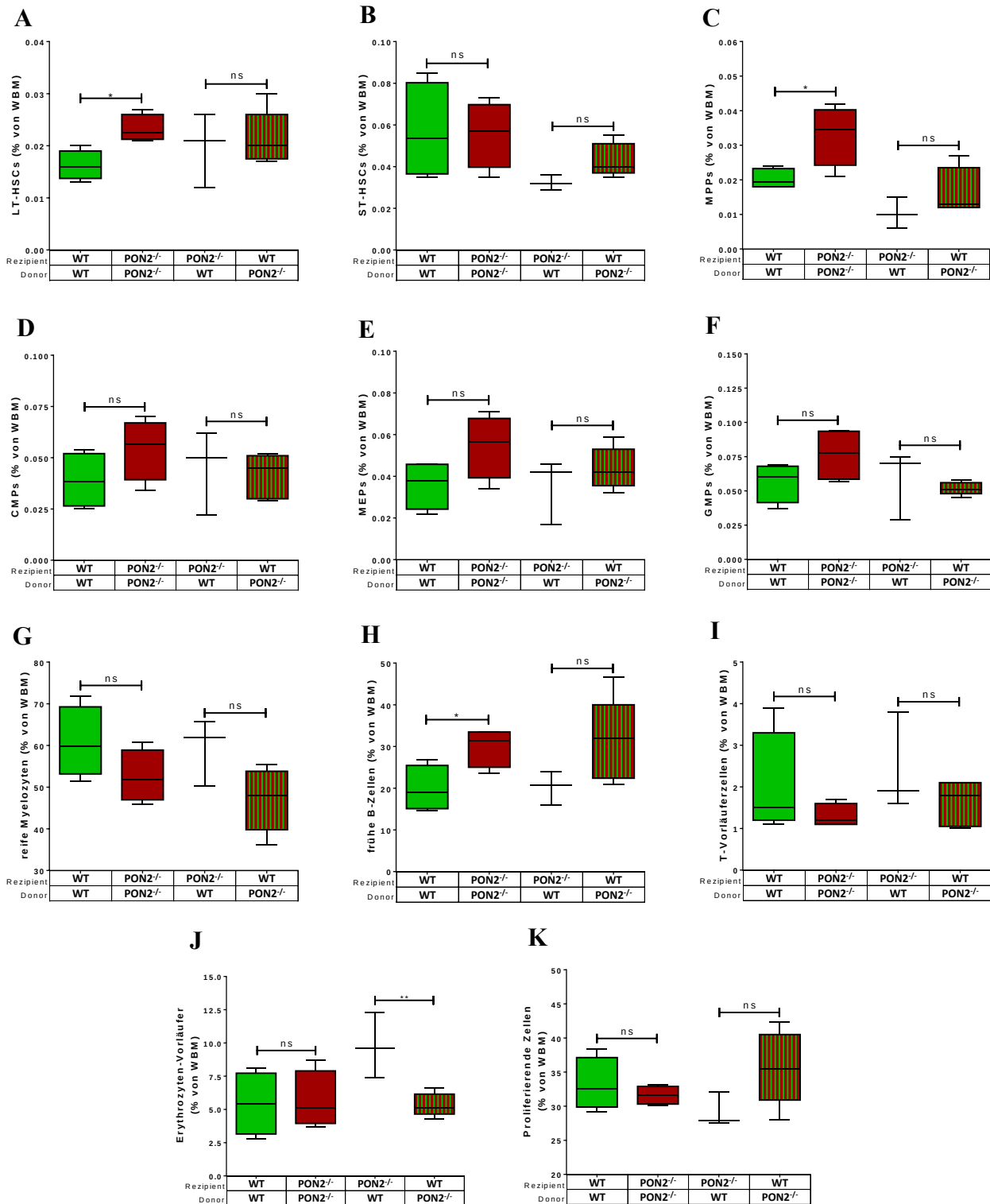


Abbildung 53: Befunde aus Analysen der Knochenmarkszellen von Kontrolltieren sowie Chimären, transplantiert mit Zellen aus alten Knochenmarkspendern. Drei Wochen nach der reziproken Transplantation wurden die Knochenmarkszellen der Empfängertiere isoliert, mittels Oberflächenmarkern gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Die Graphen zeigen den prozentualen Anteil der (A) LT-HSCs, (B) ST-HSCs, (C) MPPs, (D) CMPs, (E) MEPs, (F) GMPs, (G) reifen Myelozyten, (H) frühen B-Zellen, (I) T-Vorläuferzellen, (J) Erythrozyten-Vorläufer und (K) proliferierenden Zellen bezogen auf die Gesamtzahl an Knochenmarkszellen (WBM = *whole bone marrow*) aus Chimären und Kontroll-Mäusen. Box-Diagramm. Median $\pm$ unteres/oberes Quartil mit 10/90 Wert; Ausreißer = Kreise; n = 3-5. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; n.s. = nicht signifikant; T-Test.

Analog zu den Analysen im Anschluss an die reziproke Transplantation junger Knochenmarkzellen (siehe Abschnitt 5.3.2) wurde in den hier beschriebenen Studien im Anschluss an die reziproke Transplantation alter Knochenmarkzellen neben dem prozentualen Anteil der verschiedenen Subpopulationen innerhalb des Gesamtknochenmarks das Blutbild der beiden Kontrollgruppen sowie beider reziproker Gruppen untersucht.

Zu diesem Zweck wurde den Versuchstieren mittels Herzpunktion oder Punktion des retrobulbären Venenplexus Blut entnommen und anschließend an einem Sysmex-Gerät analysiert.

Die Untersuchungen ergaben hauptsächlich Effekt-Auflösungen, was in Abbildung 54 bereits bei flüchtiger Inaugenscheinnahme zu erkennen ist. Am deutlichsten wurde diese Auflösung der in naiven Tieren vorhandenen Effekte am Beispiel des Erythrozytenvolumens (MCV). Sowohl in jungen als auch in alten naiven $PON2^{-/-}$ -Tieren konnte ein signifikant gesteigertes MCV ermittelt werden (siehe Abbildung 27 E und Abbildung 49 E), welches jedoch weder in kontrolltransplantierten Tieren noch in Chimären, transplantiert mit Knochenmark aus alten Spendern, konserviert war (siehe Abbildung 54 E). Ähnliches lies auch das Thrombozytenvolumen (MPV) erkennen, jedoch war der in naiven Tieren aufgedeckte und in kontrolltransplantierten Tieren ausbleibende Effekt hier in den Chimären erkennbar (vergleiche Abbildung 54 J und Abbildung 49 J). Ein gleichartiger Effekt konnte bei der Betrachtung des Hämatokrit-Wertes (HCT) sowie der mittleren zellulären Hämoglobinkonzentration (MCHC) festgestellt werden. Auch in diesen Fällen fehlte der in naiven Tieren festgestellte Effekt in den Transplantationskontrollen, während er in den Chimären vorhanden war (vergleiche Abbildung 49 und Abbildung 54 D und G). Eine weitere Effektauflösung konnte bei Betrachtung des mittleren zellulären Hämoglobins (MCH) in Kontrolltieren im Vergleich zu naiven Tieren identifiziert werden. Der Unterschied, der gegenüber den drei zuvor beschriebenen Parametern auffiel, war jener, dass der in den Chimären auftretende Effekt das Gegenteil des Effektes in naiven Tieren darstellte. In alten, naiven Mäusen konnte wie in Abbildung 49 F zu erkennen, eine Steigerung des MCH festgestellt werden, während die mit dem Knochenmark alter Spender reziprok transplantierten Tiere eine Verringerung des MCH aufwiesen (siehe Abbildung 54 F). Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Variablen wurden verschiedenen Parameter identifiziert, die weder in naiven noch in transplantierten Tieren Modifikationen aufwiesen. Zu diesen Parametern zählte die Anzahl der Erythrozyten (RBC), der Leukozyten (WBC) und der Thrombozyten (PLT) sowie das Gesamt-Hämoglobin (Hb) (vergleiche Abbildung 54 und Abbildung 49 A, B, C, I). Analog zu den Analysen der mit jungen Knochenmarkzellen reziprok transplantierten Tiere (siehe Abschnitt 5.3.2) war der RDW-Wert auch in diesen Analysen der einzige Parameter, der deutlich auf einen rein umgebungsvermittelten Effekt hinwies (siehe Abbildung 54 H).

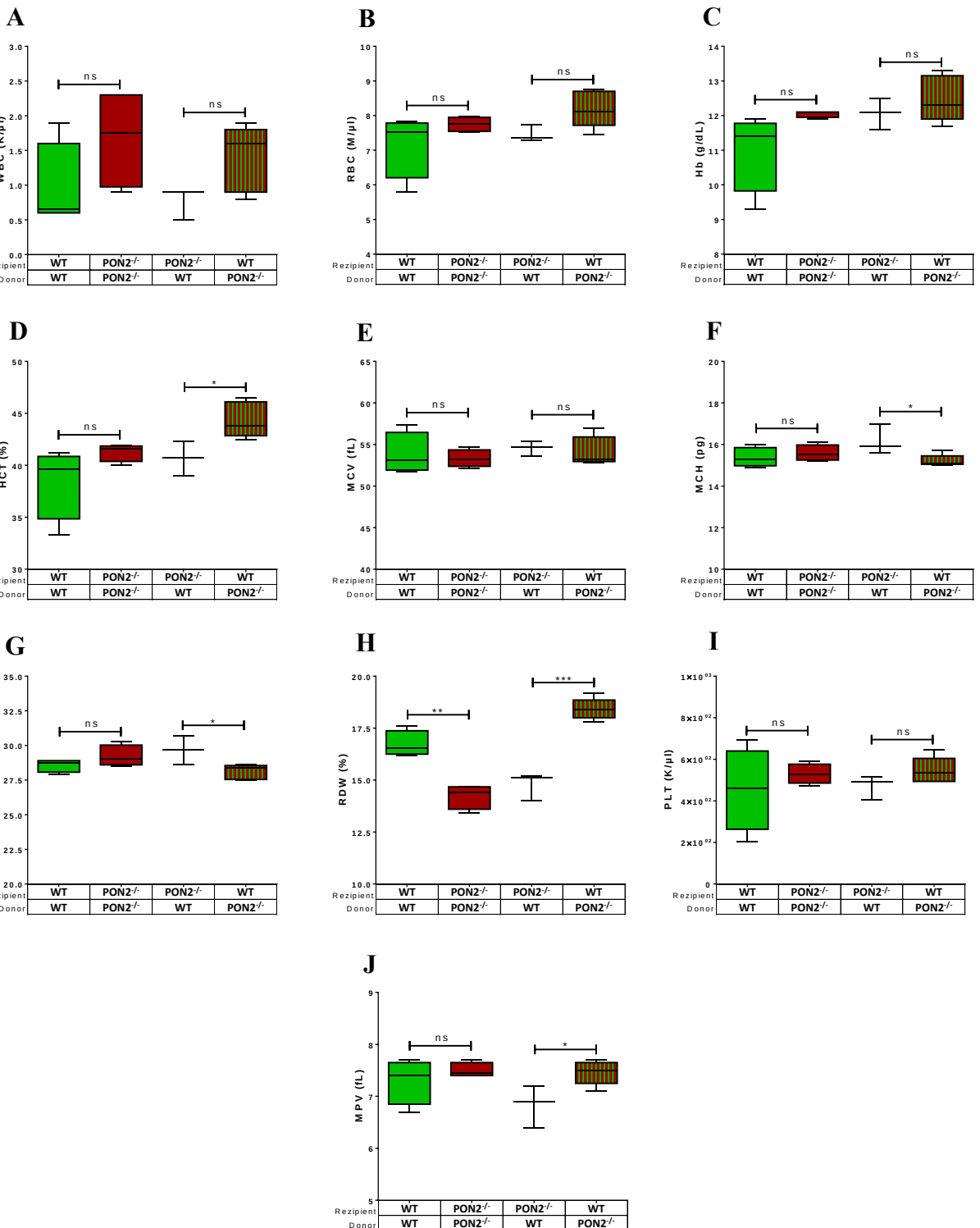


Abbildung 54: Befunde aus Analysen des Blutbildes der Kontrolltiere sowie der reziproken Chimären, transplantiert mit Zellen aus alten Knochenmarkspendern. Drei Wochen nach der reziproken Transplantation mit dem Knochenmark alter Spender wurden den Empfängertieren Blutproben entnommen und an einem Sysmex-Gerät labormedizinisch untersucht. Dargestellt ist (A) die Anzahl der Leukozyten, (B) die Anzahl der Erythrozyten, (C) das Hämoglobin, (D) der prozentuale Hämatokrit-Wert, (E) das mittlere Erythrozytenvolumen, (F) das mittlere zelluläre Hämoglobin, (G) die mittlere zelluläre Hämoglobinkonzentration, (H) die Erythrozytenverteilungsbreite sowie (I) die Anzahl der Thrombozyten und (J) das Thrombozytenvolumen aus Blut von Chimären und Kontroll-Mäusen. WBC = *white blood cell count*; RBC = *red blood cell count*; Hb = *hemoglobin*; HCT = *hematocrit*; MCV = *mean corpuscular volume*; MCH = *mean cellular hemoglobin*; MCHC = *mean cellular hemoglobin concentration*; RDW = *red blood cell distribution width*; PLT = *platelet count*; MPV = *mean platelet volume*. Box-Diagramm. Median $\pm$ unteres/oberes Quartil mit 10/90 Wert; Ausreißer = Kreise; n = 3-5. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s. = nicht signifikant; T-Test.

5.4.3 Gesteigerter ROS-Level in HSPCs alter $PON2^{-/-}$ -Tiere

Trotz der in Abschnitt 5.4.2 dargestellten zunehmend wichtigen Rolle der Knochenmarknische bei der Manifestation der in alten Tieren beobachteten Effekte, deuten die häufig identifizierten Mischeffekte auf eine mindestens gleichgestellte Bedeutung des intrazellulären *signalings* hin.

Aus diesem Grund wurde analog zu den Analysen in jungen Tieren (siehe Abschnitt 5.3.3.1) der intrazelluläre ROS-Level hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen mithilfe des Indikators CM- H_2DCFDA untersucht.

Die Ergebnisse dieser Analysen wiesen gewisse Abweichungen zu der in Abbildung 32 dargestellten Auswertung des ROS-Levels in HSPCs junger Tiere auf. Während in jungen $PON2^{-/-}$ -Tieren ein signifikanter Anstieg des ROS-Levels in ST-HSCs und ein numerischer Anstieg in MPPs festgestellt wurde, wiesen ältere Tiere numerisch gesteigerte ROS-Level in allen drei Subpopulationen innerhalb der LSK-Fraktion auf. Aufgrund der starken Schwankungen der Messwerte in $PON2^{-/-}$ -Zellen und der geringen Stichprobenzahl konnte jedoch in keiner der Subpopulationen eine statistische Signifikanz verzeichnet werden (siehe Abbildung 55).

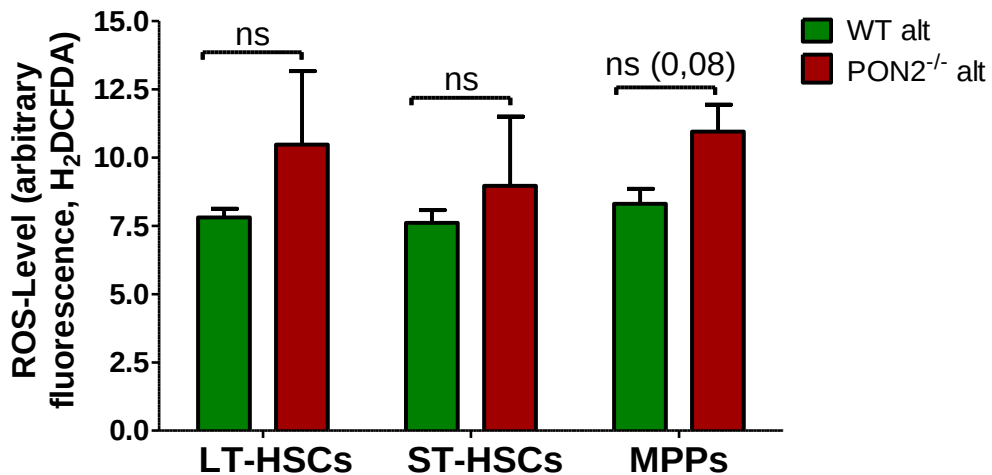


Abbildung 55: Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen aus alten $PON2^{-/-}$ -Mäusen weisen numerisch gesteigerte basale ROS-Level auf. Die verschiedenen Subpopulationen der LSK-Fraktion des Knochenmarks, LT-, ST-HSCs und MPPs, wurden mit zellspezifischen Oberflächenmarkern sowie CM- H_2DCFDA gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dabei wurde die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes nach der Reaktion mit ROS detektiert. Das Säulendiagramm zeigt die Quantifizierung der H_2DCFDA -Fluoreszenzintensität in HSPCs. $n = 3$, Mittelwert + SEM; n.s.= nicht signifikant; T-Test.

5.4.4 Oxidativer Stress bewirkt auch in alten PON2-defizienten Tieren keine Induktion der Apoptose oder gesteigerte DNA-Schädigung in HSPCs

Wie bereits in 1.2.1, 1.3.2.2 sowie 5.3.4 angesprochen, können erhöhte ROS-Level Schäden an Proteinen, Membranen und der DNA verursachen. Da in mehr als 9 Monate alten PON2^{-/-}-Tieren genau wie in jungen PON2-defizienten Tieren gesteigerte ROS-Level in HSPCs detektiert wurden (siehe Abbildung 32 und Abbildung 55), sollte in diesem Teil des Projektes abgeklärt werden, ob die dauerhafte Belastung der Stamm- und Vorläuferzellen durch ROS während des Alterungsprozesses zu einem vermehrten Auftreten von DNA-Doppelstrangbrüchen sowie zu gesteigerten Apoptoseraten führt.

5.4.4.1 Keine erhöhte Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen in LSK-Zellen alter PON2^{-/-}-Tiere

Verschiedene Studien haben in der Vergangenheit erwiesen, dass es während des Alterungsprozesses in HSC neben der vermehrten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies zu einer vermehrten Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine kommt. Diese beiden Faktoren können Schädigungen der Zellen und somit eine Störung ihrer Funktion herbeiführen. Zu diesen Schädigungen zählt vor allem die DNA-Fragmentierung (siehe Abbildung 6)⁸⁰.

Aus diesem Grund wurde, wie auch in jungen Tieren durchgeführt (siehe Abbildung 34), in alten PON2^{-/-}-Mäusen eine potenzielle DNA-Schädigung, bedingt durch den gesteigerten ROS-Level (siehe Abbildung 55), mithilfe einer durchflusszytometrischen Analyse der γ -H2A.X Phospho-Signalintensität abgeklärt.

Analog zu den in Abbildung 34 dargestellten Ergebnissen der Analysen junger Tieren, konnte jedoch auch in den Zellen der LSK-Fraktion älterer PON2-defizienter Tiere keine Steigerung der Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen festgestellt werden (siehe Abbildung 56).

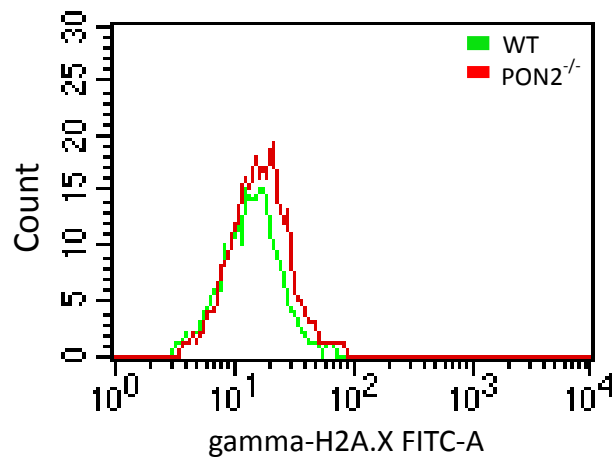


Abbildung 56: Histogramm des gamma-H2A.X Fluoreszenzsignals zur Analyse von DNA-Doppelstrangbrüchen in LSK-Zellen aus alten Mäusen. Im Anschluss an die Messung der mittels Oberflächenmarkern sowie dem Antikörper gamma-H2A.X gefärbten LSK-Zellen aus mehr als 9 Monate alten PON2^{-/-} und WT-Mäusen an einem FACSCanto™ II-Durchflusszytometer, erfolgte die Auswertung der Daten mithilfe der FACSDiva Software. Dabei wurde ein Histogramm der Zellzahl gegen die γ -H2A.X Phospho-Signalintensität erstellt. Um die Ergebnisse der Messungen von PON2^{-/-} und WT-Knochenmarkszellen besser vergleichen zu können, wurde anschließend mithilfe der CellQuest Pro Software ein *Overlay* von jeweils 2 Histogrammen erstellt. Repräsentatives Beispiel. n = 2.

5.4.4.2 Signifikant verringerte Apoptoseraten in hämatopoetische Stammzellen alter PON2-defizienter Mäuse

Als Konsequenz des altersbedingten Anstiegs des ROS-Levels in HSCs, wurde in verschiedenen Studien eine Inhibierung von SIRT1 (Sirtuin-1) und eine Aktivierung von p53 festgestellt, die zu einer gesteigerten Apoptoserate sowie HSC Seneszenz beitragen^{80, 167-169}.

Da die Anzahl an apoptotischen LT-HSCs in jungen PON2-defizienten Tieren signifikant verringert war, während die Apoptoserate in ST-HSCs unverändert blieb (siehe Abbildung 35), sollten diese mittels Annexin V-Färbung durchgeführten Analysen an LT- und ST-HSCs älterer Tiere wiederholt werden. Auf diese Weise sollte festgestellt werden, ob der in jungen Tieren beobachtete Effekt während der Alterung konserviert bleibt oder ob es zu einer Angleichung bzw. zu einer Umkehr des Effektes kommt.

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen der HSCs mehr als 9 Monate alter PON2^{-/-} und WT-Tiere ergaben analog zu den Analysen jüngerer Tiere eine signifikant verringerte prozentuale Anzahl Annexin V positiver LT-HSCs aus PON2^{-/-}-Mäusen (siehe Abbildung 57 A). Im Kontrast zu den genannten Analysen jüngerer, wurde in älteren PON2-defizienten Tieren zusätzlich eine Verringerung der Apoptoserate in ST-HSCs festgestellt (siehe Abbildung 57 B).

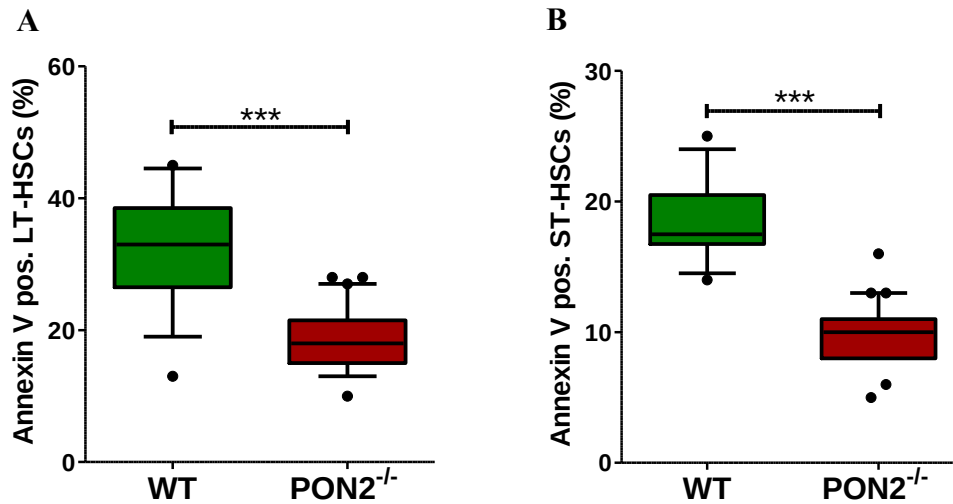


Abbildung 57: Veränderte Apoptoserate in LT- und ST-HSCs alter PON2^{-/-}-Mäuse. Gezeigt wird die prozentuale Anzahl Annexin V positiver (A) LT-HSCs und (B) ST-HSCs von mehr als 9 Monate alten WT- und PON2^{-/-}-Mäusen. Box-Diagramm. Median ± unteres/oberes Quartil mit 10/90 Wert; Ausreißer = Kreise; n = 14-29. ***p < 0,001; T-Test.

5.4.5 Gesteigerte Überlebensrate von Empfängertieren alter PON2^{-/-}-BMCs nach serieller Knochenmarktransplantation

Neben einer Expansion der verschiedenen HSC Subpopulationen sowie erhöhten ROS-Leveln und der in 1.3.2.2 und 5.4.1.2.1 beschriebenen Verschiebung der Differenzierungsrichtung von HSCs hin zu einer Terminierung in mehr myeloide und weniger lymphoide Zellen, wurde in verschiedenen Studien anhand von Transplantationsversuchen eine verringerte Repopulations-fähigkeit alter HSCs festgestellt^{82, 90}. Um analysieren zu können, ob Knochenmarkzellen, isoliert aus mehr als 9 Monate alten PON2-defizienten Mäusen, als Folge ihres gesteigerten ROS-Levels (siehe 5.4.3) eine gegenüber gleichaltrigen Wildtypen verringerte biologische Funktionalität, also ein verringertes Repopulationsvermögen, aufweisen, wurde innerhalb der vorliegenden Arbeit eine serielle Transplantation durchgeführt.

Wie in Abschnitt 4.3.4.3 beschrieben, wurde das aus alten Spendertieren isolierte WT- und PON2^{-/-}-Knochenmark in letal bestrahlte Empfängermäuse transplantiert, nach drei Wochen bereits wieder isoliert und anschließend ein zweites Mal mittels intravenöser Injektion in zuvor letal irradierte Empfängertiere eingebracht. Durch die beiden innerhalb kürzester Zeit durchgeführten Transplantationen sollte erhöhter Repopulationsstress auf die Stammzellen ausgeübt werden. Als Maß der Repopulationsfähigkeit der Stammzellen des jeweiligen Genotyps, wurde die Überlebenszeit bzw. die Überlebensrate der Empfängertiere retransplanterter, alter Knochenmarkzellen betrachtet.

Die Analysen ergaben eine gesteigerte prozentuale Überlebensrate jener Empfängertiere des Retransplantationsversuches, denen PON2-defiziente Knochenmarkszellen aus alten Spender-tieren injiziert wurden (siehe Abbildung 58). Dieses Ergebnis deckt sich mit dem in 5.3.6 beschriebenen Resultat der kompetitiven Transplantation junger Knochenmarkszellen, in der eine gesteigerte Leistungsfähigkeit junger PON2^{-/-}-Stammzellen bei der Re-initiierung der Hämatopoese festgestellt werden konnte (siehe Abbildung 39). Zusammengefasst demonstrieren diese beiden Versuche, dass der erhöhte Level an reaktiven Sauerstoffspezies in PON2-defizienten HSCs, zumindest in einem Alter zwischen etwa 3 und 9 Monaten, nicht zu einer Regression der biologischen Funktionalität der Stammzellen führt.

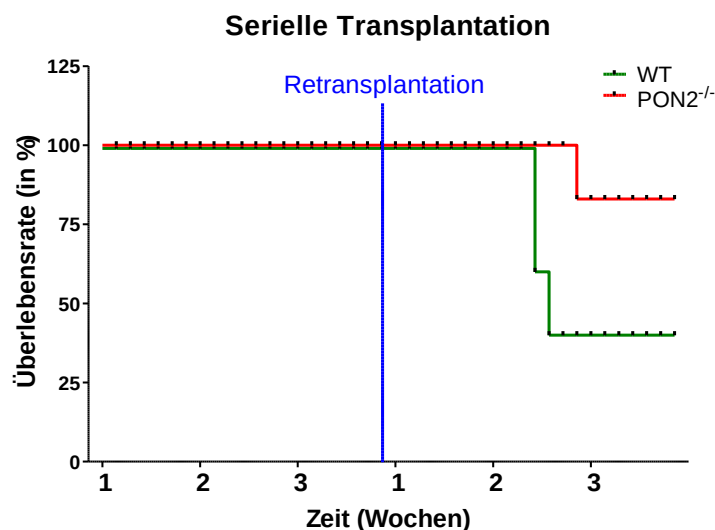


Abbildung 58: Überlebensrate der Empfängertiere im Verlauf der ersten und zweiten Transplantation der Knochenmarkszellen aus mehr als 9 Monate alten WT- und PON2^{-/-}-Spendertieren. Zunächst wurde das Knochenmark aus alten Spendertieren isoliert, gezählt und anschließend mittels intravenöser Injektion in zuvor irradierte Empfängertiere eingebracht. Drei Wochen nach dieser ersten Transplantation, dienten die ursprünglichen Empfängertiere als Donoren für die zweite Transplantation. Dabei wurde das isolierte Knochenmark erneut in letal bestrahlte Empfängertiere transplantiert. Der abgebildete Graph zeigt die Überlebenszeit bzw. die prozentuale Überlebensrate der Empfängertiere der ersten Transplantation alten Knochenmarks sowie der Empfängertiere der Retransplantation jener Knochenmarkszellen. n = 5-6.

5.5 Transkriptom-Analysen identifizieren mehr als 300 differentiell exprimierte Gene in PON2^{-/-}-LT-HSCs

Zusätzlich zu den morphologischen, quantitativen und funktionellen Analysen der verschiedenen Zellpopulationen aus PON2-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtypen wurden molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt. Durch eine Sequenzierung der RNA zuvor sortierter LT-HSCs aus etwa 12 Wochen alten WT- und PON2^{-/-}-Mäusen (siehe 4.2.5 und 4.1.4.1) sollte das jeweilige Transkriptionsprofil erforscht werden. Diese Analysen erfolgten in Kooperation mit Piyush Moore (Institut für Pharmakologie, Universitätsmedizin der JGU Mainz).

5.5.1 RNA Sequenzierung und Ausrichtung (*alignment*)

Wie in Abschnitt 4.2.5 kurz angesprochen, wurde im Anschluss an die *Next-Generation*-Sequenzierung zunächst die Sequenzdaten-Qualität mithilfe des Programms FastQC (*Babraham Bioinformatics*) validiert. Unmittelbar danach wurde das „Trimmen“ der Sequenzierungsreads sowie das *alignment* der Sequenzdaten mit dem Referenzgenom der Maus durchgeführt. Die Gesamtzahl an qualitativ hochwertigen, eindeutig zugeordneten *reads* reichte von 21,1 bis 32,6 Millionen *reads*. Der Prozentsatz der *reads*, die dem Mausgenom zugewiesen werden konnten, belief sich auf 67,4 bis 75,8 %. Zur Bestimmung der differentiell exprimierten Gene erfolgte anschließend mithilfe des DESeq2 *packages* eine Analyse der Anzahl der *reads* für die jeweiligen Transkripte. Als signifikant verändert wurden diejenigen Gene klassifiziert, deren p-Wert kleiner als 0,05 war. Auf diese Weise konnten insgesamt 305 differentiell exprimierte Gene identifiziert werden (siehe Anhang). 168 dieser Gene waren in PON2-defizienten LT-HSCs herunterreguliert, 137 Gene induziert. In Abbildung 60 wurden diese als differentiell exprimiert eingeordneten Gene als *vulcano plot* graphisch dargestellt. Im Kontrast zu der beschriebenen DESeq2-Analyse wurden durch das Programm edgeR lediglich 29 differentiell exprimierte Gene identifiziert, 19 davon waren induziert und 10 reprimiert. Da jegliche durch edgeR identifizierten Gene ebenfalls von DESeq2 registriert wurden, wurden alle weiteren Analysen dieser Arbeit mithilfe des DESeq2 Datensatzes durchgeführt.

In einer hierarchischen Clusteranalyse konnte gezeigt werden, dass sich die Expressionsprofile der PON2^{-/-}-Mäuse sowie der WT-Kontrollen zwar geringfügig unterscheiden, jedoch nicht in zwei eindeutig differenzierbaren Gruppen bündeln. Insbesondere die Daten der Tiere „*ko*“ und „*control*“ hoben sich von den übrigen Tieren ab (siehe Abbildung 59).

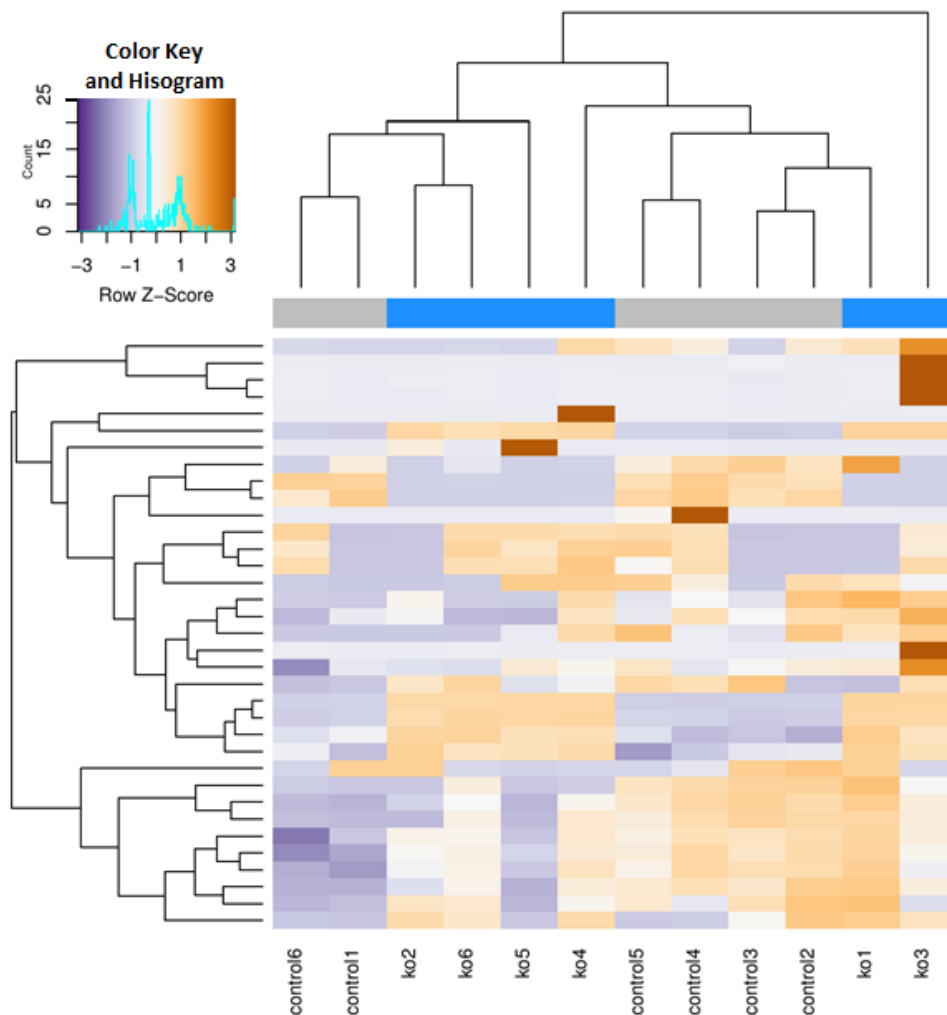


Abbildung 59: Expressionsmuster der LT-HSCs von PON2 *knock-out* (ko 1-6) und Wildtyp-Mäusen (control 1-6). Die *heatmap* zeigt, dass sich die Expressionsprofile der PON2-defizienten LT-HSCs von denen der sechs Wildtypen unterscheiden lassen. Die Individuen *control 1* und *ko 1* weisen allerdings leichte Abweichungen zu den übrigen Vertretern ihres Genotyps auf. Dargestellt sind die 305 differentiell exprimierten Gene mit einem p-Wert $< 0,05$ (168 herunterreguliert, 137 hochreguliert). Sowohl die Individuen (Spalten) als auch die einzelnen Gene (Zeilen) wurden nach ihrer Ähnlichkeit in der Expression angeordnet.

Der zuvor kurz angesprochene Vulkan-Plot (*volcano plot*) ist eine besondere Form des Streudiagramms und wird häufig zur schnellen Identifizierung von Veränderungen in großen Datensätzen verwendet. Auf der Y-Achse wird der negative dekadische Logarithmus des p-Wertes aufgetragen. Dies führt dazu, dass Datenpunkte mit niedrigem p-Wert, also hoher Signifikanz, im oberen Teil des Graphen erscheinen. Auf der X-Achse wird der Logarithmus der x-fachen Änderung (*fold change*) zwischen den beiden Versuchsgruppen aufgetragen. Dieser Wert wurde gewählt, um Änderungen in beide Richtungen abstandsgleich zur Mitte darstellen zu können. Die derartige Darstellung der Daten resultiert in zwei *regions of interest* innerhalb des Plots: Jene Punkte, die sehr weit oben im Plot und außerdem weit rechts oder weit links zu finden sind. Sie repräsentieren Werte, die eine große *fold change* und zusätzlich eine hohe statistische Signifikanz aufweisen.

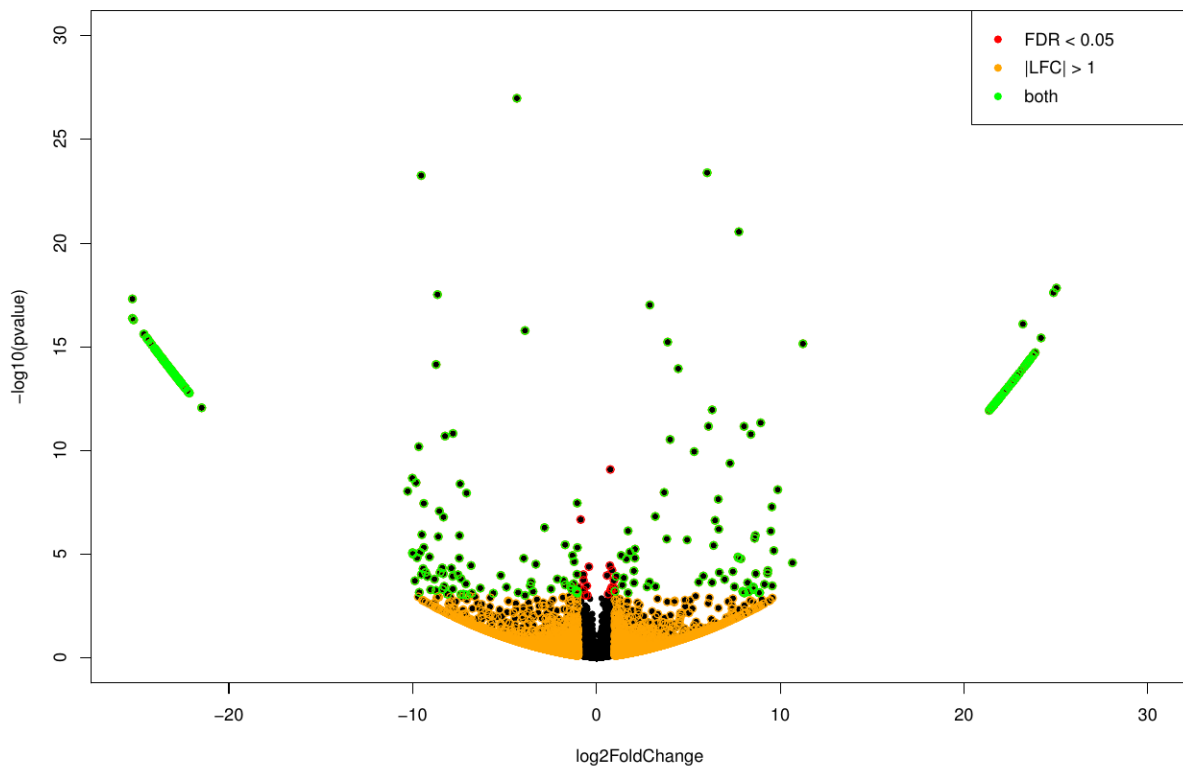


Abbildung 60: Vulkan-Plot (volcano plot) erstellt mit den Daten der RNA-Sequenzierung von WT- und PON2^{-/-}-LT-HSCs. Der Graph zeigt die Signifikanz (negativer dekadischer Logarithmus des p-Wertes, $-\log_{10}(pvalue)$) jedes Prüfsatzes relativ zur x-fachen Änderung (fold change).

5.5.2 Pathway Analyse unter Verwendung der *Ingenuity Pathway Analysis Software* (IPA®)

Die 305 mittels DESeq2 identifizierten differentiell exprimierten Gene wurden im nächsten Schritt in die *Ingenuity* Software eingespeist und ausgewertet. Die Software generiert automatisch einen p-Wert von $< 0,05$ als signifikantes Kriterium. Dieser p-Wert wird mithilfe des Exakten Fisher-Tests (*right-tailed*) berechnet. Die verschiedenen Tools der Software ermöglichen es, die Gene von Interesse in einen komplexen Zusammenhang einzuordnen.

Um eine Übersicht der funktionellen Zusammenhänge der Moleküle zu erhalten, wurden primär die *Canonical Pathways* fokussiert und ausgewertet. Insgesamt wurden durch *Ingenuity* mit dem vorliegenden Datensatz 21 Netzwerke generiert, an denen die differentiell exprimierten Gene beteiligt sind. Die in den 21 Netzwerken am häufigsten auftretenden Kategorien waren *Hematological System Development and Function*, *Cell Cycle*, *Cell Death and Survival*, *Cellular Growth and Proliferation*, *Cardiovascular System Development and Function* sowie *Cell-To-Cell Signaling and Interaction*. Die drei wichtigsten Netzwerke sind in Tabelle 20 aufgeführt.

Tabelle 20: Übersicht der 3 wichtigsten Netzwerke, erstellt mithilfe der Ingenuity Software. Überexprimierte Gene sind fett unterlegt, Gene in normaler Schrift sind unterexprimiert.

Wichtigste Krankheiten und Funktionen	Score -log ₁₀ (p-value)	Moleküle im Netzwerk
<i>Cell Cycle, Gene Expression, Cardiovascular System Development and Function</i>	41	ADGRE1, ARHGAP22 , CCDC155 , CD276 , CSRP1 , Cxcl3, DLEU7 , EPHB4, FOXO4, GNB4 , HBB, ID3 , MMP25, MYSM1 , MYZAP , RECQL4 , RHBG, RORA, TERT, TGM1, WDFY1
<i>Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation, Hematological System Development and Function</i>	34	BLK , CD19 , CD4, CD83 , CXCR4 , DEPTOR , F2, GGPS1, GP1BB, HTATIP2, IL22RA2 , ITLN1 , Irs3, MYCN, PGF , PMEL, POU6F1 , PTDSS1 , PYCARD, SACM1L, SEMA6A
<i>Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation, Cell Death and Survival</i>	21	AQR, ATP6V0E2 , CCNB1IP1 , FMN1 , PHF24, POLM, RBM45 , RDH5 , RECQL4 , RGS9 , RPRM, SERPING1, SPATA18, STON2

Mithilfe einer Analyse der Krankheits- und Biofunktionen (*diseases and bio-functions*) der differentiell exprimierten Gene in PON2^{-/-}-LT-HSCs konnte die *Ingenuity* Software die Vorhersage treffen, dass nach einem PON2 *knock-out* die allgemeine Funktionsfähigkeit der Zellen (*cell viability*) reduziert wird, während die Stimulation der Blutzellen gesteigert wird.

Aufgrund der großen Anzahl der durch PON2 herunter- oder hochregulierten Gene wurde eine großflächige Literaturrecherche durchgeführt, um jene *targets* zu identifizieren, die für die Hämatopoese sowie das in der vorliegenden Arbeit behandelte Projekt die größte Relevanz aufwiesen.

In Tabelle 21 sind jene Gene sowie deren x-fache Änderung (*Log2FoldChange*) und deren p-Wert aufgelistet.

Tabelle 21: Targets von besonderem Interesse. Dargestellt wird der Gen-Name, das Gen-Symbol, die x-fache Änderung sowie der p-Wert jener *targets*, die für das durchgeführte Projekt bzw. die Hämatopoese von besonderem Interesse waren. Überexprimierte Gene sind fett unterlegt, Gene in normaler Schrift sind unterexprimiert.

Gen-Name	Symbol	x-fache Änderung (Log2FoldChange)	p-Wert
C-X-C Motif Chemokine Receptor 4	CXCR4	2,100326859	5,6 E-06
<i>Glycoprotein Ib Platelet Beta Subunit</i>	GP1BB	-23,13901478	1,3 E-14
<i>Insulin Receptor</i>	INSR	-1,345104211	4,8 E-04
<i>Makorin Ring Finger Protein 2</i>	Mkrn2	1,408550689	3,0 E-04
<i>RecQ Like Helicase 4</i>	RECQL4	7,745501089	1,5 E-05
SRY (Sex Determining Region Y)-Box 6 auch genannt <i>Transcription factor SOX-6</i>	Sox6	1,487462887	1,3 E-04
<i>Telomerase Reverse Transcriptase</i>	TERT	-9,499420091	1,1 E-06
<i>Forkhead Box O4</i>	Foxo4	-2,473680207	4,6 E-04
<i>Adhesion G Protein-Coupled Receptor E1</i>	ADGRE1	-22,92760884	2,3 E-14
<i>Differentiation Antigen CD19</i>	CD19	25,03136102	1,5 E-18
CD83 Antigen (Activated B Lymphocytes, <i>Immunoglobulin Superfamily</i>)	CD83	-24,37339248	4,9 E-16
BLK Proto-Oncogene, Src Family Tyrosine Kinase auch genannt B Lymphocyte Kinase	BLK	23,77137659	2,5 E-15
<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 3</i>	Cxcl3	-23,38132154	7,1 E-15
<i>Coagulation Factor II, Thrombin</i>	F2	22,5972233	5,4 E-14

6 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die Rolle der PON2 in der Hämatopoese analysiert. Verschiedene Studien haben in der Vergangenheit gezeigt, dass PON2 mit einer Therapieresistenz sowie einer schlechten Prognose in verschiedenen Leukämien assoziiert ist^{42, 43}, die allgemeine Funktion der PON2 im hämatopoetischen System war jedoch mit Ausnahme von Makrophagen bislang unbekannt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PON2 *in vivo* sowohl in der Hämatopoese als auch speziell in HSCs eine wichtige Rolle einnimmt. Vermutlich durch einen Eingriff in die ROS-abhängige Signaltransduktion kontrolliert PON2 verschiedene physiologische Funktionen von HSPCs und könnte damit neben GPX4, SOD, AHSP, ATM und Peroxiredoxin⁷⁴ einen von sehr wenigen identifizierten HSC-ROS-modulierenden Faktoren darstellen. Diese Hypothese soll anhand der Ergebnisse dieser Arbeit im Folgenden diskutiert werden.

6.1 PON2 reguliert ROS in hämatopoetischen Zellen

Aufgrund ihrer geringen metabolischen Aktivität sind HSCs extrem anfällig für Stimulationen bzw. Schädigungen durch ROS. In physiologischer Menge dienen ROS als Signalmoleküle und steuern beispielsweise die Stammzell-Proliferation, Differenzierung und Mobilisierung. Bereits ein vergleichsweise geringer Anstieg des ROS-Levels in HSCs induziert jedoch eine Beeinträchtigung der Selbsterneuerungsfähigkeit sowie HSC-Seneszenz und kann im schlimmsten Falle zum vorzeitigen Erschöpfen des Stammzell-Pools sowie zu hämatopoetischen Dysfunktionen führen⁷³.

Diese Verbindung zwischen dem ROS-Level und der HSC-Funktionalität diene als Grundlage für die Hypothese, dass das anti-oxidative Enzym PON2 durch Modulation des Redox-Signalings eine regulatorische Rolle im hämatopoetischen System einnimmt. Um diese Hypothese prüfen zu können, sollten zunächst vergleichende ROS-Analysen an hämatopoetischen Zellen von PON2^{-/-}- und WT-Mäusen durchgeführt werden.

Die in dieser Arbeit angewendeten und in den Kapiteln 5.3.3.1, 5.3.3.2 und 5.4.3 beschriebenen hochsensitiven Methoden der ROS-Bestimmung in Knochenmarkszellen deckten sowohl signifikant erhöhte gesamt-ROS-Level in ST-HSCs junger als auch numerisch erhöhte gesamt-ROS-Level in MPPs junger und LT-, ST-HSCs und MPPs alter PON2^{-/-}-Tiere auf (siehe Abbildung 32 und Abbildung 55). Außerdem konnte ein erhöhter Superoxid-Level im Gesamtknochenmark junger PON2-defizienter Mäuse aufgedeckt werden (siehe Abbildung 33 A).

Der in LT-HSCs alter Tiere detektierte, angestiegene gesamt-ROS-Level, der in LT-HSCs junger $PON2^{-/-}$ -Mäuse nicht ersichtlich war, könnte mit dem differentiellen $PON2$ -mRNA-Expressionslevel in LT- und ST-HSCs alter WT-Tiere zusammenhängen (siehe Abbildung 21). Da die ROS-Produktion in Knochenmarkszellen (siehe Abbildung 6) und der Knochenmarknische während des Alterungsprozesses zunimmt^{80, 170}, dient die vermehrte $PON2$ -Expression der Zellen vermutlich dazu, dem Anstieg des intrazellulären ROS-Levels zumindest teilweise entgegenzuwirken. Aus diesem Grund hat die $PON2$ -Defizienz vermutlich größere Auswirkungen auf HSCs alter Tiere als auf jene Zellen junger Tiere.

Die Ergebnisse der verschiedenen ROS-Messungen entsprachen den Erwartungen, die aus früheren Studien der Arbeitsgruppe hervorgingen. Bereits 2007 konnte von Horke et al. mithilfe des Indikators L-012 gezeigt werden, dass EA.hy 926 Zellen, behandelt mit einer $PON2$ -siRNA, signifikant höhere ROS-Level aufwiesen als naive Zellen¹⁸. Weiterhin wurde 2011 eine Studie von Witte et al. veröffentlicht, in der mithilfe des Farbstoffs CM-H₂DCFDA ein gesteigerter ROS-Level in A549-Zellen mit $PON2$ *knock-down* detektiert werden konnte³². In primären Zellen/Gewebe aus $PON2^{-/-}$ -Tieren konnte dieser Effekt ebenfalls bereits beschrieben werden³¹. Analysen, durchgeführt von Ebert et al., zeigten einen deutlichen Anstieg des H₂DCFDA-Fluoreszenzsignals in vereinzelt Aortenzellen, isoliert aus $PON2^{-/-}$ -Mäusen. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis konnte in etwa 2 mm breiten, ringförmigen Abschnitten der Aorta $PON2$ -defizienter Mäuse gegenüber der WT-Kontrolle eine Steigerung der anhand des L-012 Chemilumineszenzsignals gemessenen Superoxid-Produktion über die Zeit festgestellt werden³¹. Jene Studien unterstützen die im Zuge dieser Arbeit erlangte Erkenntnis, dass $PON2$ in Knochenmarkszellen sowohl den gesamt-ROS-Level als auch speziell den Superoxid-Level reguliert.

Neben den oben genannten Messungen des basalen Superoxid-Levels in WBMCs mittels L-012 wurden in der vorliegenden Arbeit Analysen des Superoxid-Levels im Anschluss an eine Induktion der intrazellulären Superoxid-Produktion durch das Redox-Zyklus-Reagens DMNQ durchgeführt (siehe 5.3.3.2). In jenen Analysen konnte gezeigt werden, dass der basal erhöhte Superoxid-Level in $PON2^{-/-}$ -Knochenmarkszellen durch die DMNQ-Behandlung nicht weiter angehoben wurde, während der Superoxid-Level in WT-Knochenmarkszellen auf das Niveau der $PON2$ -defizienten Zellen anstieg (Abbildung 33 B). Aufgrund dieses Anstiegs konnte im Anschluss an die Behandlung, im Gegensatz zu unbehandelten Zellen, keine Diskrepanz zwischen dem Superoxid-Level in WT- und $PON2^{-/-}$ -Knochenmarkszellen detektiert werden. Dieses Ergebnis stellt einen Kontrast zu der auf verschiedenen Studien begründeten Erwartung dar, dass $PON2$ -defiziente Zellen sensitiver auf eine Induktion der Superoxid-Produktion

reagieren sollten. Infolge der Induktion der Superoxid-Produktion durch DMNQ konnte in Studien von Horke et al. an PON2-überexprimierenden EA.hy926 Zellen ein verringerter ROS-Level im Vergleich zu naiven Zellen nachgewiesen werden¹⁸. Im Jahr 2010 wurde von Altenhöfer et al. dann der anti-oxidative Mechanismus der PON2 an jenen EA.hy 926 Zellen mit oder ohne stabiler Überexpression von PON2-GFP aufgeklärt. In diesen Studien konnte gezeigt werden, dass PON2 spezifisch die Bildung von Superoxid inhibiert und keinen Einfluss auf das Level anderer Radikale wie beispielsweise H_2O_2 oder $ONOO^-$ hat²¹. Im Umkehrschluss sollten PON2-defiziente Zellen nach der Induktion der Superoxid-Produktion durch DMNQ höhere Superoxid-Level aufweisen, da lediglich 0-5 % Restexpression der PON2 in den Knochenmarkzellen vorhanden ist und dadurch die Inhibition der Superoxid-Produktion nicht gewährleistet sein sollte. Ein Grund für die dennoch nicht anwachsende Superoxid-Produktion in PON2^{-/-}-WBMCs könnte der basal bereits sehr hohe Superoxid-Level sein, der in Experimenten ohne DMNQ-Behandlung detektiert werden konnte (siehe Abbildung 33 A). Möglicherweise wiesen die PON2-defizienten Zellen bereits die maximal mögliche Superoxid-Produktionsrate pro Zeiteinheit auf und konnten deshalb nicht weiter stimuliert werden.

Da hohe ROS-Level Proteine, Membranen und die DNA schädigen können⁵⁰, wurden in der vorliegenden Arbeit Quantifizierungen der Menge an DNA-Doppelstrangbrüchen in LSK-Zellen PON2-defizienter und wildtypischer Mäuse durchgeführt (siehe 5.3.4.1). Die Methode, die zu diesem Zweck angewendet wurde, basierte auf der durchflusszytometrischen Detektion des phosphorylierten Histons H2A.X mithilfe eines gamma-H2A.X-Antikörpers und wurde 2008 erstmals von Muslimovic et al. beschrieben¹⁷¹. Trotz der in den Abschnitten 5.3.3.1, 5.3.3.2 und 5.4.3 beschriebenen und zuvor diskutierten Steigerung des ROS- bzw. Superoxid-Levels in Knochenmarkzellen aus PON2^{-/-}-Mäusen, konnten weder in jungen noch in alten Tieren im Vergleich zum Wildtyp erhöhte gamma-H2A.X-Fluoreszenzsignale, also gesteigerte Mengen an DNA-Doppelstrangbrüchen, detektiert werden. Ein Grund dafür könnte sein, dass der Anstieg des ROS- bzw. Superoxid-Levels in PON2-defizienten Knochenmarkzellen nicht hoch genug war, um die schwerwiegenden Doppelstrangbrüche zu verursachen. Da der Marker gamma-H2A.X ausschließlich die zelluläre Antwort auf Doppelstrangbrüche detektiert, jedoch keine Auskunft über Einzelstrangbrüche gibt, sollten in zukünftigen Studien andere Methoden der Quantifizierung von DNA-Schädigungen in Knochenmarkzellen angewendet werden. Zu jenen Methoden zählen beispielsweise der *comet assay*¹⁷²⁻¹⁷⁴ oder der *unwinding assay*¹⁷⁵. Diese Assays dienen der Analyse der häufiger auftretenden, aber weniger toxischen, einsträngigen DNA-Brüche und könnten das in der vorliegenden Studie beschriebene

Ausbleiben von DNA-Schädigung in LSK-Zellen mit PON2 *knock-out* bestätigen oder gegebenenfalls widerlegen. Einen weiteren Grund für die in etwa gleich hohe Anzahl an Doppelstrangbrüchen in WT- und PON2^{-/-}-LSK-Zellen könnte das Gen RECQL4 darstellen. Dieses Gen wurde in den in Abschnitt 5.5.2 beschriebenen Analysen des Transkriptoms PON2-defizienter LT-HSCs im Vergleich zu WT-LT-HSCs als induziert identifiziert. RECQL4 codiert für die ATP-abhängige DNA Helicase Q4, ein Enzym das essentiell für die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen ist ^{176, 177}. Möglicherweise führte die Induktion dieses Gens zu einer effizienteren bzw. schnelleren Reparatur entstandener Doppelstrangbrüche in PON2^{-/-}-HSCs, wodurch zum Zeitpunkt der Messung keine erhöhte Anzahl mehr festgestellt werden konnte.

Die Modulation des ROS-Levels steuert die Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen ⁷³. Verschiedene Studien haben in der Vergangenheit gezeigt, dass erhöhte ROS-Level Myeloproliferation, also eine vermehrte Differenzierung multipotenter Stammzellen in Vorläuferzellen der myeloischen Reihe, vermitteln. Dieses Phänomen konnte beispielsweise von Yalcin et al. in FOXO3-defizienten Mäusen beobachtet werden, die analog zu PON2-defizienten Mäusen erhöhte ROS-Level in hämatopoetischen Zellen aufweisen ¹⁷⁸. Aufgrund dieser Verbindung wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl die prozentuale Anzahl an HSCs sowie der verschiedenen myeloischen Vorläuferzellen und weiter ausgereifter hämatopoetischer Zellen mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Außerdem wurde mithilfe des Differentialblutbildes der Tiere die myeloid/lymphoid-Verteilung bestimmt. Die in den Abschnitten 5.3.1.1, 5.3.1.2.1, 5.4.1.1 und 5.4.1.2.1 aufgeführten Analysen sollten Aufschluss darüber geben, ob der gesteigerte intrazelluläre ROS- bzw. Superoxid-Level in PON2^{-/-}-BMCs zu einer Verschiebung der HSC-Differenzierung hin zu einer erhöhten Zahl myeloider Zellen führt.

Trotz des in Abbildung 32 und Abbildung 33 dargestellten erhöhten Gesamt-ROS- und Superoxid-Levels wiesen junge PON2-defiziente Mäuse noch keine vermehrte Differenzierung der multipotenten Stammzellen in myeloische Zellen auf. Dieses Ergebnis konnte sowohl an der nicht gesteigerten Zellzahl oligopotenter, myeloischer Vorläuferzellen im Knochenmark (siehe Abbildung 25) als auch an der unveränderten myeloid/lymphoid-Verteilung im Blut der Tiere (siehe Abbildung 28) abgelesen werden. Allerdings konnte in jenen Tieren beobachtet werden, dass es während der Hämatopoese zu multiplen Differenzierungsblockaden kommt. Diese Blockaden ereigneten sich sowohl in LT-HSCs als auch in ST-HSCs und waren daran zu erkennen, dass trotz einer im Vergleich zum Wildtyp festgestellten prozentual erhöhten Zellzahl der LT-HSCs im Gesamtknochenmark der PON2^{-/-}-Tiere keine veränderte Zellzahl der ST-

HSCs detektiert werden konnte. Dies spricht für eine ineffiziente Differenzierung von LT-HSCs zu ST-HSCs (siehe Abbildung 23). Außerdem wurde trotz der unveränderten prozentualen Anzahl an ST-HSCs in PON2-defizienten Mäusen eine signifikant verringerte Zellzahl multipotenter Vorläuferzellen offengelegt (siehe Abbildung 23). Dies indiziert eine ebenfalls ineffiziente Differenzierung von ST-HSCs zu MPPs.

Im Gegensatz zu jungen Tieren konnte in alten PON2^{-/-}-Mäusen eine deutliche Favorisierung der Myelopoese festgestellt werden, die potenziell auf das in Abbildung 55 dargestellte, numerisch erhöhte ROS-Level in den verschiedenen Subpopulationen innerhalb der LSK-Fraktion zurückgeführt werden kann (vgl. ^{179, 180}). Die Verschiebung der Differenzierungsrichtung wurde deutlich am signifikant gesteigerten prozentualen Anteil von CMPs, GMPs und MEPs am Gesamtknochenmark der Tiere (siehe Abbildung 48), sowie an der veränderten myeloid/lymphoid-Verteilung, die im Blut der mehr als 9 Monate alten PON2^{-/-}-Tiere festgestellt werden konnte (siehe Abbildung 50).

Neben dem erhöhten ROS- und Superoxid-Level könnten allerdings auch transkriptionelle Veränderungen innerhalb der HSPCs PON2-defizienter Mäuse an der Ausprägung des *myeloid skewings* im Laufe des Alterungsprozesses beteiligt sein. Obwohl der Mechanismus, der die Differenzierung der HSPCs in Zellen der myeloischen oder lymphatischen Linie moduliert, noch nicht vollständig aufgedeckt werden konnte, wurden dennoch verschiedene Faktoren identifiziert, die während dieses Prozesses eine wichtige Rolle spielen. Zu diesen Faktoren zählt der Insulinrezeptor (IR), der von dem Gen *InsR* codiert wird. In Studien aus dem Jahr 2015 konnten Xia et al. aufdecken, dass die Deletion von *InsR* im murinen Knochenmark zu einer vermehrten Differenzierung von MPPs in myeloische Zellen führt. Der Grund dafür liegt in der Insulin-*InsR*-Signalweg vermittelten Expression von Ikaros, einem DNA-Bindeprotein, das für die lymphoide Differenzierung benötigt wird. Ohne *Insulin-signaling* ist die Ikaros-Expression unterdrückt und MPPs differenzieren bevorzugt in myeloide Zellen ¹⁸¹. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Transkriptomanalysen an LT-HSCs konnten eine Repression des *InsR* Gens in PON2^{-/-}- verglichen mit WT-Mäusen aufdecken. Diese Repression könnte in Kombination mit dem gesteigerten ROS-Level in HSPCs den Grund für die während der Alterung der Tiere stärker zunehmende Differenzierung in Zellen der myeloischen Reihe darstellen.

Um die Frage nach der Kausalität von ROS in Bezug auf die verschiedenen Effekte der PON2-Defizienz auf Knochenmark- und Blutzellen beantworten zu können, wurden einige grundlegende Analysen an NAC-behandelten PON2^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu unbehandelten sowie WT-Mäusen wiederholt. Ähnliche Versuche wurden in der Vergangenheit bereits an *knock-*

out-Mäusen von ATM und FoxOs erfolgreich durchgeführt¹⁵⁹.

Anhand der durchgeführten Nachweise konnte keine eindeutige Verminderung des ROS-Levels durch die kontinuierliche Behandlung der PON2^{-/-}-Tiere mit dem Antioxidant NAC festgestellt werden (siehe Abbildung 36). Zwar schien eine geringfügige Reduktion des gesamt-ROS-Levels in ST-HSCs und MPPs erreicht worden zu sein, jedoch war dieser Effekt nicht statistisch signifikant. Dennoch konnten die durchflusszytometrischen Analysen der Knochenmarkzellen sowie die labormedizinische Untersuchung des Blutes NAC-behandelter Tiere zum Teil Auflösungen oder Verminderungen der in unbehandelten PON2^{-/-}-Mäusen beobachteten Effekte aufdecken (siehe Abbildung 37 A sowie Abbildung 38 G und J). Die Mehrzahl der Effekte, wie beispielsweise das gesteigerte MCV, das gesteigerte MCH, der verringerte RDW sowie der verringerte PLT (siehe Abbildung 38 E, F, H, I), blieben jedoch trotz der Behandlung bestehen oder wiesen eine Effekt-Intensivierung auf (siehe Abbildung 38 C). Faktisch kann also die Frage, ob ROS kausal ist, an dieser Stelle nicht eindeutig beantwortet werden. Eine Möglichkeit, in Zukunft eventuell eine deutlichere Verminderung des ROS-Levels zu erlangen und die durchgeführten Analysen des Knochenmarks und des Blutes zu wiederholen, wäre eine Veränderung der Applikationsmethode (intraperitoneal statt oral) oder ein Substituieren des Antioxidans. Eine Alternative zum N-Acetylcystein stellt beispielsweise Vitamin-E dar, das bereits in multiplen Studien an Mäusen zur Reduktion des ROS-Levels angewendet wurde¹⁸²⁻¹⁸⁴.

Zusätzlich zu der anti-oxidativen Funktion der PON2, wurde durch Zellkulturexperimente eine anti-apoptotische Wirkung des Enzyms festgestellt^{18, 32}. Aufgrund dieser Tatsache in Verbindung mit der Gegebenheit, dass erhöhte ROS-Level neben der unmittelbaren Schädigung verschiedener Zellbestandteile sowie der Modulation der Differenzierungsrichtung der multipotenten HSPCs auch Apoptose induzieren⁵¹, wurden in der vorliegenden Arbeit Quantifizierungen apoptotischer LT- und ST-HSCs aus jungen und alten PON2^{-/-}- und WT-Tieren mittels Annexin V-Färbung und anschließender durchflusszytometrischer Analyse durchgeführt. Wie in Abbildung 35 A sowie Abbildung 57 A und B graphisch dargestellt, konnte sowohl in den LT-HSCs junger, als auch in den LT- und ST-HSCs alter PON2^{-/-}-Mäuse eine signifikante Verringerung der Apoptoserate festgestellt werden. In den ST-HSCs junger PON2^{-/-}-Tiere wurde hingegen keine Veränderung der Anzahl apoptotischer Zellen im Vergleich zum WT detektiert. Aufgrund der ROS-abhängigen, anti-apoptotischen Funktion der PON2³² entsprachen die Ergebnisse der Annexin V-Versuche in beiden Altersgruppen PON2-defizienter Tiere nicht den Erwartungen. In Studien von Witte et al. konnte an der CML-Zelllinie K562,

der Lungenkarzinom-Zelllinie A549 sowie an EA.hy 926-Zellen, einer Hybrid-Zelllinie entstanden aus der Fusion von A549 Zellen mit humanen Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVEC), gezeigt werden, dass ein PON2 *knock-down* mittels siRNA zu einer signifikanten Erhöhung der (spontanen) Apoptoserate führt. Multipliziert wurde dieser Effekt durch die Behandlung PON2-defizienter K562 Zellen mit dem Chemotherapeutikum Imatinib (Gleevec®), die zu einer signifikant gesteigerten Zahl apoptotischer Zellen führte und somit eine gesteigerte Chemosensitivität implizierte ³². In Studien von Ebert et al. konnten die Effekte der PON2-Defizienz außerdem an primär isolierten Endothelzellen aus PON2^{-/-}-Mäusen verdeutlicht werden. Auch hier wurde eine deutlich gesteigerte Apoptoserate in PON2^{-/-}-Zellen verglichen mit WT-Zellen detektiert ³¹.

Die in der vorliegenden Arbeit erlangten Ergebnisse der Quantifizierung apoptotischer LT- und ST-HSCs in jungen und alten PON2-defizienten Tieren entsprachen nicht den durch oben genannte Studien begründeten Erwartungen, doch sie lieferten den Grund für die in den Abschnitten 5.3.1.1 und 5.4.1.1 identifizierten Änderungen der prozentualen Zellzahl der entsprechenden HSC-Subpopulationen im Gesamtknochenmark (vgl. Abbildung 23 und Abbildung 35 sowie Abbildung 48 und Abbildung 57). Im Gegensatz zu alten Tieren lies der Vergleich der Apoptoserate und der Zellzahl in jungen PON2^{-/-}-Mäusen jedoch die Vermutung zu, dass die Anzahl apoptotischer HSPCs mit zunehmender Differenzierung ansteigt. Dementsprechend wies die im Vergleich zum Wildtyp unveränderte Zahl apoptotischer ST-HSCs aus jungen PON2^{-/-}-Tieren im direkten Vergleich mit der Apoptoserate der LT-HSCs eine Steigerung auf. Weiterhin wies der in Abschnitt 5.3.1.1 beschriebene verringerte Anteil der MPPs und CMPs am Gesamtknochenmark junger PON2-defizienter Mäuse darauf hin, dass die Apoptoserate in MPPs (siehe Abbildung 23) sowie in CMPs (siehe Abbildung 25) im Vergleich zum Wildtyp gesteigert sein könnte. Diese Hypothese sollte in zukünftigen Studien durch Annexin V-Färbungen der multipotenten sowie der oligopotenten hämatopoetischen Vorläuferzellen abgeklärt werden.

Da sich LT-HSCs zumeist in einem ruhenden Stadium befinden, metabolisch wenig aktiv sind und zumeist Glykolyse anstelle der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung zur Energiegewinnung nutzen ⁶⁸⁻⁷¹, hatte die PON2-Defizienz zumindest in Bezug auf den intrazellulären ROS-Level in LT-HSCs junger PON2^{-/-}-Tiere keine negativen Auswirkungen (siehe Abbildung 32), was auch die nicht erhöhte Apoptoserate erklärt (siehe Abbildung 35 A). Mit zunehmender Differenzierung und steigender Proliferationsrate nutzen die HSPCs jedoch den effektiveren Weg der ATP-Gewinnung, die oxidative Phosphorylierung. Da PON2 wie in Abbildung 2 dargestellt die Superoxidproduktion an der inneren Mitochondrienmembran hemmt bzw.

blockiert (siehe auch Abbildung 2), dadurch die Cardiolipin-Peroxidation, die Cytochrom C Freisetzung, die Caspase Aktivierung und folglich die Apoptose verhindert ³², hat die PON2-Defizienz in ST-HSCs, MPPs und den oligopotenten Vorläuferzellen vermutlich größere Auswirkungen. Die dennoch unveränderte Anzahl apoptotischer ST-HSCs sowie die in LT-HSCs junger und in LT- und ST-HSCs alter Tiere beobachtete Verminderung der Apoptoserate weisen deshalb auf einen starken Kompensationsmechanismus hin. Ein Faktor, der einen Teil dieses Mechanismus darstellen könnte, ist die Induktion des Gens RECQL4 in LT-HSCs von PON2^{-/-}-Mäusen. Dieses Gen spielt wie zuvor genannt eine Rolle bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen durch nicht-homologe Endverknüpfung (*nonhomologous end-joining*) ^{176, 177, 185-187}. In diesem Zusammenhang konnten Smeets et al. im Jahr 2014 zeigen, dass die Deletion von RECQL4 zu Knochenmarkversagen und einem erhöhten Apoptose-Level führt ¹⁸⁸. Im Umkehrschluss könnte die Induktion des Gens, die in den Transkriptomanalysen der PON2^{-/-}-Tiere aufgedeckt wurde, nicht nur zu einer effektiveren Reparatur entstandener DNA-Doppelstrangbrüche beitragen, sondern dadurch auch an der Verminderung der Apoptoserate in HSCs beteiligt sein.

Da der in PON2^{-/-}-LT- und ST-HSCs postulierte Kompensationsmechanismus in alten Tieren im Vergleich zu jungen sehr stark ausgeprägt war, befinden sich die Zellen vermutlich in einem prä-leukämischen Stadium. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass das Gen *Mkln2* (*Makorin Ring Finger Protein 2*) in PON2-defizienten LT-HSCs als hochreguliert identifiziert wurde. Jenes Gen wurde in Studien von Lee et al. mit Leukämie assoziiert ¹⁸⁹. Sowohl primäre Leukämiezellen als auch Leukämiezelllinien der myeloiden, lymphoiden, erythroiden und megakaryozytischen Linien wiesen höhere *Mkln2*-Expressionslevel auf als gesunde Knochenmarkzellen gleichen Alters ¹⁸⁹, was zu einer verstärkten Zellproliferation führte. Die Induktion dieses Gens könnte also zu der während des Alterungsprozesses beobachteten Expansion der verschiedenen HSPC-Subpopulationen beigetragen haben und einer der Gründe für das vermutete prä-leukämische Stadium jener Zellen darstellen.

6.2 PON2 moduliert die genuine HSC-Funktionalität

Neben den in Abschnitt 6.1 diskutierten quantitativen Untersuchungen des ROS-Levels, der DNA-Schädigung, der Zellzahl sowie der Apoptoserate hämatopoetischer Zellen wurden in der vorliegenden Arbeit funktionelle Analysen der PON2-defizienten HSCs durchgeführt. Jene Analysen erfolgten unter anderem mittels kompetitiver Knochenmarktransplantation

junger WBMCs (siehe 5.3.6) und mittels serieller Knochenmarktransplantation alter WBMCs (siehe 5.4.5). Diese Versuche erlauben Rückschlüsse über die physiologische Relevanz der anti-oxidativen Aktivität von PON2 im Hinblick auf die genuine Stammzellfunktion.

Die kompetitive Knochenmarktransplantation mit anschließender durchflusszytometrischer Analyse der Oberflächenproteine CD45.1 (Ptp^{rc}^a) und -2 (Ptp^{rc}^b) peripherer Blutzellen zur Differenzierung der Repopulationsfähigkeit von HSCs verschiedener Herkunft wurde 1996 von Mardiney und Malechet beschrieben¹⁵². Sie dient der Validierung der biologischen Funktionsfähigkeit der Stammzellen, sich im Knochenmark einzunisten. Der Prozess der Repopulation hängt dabei von verschiedenen Einzelfaktoren ab. Zunächst erfolgt die Migration der Zellen aus dem peripheren Blut in das Knochenmark (*homing*), anschließend erfolgt die Anhaftung in der Nische und die Initiierung einer Kette von Zellteilungen, um schließlich das hämato-poetische System des Empfängertieres zu rekonstruieren¹⁹⁰.

Die mit jungen PON2^{-/-}- und WT-Tieren durchgeführten kompetitiven Analysen zur Bewertung der HSC Aktivität ergaben eine deutliche Überlegenheit der PON2-defizienten Stammzellen gegenüber den WT-Zellen (siehe Abbildung 39). Um potenzielle Gründe für die gesteigerte Repopulationsfähigkeit zu identifizieren, wurden Analysen des Zellzyklusstatus, der Ziel-findungsfähigkeit sowie der Fähigkeit Kolonien auszubilden durchgeführt.

In dieser Arbeit sowie in verschiedenen früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit von PON2 die ROS-Bildung signifikant erhöht^{18, 21, 32}. Noch vor wenigen Jahren lag der Hauptfokus der Stammzellbiologie vor allem auf den Auswirkungen erhöhter ROS-Level auf die Alterung von Zellen und Geweben sowie auf die Entstehung von Krebs. In den letzten Jahren hat sich jedoch immer deutlicher gezeigt, dass der Redox-Status auch bei der Erhaltung der Stammzellen und der Zellzyklus-Regulation von großer Bedeutung ist¹⁹¹. Aus diesem Grund wurde in der durchgeführten Studie der Einfluss der anti-oxidativen PON2 auf den Zellzyklus der hämatopoetischen Subpopulationen analysiert, indem das Verhältnis quieszenter und proliferierender Zellen durchflusszytometrisch bestimmt wurde. Die Untersuchungen ergaben sowohl speziell in LT-HSCs (siehe Abbildung 41 B) als auch in der Gesamt-LSK-Fraktion (siehe Abbildung 41 A) keine signifikante Änderung des Verhältnisses zwischen Zellen in der G0, der G1 sowie der G2-, S-, M-Phase des Zellzyklus (siehe Abschnitt 5.3.6.1). Jenes Ergebnis der Zellzyklus-Analyse in LSK-Zellen entsprach nicht den Erwartungen, denn PON2^{-/-}-ST-HSCs und MPPs, die einen Großteil der LSK-Fraktion bilden, wiesen in vorherigen Analysen erhöhte ROS-Level im Vergleich zu WT-Zellen auf (siehe Abbildung 32), was erwartungsgemäß zu einer Aktivierung der Zellen, also zu einem

vermehrten Eintritt der Zellen in die G2-, S-, M-Phase des Zellzyklus führen sollte. Dieser Zusammenhang zwischen ROS und dem Zellzyklusstatus konnte beispielsweise in Studien von Tothova et al. an Mx-Cre⁺;FoxO1/3/4^{L/L} Mäusen belegt werden, die ebenfalls erhöhte ROS-Level in HSPCs aufwiesen, wodurch eine zweifache Steigerung der Zahl Mx-Cre⁺;FoxO1/3/4^{L/L} HSCs in der G2-, S-, M-Phase des Zellzyklus verglichen mit Mx-Cre⁻ Kontrollmäusen verzeichnet werden konnte ⁷⁸.

Zusammengefasst konnte aus diesem Experiment die Erkenntnis gewonnen werden, dass PON2 nicht an der Regulation des Zellzyklus in LSK-Zellen beteiligt ist und die in Abschnitt 5.3.6 beschriebene gesteigerte Repopulationsfähigkeit PON2-defizienter HSCs nicht auf eine Änderung des Zellzyklusstatus zurückgeführt werden kann.

Eine weitere Möglichkeit für die gesteigerte Repopulationsfähigkeit von PON2^{-/-}-HSCs ist die Zielfindungsfähigkeit. Sie beschreibt die Befähigung der Zellen, aus dem peripheren Blut in das Knochenmark zu migrieren. Die Rolle der PON2 innerhalb dieses Prozesses ist deshalb von großer Bedeutung, da laut Wang et al. eine negative Korrelation zwischen ROS und der Expression verschiedener Zielfindungsmoleküle (*homing adhesive molecules*) besteht. Zu diesen Molekülen zählen beispielsweise CD44, VLA4 und CXCR4 ¹⁶⁰. Zusätzlich wurde der Zielfindungsprozess mit SDF-1 (*stromal-derived factor 1*, auch CXCL12 genannt) und SCF (*stem cell factor*)-signaling, der Aktivierung von LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen 1*), der Reorganisation des Zytoskeletts sowie MMP (*membrane type 1 (MT1)-matrix metalloproteinase*)-Aktivierung und Sekretion von MMP2/9 in Verbindung gebracht ¹⁹⁰. Diese Studien verdeutlichen, wie komplex der Ablauf der Zielfindung von HSCs aufgebaut ist.

Innerhalb der vorliegenden Arbeit konnte trotz des veränderten Redox-Status der Zellen (siehe 5.3.3) kein Unterschied in der Zielfindungsfähigkeit von PON2^{-/-}- und WT-HSCs festgestellt werden (siehe Abbildung 42). Dieses Ergebnis war unerwartet, denn Studien an Nrf2^{-/-} Lin⁻ Knochenmarkzellen haben gezeigt, dass jene Zellen weniger effektiv in die Knochenmark-nische einwandern als WT-Knochenmarkzellen ¹⁹². Da es sich bei dem Protein Nrf2 um einen Transkriptionsfaktor handelt, der die Expression anti-oxidativer Proteine reguliert und dadurch eine protektive Rolle gegen oxidativen Stress einnimmt, wäre in PON2^{-/-}-Tieren ebenfalls eine verminderte Zielfindungsfähigkeit zu vermuten gewesen. Andererseits wurde mithilfe der Transkriptomanalysen von WT- und PON2^{-/-}-LT-HSCs eine leichte Induktion von CXCR4 festgestellt (siehe 5.5.2), was eine gesteigerte Zielfindungsfähigkeit implizieren würde, aber nicht den Erwartungen basierend auf der genannten Studie von Wang et al. aus dem Jahr 2012 entsprach ¹⁶⁰. Wie zuvor beschrieben, handelt es sich bei CXCR4 um ein

Zielfindungsmolekül, dessen Überexpression in verschiedenen Veröffentlichungen unter anderem mit einer verbesserten Migration der Zellen in das Knochenmark, entlang eines CXCL12 Gradienten, assoziiert wurde^{193, 194}.

Es wäre möglich, dass eine leichte Beeinträchtigung der Zielfindungsfähigkeit, bedingt durch eine geringe und deshalb nicht in unseren Analysen identifizierte Repression verschiedener weiterer Zielfindungsmoleküle durch das erhöhte ROS-Level, in Kombination mit einer leichten Steigerung der Zielfindungsfähigkeit durch die erhöhte CXCR4-Expression, das insgesamt unveränderte *homing* der PON2^{-/-}-HSCs innerhalb der hier durchgeführten Analysen erklärt.

Um die Zielfindung der PON2^{-/-}-HSCs genauer untersuchen zu können und die innerhalb dieser Arbeit erlangten Ergebnisse zu verifizieren, sollten in der Zukunft *in vitro* Methoden wie beispielsweise der *transwell migration assay* angewendet werden. Analysen dieser Art wurden beispielsweise mit den oben genannten Nrf^{-/-} LSK-Zellen sowie mit Txnip (*thioredoxin-interacting protein*)^{-/-} HSCs durchgeführt^{192, 195}.

Zusammengefasst konnte eine modulierte Zielfindungsfähigkeit ebenfalls als Erklärung für die in Abschnitt 5.3.6 beschriebene gesteigerte Repopulationsfähigkeit PON2-defizienter HSCs ausgeschlossen werden.

Als dritter Ansatz der funktionellen Analyse von HSCPs wurden *colony forming assays* in Methylzellulose durchgeführt, um die Klonogenität, also die Fähigkeit zur Bildung von Kolonien aller Zellreihen, der PON2^{-/-}- und WT-Knochenmarkzellen zu validieren. Experimente dieser Art wurden beispielsweise mit Mx-Cre⁺;FoxO1/3/4^{L/L} HSC durchgeführt und zeigten eine statistisch signifikante quantitative Verringerung der Koloniebildungsaktivität jener Zellen im Vergleich zu Mx-Cre⁻ Kontroll-HSCs⁷⁸.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten *in vitro* Analysen der Koloniebildungsfähigkeit von PON2^{-/-}- verglichen mit WT-HSPCs zeigten weder eine veränderte Anzahl der Gesamtkolonien (siehe Abbildung 43 A), noch eine Veränderung der Anzahl bestimmter *colony forming units* (CFU's, siehe Abbildung 43 B). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass PON2 in jungen Tieren keinen Einfluss auf die Differenzierungseigenschaften von HSPCs hat, wodurch die Klonogenität als möglicher Grund für die verbesserte Leistung PON2-defizienter Knochenmarkzellen in der kompetitiven Transplantation ebenfalls ausgeschlossen werden konnte.

Da, entgegen den Vermutungen, sowohl die Modulation des Zellzyklusstatus, der Zielfindungsfähigkeit als auch der Klonogenität als Grund für eine gesteigerte Repopulationsfähigkeit von PON2^{-/-}-HSPCs ausgeschlossen werden konnten, lag die Vermutung nahe, dass eine veränderte Stressreaktion der Zellen an der Ausprägung dieses Phänotyps beteiligt war.

Innerhalb der molekularbiologischen Analysen des Transkriptoms langzeit-repopulierender HSCs aus PON2^{-/-}- und WT-Mäusen konnte jedoch keine differentielle Expression verschiedener prominenter Stressregulatoren wie beispielsweise Sod2/3, Nrf2 oder Cdkn1a (*Cyclin Dependent Kinase Inhibitor*) sowie weniger bekannter HSC-Stressmodulatoren wie Matrilin-4¹⁹⁶ und Gadd45a (*Growth Arrest And DNA Damage Inducible Alpha*)¹⁹⁷ festgestellt werden (siehe 5.5.2 und Tabelle 22). Bei der Gewichtung dieses Ergebnisses sollte jedoch bedacht werden, dass es sich um die Analyse ungestresster Zellen handelte, was bedeutet, dass potenzielle Unterschiede, die erst durch Ausübung von Replikationsstress, z.B. durch Knochenmarktransplantation, induziert werden, in dieser Analyse nicht detektiert werden konnten. Aus diesem Grund sollten in der Zukunft *in vivo* Versuche zur Validierung der Stressreaktion, wie beispielsweise Applikationen von IFN α gefolgt von Injektionen des antiproliferativen Chemotherapeutikums 5-Fluorouracil (5-FU), durchgeführt werden, um die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Analysen zu ergänzen.

Insgesamt konnten für die Überlegenheit der PON2^{-/-}-Zellen im konkurrierenden Modell innerhalb dieser Arbeit keine hinreichenden Gründe identifiziert werden, weswegen zukünftige Studien darauf abzielen sollten, die hier durchgeführten Untersuchungen zu ergänzen und die repopulationsmodulierenden Faktoren genauer zu charakterisieren.

Zusätzlich zu den funktionellen Analysen von HSCs, isoliert aus jungen PON2^{-/-}- und WT-Mäusen, wurde die Leistungsfähigkeit von älteren Stammzellen untersucht. Dafür wurden die Knochenmarkzellen mehr als 9 Monate alter Mäuse isoliert und mithilfe serieller Knochenmarktransplantationen massivem proliferativem Stress ausgesetzt.

Unter normalen Bedingung reicht das Selbsterneuerungs- und Repopulationspotential von HSCs aus, um die Aufrechterhaltung der Hämatopoese über einen Zeitraum von mehr als der einfachen Lebensspanne einer Maus zu gewährleisten. Aus diesem Grund sind junge, gesunde Stammzellen in der Lage, drei bis vier Durchgänge einer seriellen Transplantation zu überdauern, ehe ihr Potential erschöpft und die Hämatopoese zum Erliegen kommt¹⁹⁸. Da die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten seriellen Transplantationen mit HSCs aus Spender-

tieren im bereits fortgeschrittenen Alter durchgeführt wurden, beschränkte sich der Versuchsaufbau auf lediglich zwei Transplantationsrunden. Dem zugrunde lagen Studien von Morrison et al. aus dem Jahr 1996, die eine altersbedingte Minderung der Fähigkeit von HSCs zum erfolgreichen *Engraftment* in *in vivo* Transplantations-Situationen beschreiben⁸². Als Gründe für die verminderte Leistungsfähigkeit älterer HSCs wurden in unterschiedlichen Publikationen unter anderem eine verminderte Zielfindungsfähigkeit^{81, 82}, Selbsterneuerungsfähigkeit⁸⁷ und Telomeraseaktivität genannt, sowie eine gesteigerte ROS-Produktion, Zytokin-Expression und vermehrter Zellzyklusarrest⁸⁰.

Untermauert durch das gesteigerte ROS-Level in HSCs (siehe Abbildung 32 und Abbildung 55) sowie die innerhalb der Transkriptomanalysen identifizierte Repression des Gens TERT, das für einen katalytischen Subkomplex des Enzyms Telomerase codiert (siehe Tabelle 21), bestand die Hypothese, dass PON2-defiziente HSCs, isoliert aus alten Mäusen, eventuell eine schlechtere Leistung in der seriellen Transplantation zeigen als HSCs gleichaltriger WT-Tiere. Die durchgeführten, in Abschnitt 5.4.5 beschriebenen Analysen offenbarten jedoch eine gesteigerte Überlebensdauer/-rate jener Empfängertiere, denen PON2^{-/-}-Knochenmark injiziert wurde (siehe Abbildung 58). Obwohl dieses Ergebnis nicht den Erwartungen entsprach, ging es jedoch konform mit den zuvor diskutierten Resultaten kompetitiver Analysen der Repopulationsfähigkeit junger PON2^{-/-}-HSCs, in denen aufgedeckt werden konnte, dass die PON2-Defizienz ein verbessertes *Engraftment* zur Folge hat.

Gründe für die Abweichung von den begründeten Erwartungen könnten Kompensationsmechanismen darstellen, die PON2-defiziente HSCs, trotz verschiedener Modulationen wie beispielsweise erhöhtem ROS-Level, nicht nur vor einer erhöhten Apoptoserate (siehe 6.1), sondern auch vor frühzeitigem Funktionsverlust schützen. Um kompensierende Mechanismen identifizieren zu können, wäre es empfehlenswert, in der Zukunft Transkriptomanalysen gealterter PON2^{-/-}-HSCs durchzuführen und diese mit dem Transkriptom gleichaltriger WT- sowie junger PON2^{-/-}- und WT-HSCs zu vergleichen.

6.3 PON2 modifiziert sowohl die basale Erythropoese und Stress-induzierte Erythropoese als auch die Thrombopoese

Neben den Analysen hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen PON2-defizienter Mäuse wurden innerhalb der vorliegenden Arbeit verschiedene Studien durchgeführt, die der Ergründung der Rolle der PON2 in Erythrozyten und Thrombozyten, deren Vorläuferzellen sowie während deren Entwicklung dienten.

Erste Analysen betrafen Erythrozyten und beruhten auf verschiedenen Auffälligkeiten, die innerhalb des in Abbildung 27 und Abbildung 49 graphisch dargestellten Blutbildes junger und alter PON2^{-/-}-Tiere aufgedeckt werden konnten. Zu jenen Auffälligkeiten zählten das vergrößerte Volumen der quantitativ unveränderten Erythrozyten sowie deren modulierte Hämoglobin-Konzentration. Das Blutbild junger PON2-defizienter Tiere wies sowohl gesteigerte MCH- als auch MCHC-Werte auf, während das Blutbild älterer PON2^{-/-}-Mäuse gesteigerte MCH-, jedoch verminderte MCHC-Werte offenlegte. Zusammengefasst führten diese Resultate zu der Hypothese, dass PON2 die Erythropoese moduliert, wodurch PON2^{-/-}-Tiere eine gestörte Erythrozyten-Reifung durchlaufen. Aufgrund dieser Vermutung wurden weiterführende Analysen durchgeführt, die darauf abzielten, die Quantität verschiedener Erythroblasten im Knochenmark, den Zellzyklusstatus von Megakaryozyten/Erythrozyten Vorläuferzellen, den Erythrozytenumsatz sowie die Stress-Erythropoese zu studieren.

Die Anzahl der Proerythroblasten und verschiedenen Erythroblasten sowie früherer Erythrozyten-Vorläufer wird hauptsächlich durch die Produktion von Erythropoetin (EPO) in der Niere gesteuert ^{199, 200}. Wie in Abschnitt 5.3.7.3 beschrieben, bewirkt eine niedrige Erythropoetin-Konzentration lediglich ein schwaches EpoR-vermitteltes Überlebenssignal, wodurch die meisten Erythrozyten-Vorläufer in die Apoptose gehen und somit eine geringe erythropoetische Rate gewährleistet wird. Umgekehrt bewirkt eine hohe Erythropoetin-Konzentration, beispielsweise als Folge von Blutverlust oder Hämolyse, ein starkes EpoR-vermitteltes Überlebenssignal, wodurch die Mehrzahl der Vorläuferzellen überlebt und die Bildung von Erythrozyten verstärkt wird. Neben der Erythropoetin-Konzentration ist das Gleichgewicht zwischen Überleben und programmiertem Zelltod jedoch auch von verschiedenen anderen Transkriptionsfaktoren sowie von der angeborenen Sensibilität des Großteils der Erythrozyten-Vorläuferzellen gegenüber Apoptose abhängig ⁹⁶. Da die verschiedenen Entwicklungsschritte innerhalb der Erythropoese durch Redox-sensible Signalwege gesteuert werden, ist eine Modulation durch das anti-oxidative und anti-apoptotische Enzym PON2 zu erwarten. Die durchflusszytometrischen Analysen des prozentualen Anteils von Proerythroblasten, basophilen und polychromatischen Erythroblasten am Gesamtknochenmark von jungen WT- und PON2^{-/-}-Mäusen offenbarten eine signifikante Steigerung PON2-defizienter Zellen aller 3 Entwicklungsstufen (siehe Abbildung 46). Diese Steigerung könnte potenziell durch eine vermehrte Expression des Transkriptionsfaktors Sox6 bedingt sein. Das Gen, welches für Sox6 codiert, wurde in den Transkriptomanalysen der LT-HSCs PON2-defizienter im Vergleich zu wildtypischen Mäusen als induziert identifiziert (siehe Tabelle 21) und stellt damit eine potenzielle Erklärung für die

gesteigerte Zellzahl erythroider Vorstufen im Knochenmark sowie die veränderte Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten von PON2^{-/-}-Tieren dar. Sox6 wurde in verschiedenen Studien unter anderem mit einer Stimulation des Überlebens erythroider Zellen durch die Verstärkung des EpoR-vermittelten Überlebenssignals sowie mit der Regulation von Globin-Genen assoziiert ²⁰¹⁻²⁰³. In zukünftigen Studien sollten weiterführende Analysen bezüglich der Wechselbeziehung von Sox6 und PON2 durchgeführt werden. Aus der Quantifizierung der Erythrozyten-Entwicklungsstufen konnten verschiedene Schlussfolgerungen gezogen werden. Möglicherweise reagieren die PON2-defizienten Erythrozyten-Vorläufer weniger sensibel auf pro-apoptotische Signale, was in Anbetracht der verringerten Apoptoserate in LT-HSCs (siehe Abbildung 35) plausibel erscheint und wahrscheinlich auf einen Kompensationsmechanismus (sowie gesteigerte Sox6-Expression) zurückgeführt werden kann, oder die Zellen erleiden Differenzierungsblockaden bzw. eine gestörte Mobilisierung in das periphere Blut, was daran zu erkennen ist, dass trotz der gesteigerten Anzahl der Erythroblasten die Erythrozytenzahl im Blut konstant bleibt. Ein weiterer plausibler Erklärungsansatz wäre eine verringerte Lebensdauer der Erythrozyten PON2-defizienter Mäuse im zirkulierenden System, wodurch eine höhere erythropoetische Rate benötigt wird, um ein Absinken des RBC im Blut zu verhindern.

Um die Verweildauer verschiedener Zellen im peripheren Blutsystem analysieren zu können, wurden *in vivo* Biotinylierungen durchgeführt. Der Umsatz der Erythrozyten konnte über einen Zeitraum von 34 Tagen durch regelmäßige Blutabnahmen und anschließende durchflusszyto-metrische Quantifizierung mithilfe von Fluoreszenz-markiertem Streptavidin sowie dem Erythrozytenmarker Ter119 ermittelt werden. Analysen dieser Art wurden in der Vergangenheit beispielsweise in Foxo3^{-/-}-Mäusen durchgeführt (siehe Abbildung 61) ²⁰⁴. In jenen Mäusen konnte gezeigt werden, dass der aufgrund der Foxo3-Defizienz gesteigerte ROS-Level in Erythrozyten eine deutlich reduzierte Erythrozyten-Lebensdauer zur Folge hat ²⁰⁴. Aufgrund der in Abschnitt 5.3.3.1 und 5.3.3.2 dargestellten Resultate der Analysen des ROS- bzw. Superoxid-Levels in PON2^{-/-}-HSCs bzw. dem Gesamtknochenmark, wäre zu erwarten gewesen, dass auch die Erythrozyten PON2-defizienter Mäuse gesteigerte ROS-Level aufweisen und infolgedessen eine geringere Lebenserwartung haben. Entgegen den begründeten Erwartungen wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch eine verlängerte Lebensdauer von PON2^{-/-}-Erythrozyten im Vergleich zu WT-Erythrozyten festgestellt (siehe Abbildung 44 A sowie Abbildung 61 B). Als weiterführende Analysen wären Chemilumineszenz- oder Fluoreszenz-basierte Methoden geeignet, um den ROS-Level in PON2^{-/-}- und WT-Erythrozyten zu bestimmen.

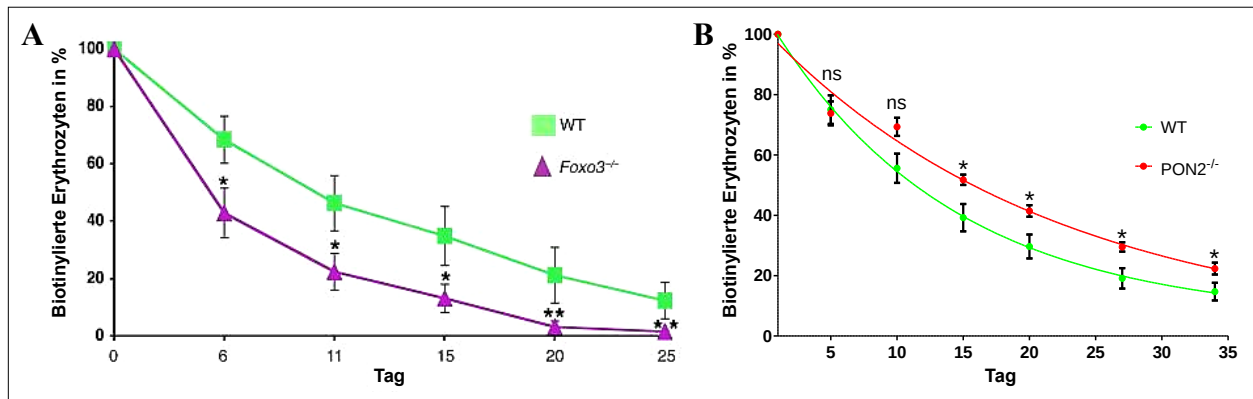


Abbildung 61: Vergleich der Erythrozyten-Lebensdauer in *Foxo3*^{-/-}- und *PON2*^{-/-}-Mäusen sowie Wildtypen. Periphere Blutzellen wurden mithilfe einer intravenösen Injektion von sulfo-NHS-Biotin markiert. In Abständen von 5 - 7 Tagen wurden den Versuchstieren Blutproben entnommen, die Blutzellen isoliert und anschließend mithilfe von Fluoreszenz-konjugiertem Streptavidin sowie dem Erythrozytenmarker Ter119 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Ausgewertet wurde der prozentuale Anteil der biotinylierten Erythrozyten von der Gesamtanzahl der Erythrozyten in (A) WT und *Foxo3*^{-/-}-Mäusen (übernommen und modifiziert aus Marinkovic et al. 2007²⁰⁴) sowie in (B) WT und *PON2*^{-/-}-Mäusen. Die Lebensdauer der WT-Erythrozyten in beiden Versuchen ist nahezu identisch, während die *Foxo3*^{-/-}-Erythrozyten eine verringerte und die *PON2*^{-/-}-Erythrozyten eine gesteigerte Lebensdauer aufweisen. * p<0,05, ** p<0,01; n.s., nicht signifikant; T-Test.

Das gesteigerte Erythrozytenvolumen sowie die veränderte Hämoglobin-Konzentration pro Erythrozyt weisen auf eine Störung der Erythrozyten-Reifung hin (siehe Abbildung 27 und Abbildung 49). Da eine verringerte Lebensdauer der *PON2*^{-/-}-Erythrozyten und eine damit einhergehende gesteigerte Zahl der größeren Retikulozyten im Blut als Grund für das gesteigerte durchschnittliche Erythrozytenvolumen bereits ausgeschlossen werden konnte, wurde geprüft, ob der Verlust von PON2 und seiner anti-oxidativen Funktion Auswirkungen auf den Zellzyklus von Vorläuferzellen der erythroiden Entwicklungslinie hat. Die Identifizierung einer Veränderung im Zellzyklus erythroider Vorstufen im Knochenmark könnte eine der Ursachen für die Bildung "abnormaler" Erythrozyten darstellen. Analog zu den unter 5.3.6.1 beschriebenen und in Abschnitt 6.2 diskutierten Analysen des Zellzyklus der LT-HSCs sowie der Gesamt-LSK-Fraktion wurden Zellzyklusanalysen mit MEPs, einer Subpopulation der Lin⁻ Sca1⁻ ckit⁺-Fraktion durchgeführt. Unterteilt wurde der Zellzyklusstatus der Zellen in G0-, G1-, bzw. S-, M-, G2-Phase. Die anschließende statistische Auswertung der Daten offenbarte eine signifikant gesteigerte Anzahl an MEPs aus *PON2*-defizienten Mäusen in der G1-Phase sowie eine verringerte Anzahl in der G0-Phase (Ruhephase). Unterschiede des Anteils der Zellen in der G2-, S- und M-Phase konnten hingegen nicht detektiert werden (siehe Abbildung 47). Ähnliche Analysen wurden 2007 von Marinkovic et al. an späteren Erythrozyten-Vorläuferzellen (CD71⁺ TER119⁺-Zellen) aus *Foxo3*-defizienten Mäusen durchgeführt und enthüllten ebenfalls eine Steigerung der prozentualen Zellzahl in der G1-Phase des Zellzyklus. Allerdings wurde in jener Studie außerdem eine signifikante Verringerung der

prozentualen Zellzahl in der S-Phase ermittelt²⁰⁴, die in den Studien der vorliegenden Arbeit nicht erkennbar war. Insgesamt implizieren die aufgeführten Resultate, dass PON2 bzw. PON2-moduliertes Redox-Signaling eine Rolle in der Regulation des Zellzyklus in MEPs spielt.

Ein potenzieller Grund für die PON2-vermittelte Modulation des Zellzyklus in MEPs (siehe Abbildung 47), aber nicht in LT-HSCs bzw. LSK-Zellen (siehe Abbildung 41), konnte mithilfe der in Abschnitt 5.2 beschriebenen PON2-Expressionsanalysen in hämatopoetischen Zellen wildtypischer Mäuse identifiziert werden. Jene Analysen legten einen extrem hohen PON2-mRNA-Expressionslevel in MEPs junger Mäuse offen, welcher sogar den Expressionslevel der Leberzellen, der als Referenzwert verwendet wurde, überstieg (siehe Abbildung 21). Dieses Ergebnis lässt eine besondere Bedeutung von PON2 in MEPs vermuten und liefert die Erklärung dafür, dass eine PON2-Defizienz größere Auswirkungen auf MEPs als auf hämatopoetische Zellen mit basal niedrigerer PON2-Expression hat.

Zusätzlich zu den zuvor diskutierten Versuchen wurden mittels intraperitonealer Injektionen von Phenylhydrazin Analysen der Stress-Erythropoese in WT- und PON2^{-/-}-Tieren durchgeführt. Studien dieser Art wurden in der Vergangenheit unter anderem an den zuvor mehrfach erwähnten Foxo3^{-/-}-Mäusen²⁰⁴, sowie Dhh (*Desert Hedgehog*)^{-/-}²⁰⁵ und Miz-1 (*Myc-interacting zinc finger protein 1*)-defizienten Mäusen²⁰⁶ durchgeführt. Die Phenylhydrazin-Injektion bewirkt dabei eine hämolytische Anämie, die durch einen Sauerstoffmangel im Gewebe (Hypoxie) der Niere detektiert wird und zur Induktion einer vermehrten Erythrozyten-Produktion führt. Während der Stress-Erythropoese unterstützt zusätzlich die Milz die Bildung neuer Erythrozyten. Aufgrund des gesteigerten ROS-Levels in verschiedenen hämatopoetischen Zellen der PON2^{-/-}-Mäuse und der Ergebnisse aus Studien von Marinkovic et al., die zeigen konnten, dass Foxo3^{-/-}-Mäuse nach Phenylhydrazin-Behandlung signifikant weniger reife Erythrozyten im Blut aufwiesen als WT-Tiere²⁰⁴, wäre zu erwarten gewesen, dass PON2^{-/-}-Mäuse ebenfalls sensibel auf die Induktion einer hämolytischen Anämie durch Phenylhydrazin reagieren und eine verlangsamte Regeneration der physiologischen Erythrozytenzahl aufweisen. Entgegen jenen Erwartungen wiesen PON2^{-/-}-Tiere an Tag 5 des durchgeführten Versuches im Vergleich zu WT-Tieren eine signifikant gesteigerte Erythrozytenzahl auf, was auf eine gesteigerte Stress-Erythropoese hindeutete (siehe Abbildung 45). Ein Grund für die verbesserte Stressreaktion in PON2-defizienten Tieren könnte in der zuvor erwähnten, potentiell durch einen anti-apoptotischen Kompensationsmechanismus sowie gesteigerte Sox6-Expression bedingten, erhöhten Anzahl verschiedener später Erythrozyten-Vorläufer im Knochenmark zu finden sein (siehe Abbildung 46). Dieses Depot an Proerythroblasten sowie basophilen und polychromatischen Erythroblasten ermöglichte höchst wahrscheinlich eine

schnellere Bereitstellung junger Erythrozyten, um die durch die Hämolyse zerstörten Zellen zu ersetzen. In zukünftigen Studien wäre es empfehlenswert, die Epo-Konzentration im Serum von PON2^{-/-}-Tieren zu ermitteln, um ergänzend feststellen zu können, ob durch die Phenylhydrazin-Behandlung zusätzlich eine verstärkte Epo-Ausschüttung von der Niere ausgeht. Zusammengefasst kann davon ausgegangen werden, dass PON2 oder PON2-modulierte Signalwege eine Rolle in der Stress-Erythropoese spielen, die in weiterführenden Analysen genauer untersucht werden sollte.

Neben den im Blutbild deutlich gewordenen Auffälligkeiten der Erythrozyten, konnten Normabweichungen der Thrombozyten PON2-defizienter Mäuse festgestellt werden. Einerseits war das mittlere Thrombozytenvolumen in jungen und alten PON2^{-/-}-Tieren signifikant erhöht und andererseits war die Thrombozytenzahl im Blut junger Tiere signifikant verringert (siehe Abbildung 27 und Abbildung 49). Diese Veränderungen implizierten eine Störung der Thrombopoese. Die in Abschnitt 5.3.7.4 beschriebenen und im Hinblick auf die Erythropoese bereits diskutierten Modulationen des Zellzyklus in MEPs (siehe Abbildung 47), deuten ebenfalls auf eine gestörte Thrombozyten-Reifung hin.

In diesem Zusammenhang wurden in der vorliegenden Arbeit, analog zu den Studien des Erythrozytenumsatzes, Analysen des Thrombozytenumsatzes durchgeführt, denn eine verkürzte Lebenserwartung könnte eine Erklärung für den verringerten PLT im Blut von PON2^{-/-}-Tieren liefern. Die Resultate, die kürzlich bereits in Ebert et al. veröffentlicht wurden, zeigten jedoch keine Veränderung der Lebensdauer PON2-defizienter Thrombozyten im Vergleich zu WT-Zellen (siehe Abbildung 44 B sowie ³¹). In diesem Zusammenhang wäre es ratsam, in Zukunft nach weiteren möglichen Erklärungsansätzen für die veränderte Thrombozytenzahl zu suchen, vor allem da in Studien an NAC-behandelten PON2^{-/-}-Tieren gezeigt werden konnte, dass dieser Effekt durch die kontinuierliche Antioxidant-Applikation und die resultierende Verringerung des ROS-Levels nicht aufgehoben werden konnte (siehe Abbildung 38). Dieses Ergebnis weist auf eine PON2-abhängige, jedoch ROS-unabhängige Modulation der Thrombozytenzahl hin.

Im Zusammenhang mit dem in Abbildung 27 J und Abbildung 49 J deutlich dargestellten gesteigerten Thrombozytenvolumen wurde innerhalb der Analysen des Transkriptoms von PON2^{-/-}- und WT-LTHSCs eine differentielle Expression des Glykoproteins GP1BB (*Glycoprotein Ib Platelet Beta Subunit*, auch als CD42c bekannt) festgestellt (siehe Tabelle 21). Mutationen des in PON2-defizienten LT-HSCs reprimierten GP1BB-Gens wurden in Studien von Savoia et al. mit dem Bernard-Soulier Syndrom (BSS; MIM #231200) assoziiert.

Dieses Syndrom ist unter anderem durch eine Makrothrombozytopenie charakterisiert²⁰⁷. Eine PON2-abhängige Modulation der Expression von GP1BB könnte demnach eine plausible Erklärung für das gesteigerte MPV liefern. Allerdings wurde in Patienten mit Bernard-Soulier Syndrom zusätzlich eine gesteigerte Blutungsneigung aufgrund gestörter Thrombozyten-Adhäsion an das vaskuläre Subendothelium diagnostiziert, während PON2-defiziente Mäuse eine gesteigerte prokoagulante Aktivität der Thrombozyten aufweisen³¹.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Analysen der Thrombozyten nicht weiter vertieft, da die weiterführende Erforschung des Beitrages der PON2 an der Redox-Homöostase, Calcium-Signalgebung und Aggregation von Thrombozyten Gegenstand einer weiteren Dissertationsarbeit innerhalb der Arbeitsgruppe ist.

6.4 PON2 ist an der Regulation der Reifung verschiedener Immunzellen in Milz und Thymus beteiligt

Zusätzlich zu den in Abschnitt 6.3 diskutierten Analysen der Thrombozyten und Erythrozyten sowie deren Vorläufern wurden in der vorliegenden Arbeit Studien lymphoider Zellen sowie lymphatischer Organe durchgeführt.

Die gewonnenen Resultate weisen auf einen durch die Abwesenheit von PON2 verursachten Defekt in der Reifung verschiedener lymphatischer Zellen in Milz und Thymus hin und sollen im Folgenden diskutiert werden.

Wie in Abschnitt 1.3.4 beschrieben, werden frühe B-Zellen im Anschluss an ihre Reifung im Knochenmark in die Peripherie entlassen. Im Anschluss an den Antigenkontakt immigrieren die aktivierten B-Zellen in Milz oder Lymphknoten, wo sie stark proliferieren und zu Plasmazellen oder zu B-Gedächtniszellen differenzieren (siehe¹⁰⁴ und Abbildung 63).

Der Prozess der B-Zell Proliferation und Differenzierung scheint in PON2-defizienten Mäusen gestört zu sein. Durchflusszytometrische quantitative Analysen verschiedener B-Zell-Entwicklungsstufen in der Milz von PON2^{-/-} im Vergleich zu WT-Mäusen ergaben eine statistisch signifikante, um etwa 5 % verringerte Zahl früher B-Zellen und weiter ausgereifter B-Zellen in jungen Tieren, sowie eine signifikante, auf etwa das Doppelte gesteigerte Zahl ausdifferenzierter B-Zellen, zu denen auch die bereits aktivierten B-Zellen zählen, in jungen und alten Tieren (siehe Abbildung 18). Die starke Anreicherung der ausdifferenzierten bzw. aktivierten B-Zellen in der Milz könnte als Anzeichen einer Inflammation oder eines

Lymphoms interpretiert werden und bedarf deshalb genauerer Betrachtung.

Zusätzlich zu den veränderten Zellzahlen der B-Zell-Entwicklungsstufen in der Milz, wurde in alten weiblichen $PON2^{-/-}$ -Mäusen eine Splenomegalie festgestellt (siehe Abbildung 16). In jungen weiblichen sowie alten männlichen Mäusen wurde ebenfalls eine signifikante Erhöhung des Milzgewichtes ermittelt, jedoch war die Veränderung im Vergleich zum Wildtyp in keiner der Gruppen so deutlich ausgeprägt wie in alten Weibchen (siehe Abbildung 17). Zur detaillierten Analyse der Histologie wurden in früheren, unveröffentlichten Studien der Arbeitsgruppe Schnitte der Milzen alter $PON2^{-/-}$ - und WT-Tiere angefertigt und im Anschluss an eine Hämatoxylin-Eosin- (HE) Färbung durch Dr. Andreas Kreft (Pathologie, UM Mainz) analysiert. Hierbei wurden erhöhte Mengen an potentiell neoplastischen Infiltrats, Zerstörungen der Milzstruktur (vorrangig der weißen Pulpa) mit inflammatorischer Aktivierung sowie auffällig hohe Mengen an Plasmazellen diagnostiziert (siehe Abbildung 62). Vermutlich handelt es sich hierbei um polyklonale Plasmazellen, die auf eine reaktive Splenomegalie hindeuten.

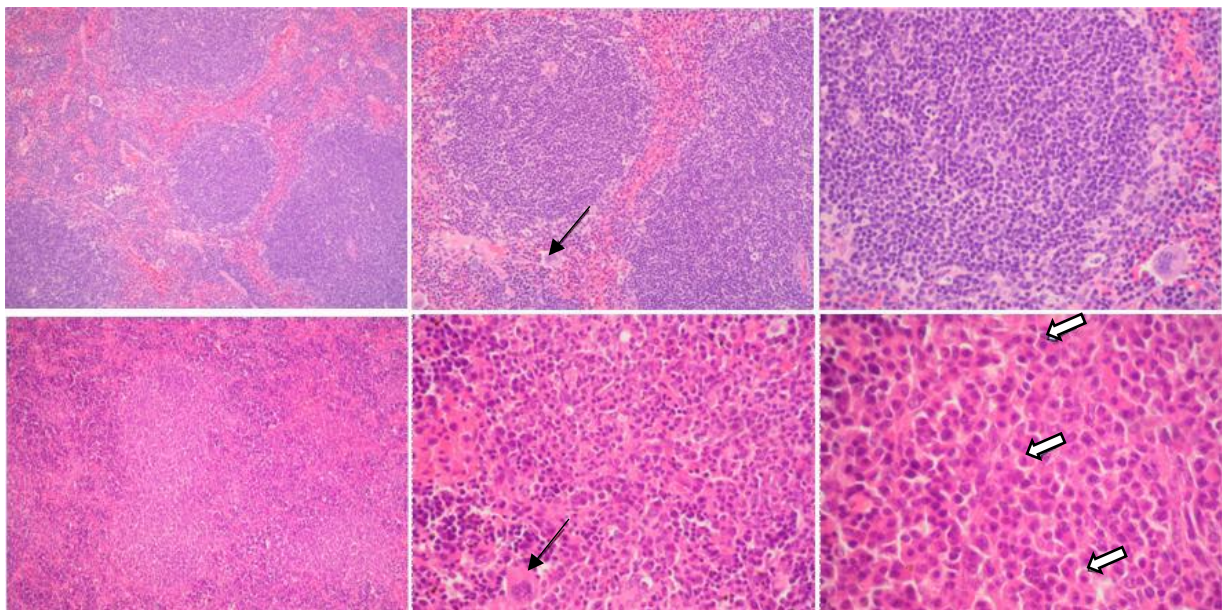


Abbildung 62: Repräsentative Histologie der Milz mehr als 9 Monate alter WT- und $PON2^{-/-}$ -Tiere. Hämatoxylin-Eosin- (HE) Färbung. Die Sektion der $PON2^{-/-}$ -Milz (unten) zeigte im Vergleich zur WT-Milz (oben) eine Anreicherung potentiell neoplastischen Infiltrates, eine weitgehende Zerstörung der Milzstruktur mit entzündlicher Aktivierung und hohe Mengen an Plasmazellen (Block Pfeile); die Megakaryozyten (schwarze Pfeile) schienen unverändert (unveröffentlichte Daten).

Bringt man jedoch die mittels Durchflusszytometrie ermittelte deutliche Steigerung der Zellzahl ausdifferenzierter bzw. aktivierter B-Zellen (siehe Abbildung 18) mit der Histologie der Milz in Verbindung, entsteht die Vermutung, dass sich es sich bei den identifizierten Plasmazellen auch um Plasmablasten handeln könnte, eine Vorstufe der Plasmazellen (siehe Abbildung 63), deren pathologische Vermehrung wie zuvor erwähnt auf ein Lymphom bzw. ein B-Zell-Malignom anstelle einer reaktiven Splenomegalie hindeuten würde. Im Anschluss an ihre Aktivierung gehen Plasmablasten gewöhnlich innerhalb von 3 - 4 Tagen durch Apoptose zugrunde²⁰⁸ oder differenzieren weiter zu Plasmazellen, ihre Lebensspanne kann jedoch durch verschiedene pathologische Faktoren deutlich verlängert werden²⁰⁹.

Aufgrund der überdurchschnittlichen Steigerung des Milzgewichtes im Laufe des Alterungsprozesses liegt der Schluss nahe, dass sich vermehrt Plasmablasten in der Milz PON2-defizienter Tiere ansammeln und ein permanentes Lymphom bzw. ein B-Zell-Malignom verursachen. Diese Hypothese sollte in zukünftigen Studien beispielsweise durch eine Biopsie sowie molekularbiologische Untersuchungen geprüft werden.

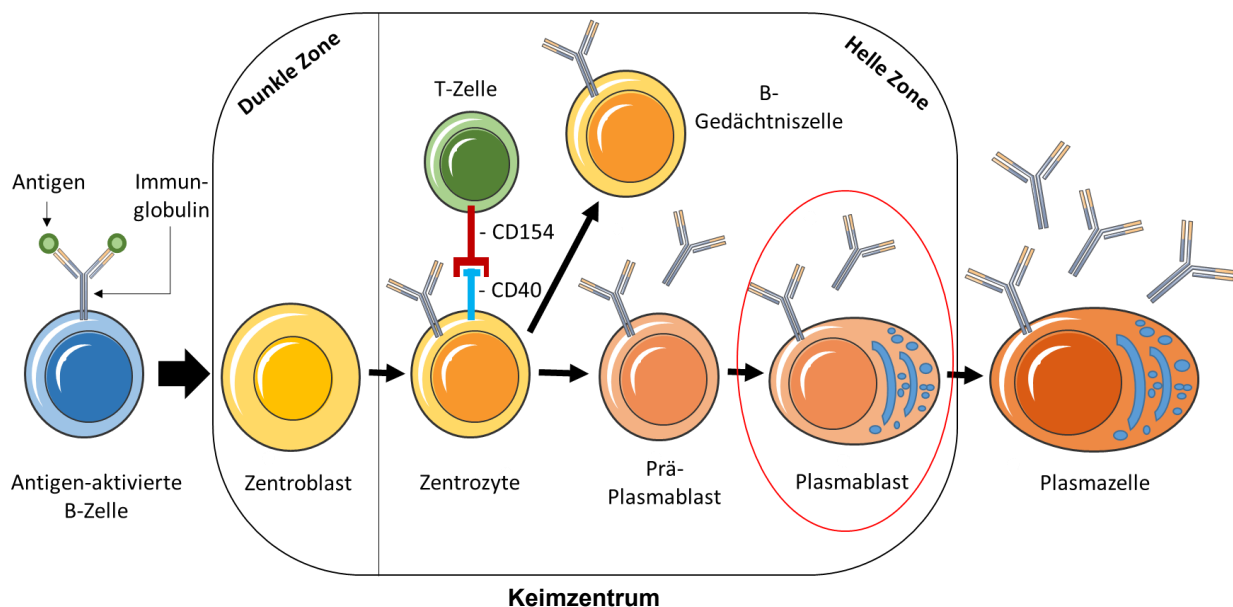


Abbildung 63: Entwicklung der Antigen-aktivierten B-Zelle zur Plasmazelle oder B-Gedächtniszelle. Dieses Schema zeigt die verschiedenen Entwicklungsstufen, die B-Zellen nach ihrer Aktivierung durch Antigene in sogenannten Keimzentren (*Germinal centre*) durchlaufen. Abbildung in Anlehnung an Klein und Della-Favera 2008¹⁰⁴.

Neben den pathologischen Veränderungen der Milzstruktur sowie der B-Zell-Reifung wurden in PON2-defizienten Mäusen Auffälligkeiten des Thymusgewichtes sowie der Reifung von T-Zellen im Thymus festgestellt.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen des Thymusgewichtes ergaben eine signifikante Erhöhung bei jungen weiblichen und alten männlichen PON2^{-/-}-Tieren im Vergleich zu gleichaltrigen und gleichgeschlechtigen Wildtypen (siehe Abbildung 19). In männlichen Tieren weist dieses Ergebnis auf eine verlangsamte Thymusinvolution hin, die potenziell auf eine Dysregulation des Hormonhaushaltes als Folge der PON2-Defizienz zurückgeführt werden kann. Zum Hormonhaushalt von PON2^{-/-}-Mäusen liegen bis zum heutigen Tag keine Daten vor, was eine zukünftige Betrachtung empfehlenswert macht.

Durchflusszytometrische quantitative Analysen der verschiedenen T-Zell-Entwicklungsstufen in PON2^{-/-}-Mäusen ergaben keine Abweichungen in jungen Tieren, jedoch sehr deutliche Veränderungen in alten Tieren. Die festgestellte signifikante Steigerung bzw. Verminderung der prozentualen Zellzahl verschiedener T-Zell-Populationen (siehe Abbildung 20) weist auf eine Differenzierungsblockade sowie eine potenziell gestörte Migration der T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen in die Peripherie hin.

Die prozentuale Anzahl der frühen T-Vorläuferzellen (siehe Abbildung 20 A) in PON2^{-/-}-Mäusen war verringert, was eine verminderte Migration jener Zellen aus dem Knochenmark in den Thymus impliziert. Die gesteigerte Anzahl an doppelt-negativen T-Zellen (siehe Abbildung 20 B), die aus den T-Vorläuferzellen hervorgehen, lässt eine Differenzierungsblockade vermuten. Dadurch reichern sich die Zellen an und scheinen erst verspätet weiter auszu-differenzieren, was daran zu erkennen ist, dass die prozentuale Anzahl der doppelt-positiven T-Zellen, die die nächste Entwicklungsstufe darstellen, signifikant verringert war (siehe Abbildung 20 C). Bei Betrachtung der einfach-negativen T-Helferzellen (siehe Abbildung 20 D) und zytotoxischen T-Zellen (siehe Abbildung 20 E) fiel jedoch erneut eine signifikante Zellanreicherung auf, was darauf hindeuten könnte, dass jene Zellen im Thymus zurückgehalten werden, anstatt in das periphere System zu migrieren.

Insgesamt implizieren die in den Studien dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse, dass eine nähere Betrachtung der T-Zell-Reifung im Thymus PON2-defizienter Tiere in der Zukunft empfehlenswert wäre, um gewonnene Resultate bzw. Schlussfolgerungen zu verifizieren und zu ergänzen.

6.5 PON2^{-/-}-Mäuse als potenzielles Modell für Stammzellalterung

Da während der Examination des hämatopoetischen Systems mehr als 9 Monate alter PON2-defizienter Mäuse verschiedene Modulationen aufgedeckt wurden, die mit einer weiter fortgeschrittenen Stammzellalterung sowie einer Immunseneszenz in Verbindung gebracht werden konnten, wurde die Hypothese aufgestellt, dass PON2 eine Rolle in der Erhaltung der Stammzellfunktion während des Alterungsprozesses spielt, wodurch PON2^{-/-}-Mäuse eine beschleunigte HSC-Alterung erleiden und ein potenzielles Alterungsmodell darstellen könnten.

Wie in Abschnitt 1.3.2.2 dargestellt, weisen die HSCs alter Mäuse im Vergleich zu denen junger Tiere verschiedene Modifikationen auf, die mit einer Änderung in ihrem hämatopoetischen Potenzial verbunden sind. Zu diesen Modifikationen zählt unter anderem die Dysfunktion der Selbsterneuerungsfähigkeit⁸⁷ und die damit verbundene Expansion der verschiedenen HSPC-Subpopulationen^{82, 85, 86}, die dazu dient, die im Alter auftretende verminderte HSC-Leistung auf einer pro-Zelle-Basis auszugleichen. Die Expansion ist nötig, um auch im hohen Alter die Blutbildung konstant aufrecht halten zu können^{88, 89}. Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch quantitative Analysen nachgewiesen werden, dass die Modifikationen der Zellzahl im Knochenmark alter PON2^{-/-}-Mäuse signifikant stärker ausgeprägt sind als in gleichaltrigen Wildtypen (siehe Abbildung 48 A, B & C). In mehr als 9 Monate alten Tieren, die in verschiedenen Studien der HSC-Alterung noch zu der mittleren Altersgruppe (zumeist 9-12 Monate alt) gezählt wurden, ist eine derartige Steigerung der Zellzahl, die derer von Mäusen in der dritten Alterskategorie (zumeist 18-24 Monate) entspricht, als Zeichen einer vorzeitigen Alterung des HSC-Kompartiments zu deuten. Ein ähnlicher Phänotyp wurde 2016 von Dawar et al. in Caspase-2^{-/-}-Mäusen beobachtet²¹⁰.

Eine weitere Modifikation gealterter HSCs im Vergleich zu jungen betrifft deren Redox-Status. Während des Alterungsprozesses wird die ROS-Produktion in HSCs deutlich gesteigert (siehe Abbildung 6 und⁸⁰). Auch dieser Aspekt wurde in alten PON2^{-/-}-Tieren im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtypen durchflusszytometrisch analysiert und offenbarte eine numerische Steigerung des ROS-Levels in allen Subpopulationen der LSK-Fraktion PON2-defizienter Tiere (siehe Abbildung 55). Jenes Resultat impliziert, dass die in alten Wildtypen auftretende Akkumulation intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies in HSCs der PON2^{-/-}-Tiere potenziert ist, was ebenfalls für eine vorzeitige Alterung jener Zellen spricht bzw. unter Umständen die Ursache der frühzeitigen Alterungserscheinungen darstellt. Erhöhte ROS-Level wie jene in PON2^{-/-}-Tieren, die zu Dysfunktionen der HSCs mit zunehmendem Alter führen, wurden in der Vergangenheit bereits unter anderem in ATM^{-/-}²¹¹, Foxo^{-/-}^{78, 212, 213},

Bmi1^{-/-} ²¹⁴ und Casp2^{-/-}-Mäusen ²¹⁰ beschrieben.

Neben der zuvor diskutierten Expansion der verschiedenen LSK-Subpopulationen sowie der gesteigerten ROS-Produktion, weisen die HSCs älterer Tiere eine veränderte Differenzierungsrichtung (Linienentscheidung) auf ^{85, 86}. Neuesten Erkenntnissen zufolge können die HSCs in drei Subpopulationen eingeteilt werden. Die bala-HSCs (*balanced*) differenzieren zu jenen Verhältnissen in lymphoide und myeloide Zellen aus, wie diese auch im peripheren Blut junger Mäuse vorliegen, sodass Lymphozyten mengenmäßig überwiegen. Die *Ly-biased* HSCs hingegen differenzieren in normaler Anzahl in Lymphozyten, jedoch in verringertem Maße in Myelozyten. Für *My-biased* HSCs ist dieses Verhältnis umgekehrt. In jungen Mäusen ist der überwiegende Teil der HSCs *Ly-biased*, während in alten Tieren der überwiegende Teil *My-biased* ist (siehe Abbildung 6 sowie ^{93, 215}). Diese Veränderung im Alter führt zu einer vermehrten Anzahl myeloider Vorläuferzellen im Knochenmark sowie zu einer modulierten myeloid/lymphoid-Verteilung im peripheren Blut. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten quantitativen Analysen der myeloiden Vorläuferzellen im Gesamtknochenmark alter PON2-defizienter und wildtypischer Mäuse deckten eine signifikant gesteigerte prozentuale Anzahl an CMPs, MEPs sowie GMPs in PON2^{-/-}-Tieren auf (siehe Abbildung 48). Dieses Resultat belegte eine über die normalen Altersveränderungen hinausgehende Verschiebung der Differenzierungsrichtung hin zu einer potenzierten Anzahl myeloider Zellen. Damit korrespondierend wurden vergleichende Analysen der my/ly-Verteilung im Blut durchgeführt, die entsprechend den Erwartungen eine stärker ausgeprägte Linienverschiebung und eine damit verbundene beginnende Immunseneszenz in PON2^{-/-}-Mäusen konstatierten (siehe 5.4.1.2.1). Diese Erkenntnis liefert eine weitere Bestätigung der Hypothese, dass eine PON2-Defizienz zu frühzeitiger HSC-Alterung führt. Ähnliche Resultate mit gleicher Schlussfolgerung wurden 2016 von Dawar et al. ²¹⁰ an Caspase-2^{-/-}-Mäusen erlangt, die auf Effektebene dem PON2^{-/-}-Mausmodell stark ähneln.

Eine zusätzliche Modulation, die HSCs im Laufe des Alterungsprozesses erleben, ist eine reduzierte Telomeraseaktivität. Diese Aktivitätsabnahme führt zu einem kontinuierlichen Verkürzen der Telomere und dadurch zu einer Limitierung der Zellproliferationskapazität der HSCs auf eine endliche Anzahl an Zellteilung ⁸⁰. Innerhalb der durchgeführten Studie wurden keine Analysen der Telomerlänge von alten PON2^{-/-}- und WT-HSCs durchgeführt, allerdings konnte innerhalb der Transkriptomanalysen junger LT-HSCs bereits eine Repression des Gens TERT, das für einen katalytischen Subkomplex des Enzyms Telomerase codiert, festgestellt werden, die vermuten lässt, dass bereits in jungen Tieren eine verringerte Telomeraseaktivität vorliegt, die während der Alterung eine fortschreitende Verkürzung der Telomere bewirkt und

im Laufe der Zeit zu einer HSC-Seneszenz führt.

All jene bisher genannten Auffälligkeiten unterstützen die Hypothese, dass $PON2^{-/-}$ -Mäuse eine frühzeitige HSC-Alterung erleiden und in zukünftigen Studien potenziell als Alterungsmodell eingesetzt werden könnten.

Ergänzend zu den bereits beschriebenen Analysen wurden jedoch auch Versuche durchgeführt, deren Resultate die aufgestellte Hypothese nicht unterstützen.

Laut verschiedener Studien weisen die HSCs älterer Mäuse, hauptsächlich aufgrund der erhöhten intrazellulären ROS-Produktion, eine gesteigerte DNA-Fragmentierung auf^{83, 84}. Diese Fragmentierung konnte beispielsweise in den HSCs der zuvor erwähnten Caspase-2^{-/-}-Mäuse, die ebenfalls gesteigerte ROS-Level aufweisen, festgestellt werden²¹⁰. In durchflusszytometrischen Analysen der LSK-Zellen älterer $PON2^{-/-}$ - und WT-Mäuse wurde mithilfe des Antikörpers gamma-H2A.X jedoch keine Veränderung der Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen durch die $PON2$ -Defizienz und die resultierenden gesteigerten ROS-Level detektiert (siehe Abbildung 56). Wie in Abschnitt 6.1 bereits diskutiert, könnte dieses Ergebnis auf eine Induktion des Gens RECQL4 zurückgeführt werden, das für die DNA Helicase Q4 codiert, die essentiell für die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen ist^{176, 177}.

Weiterhin wurde in mehreren Studien beschrieben, dass die verschiedenen Änderungen, wie beispielsweise gesteigerte ROS-Level, vermehrte Expression pro-inflammatorischer Zytokine usw., die in HSCs während des Alterungsprozesses auftreten, zu einer gesteigerten Apoptoserate führen^{80, 83}. Aus diesem Grund wäre gemäß der aufgestellten Hypothese der frühzeitigen Alterung $PON2$ -defizienter Zellen zu erwarten gewesen, dass die $PON2^{-/-}$ -HSCs eine im Vergleich zum WT gesteigerte prozentuale Anzahl apoptotischer Zellen aufweisen. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Annexin V-Färbungen erbrachten jedoch den Nachweis für eine verringerte Apoptoserate von $PON2^{-/-}$ -LT- und ST-HSCs. Wie in Abschnitt 6.1 diskutiert, wies dieses Resultat auf einen ausgeprägten anti-apoptotischen Kompensationsmechanismus der Zellen hin.

Auch die Repopulationsfähigkeit der HSCs verändert sich im Alter. Studien von Morrison et al. aus dem Jahr 1996 konnten belegen, dass HSCs von alten Mäusen ein erheblich weniger effektives *Engraftment* aufweisen als HSCs aus jungen Mäusen⁸². Aus diesem Grund wäre zu erwarten gewesen, dass die potenziell schneller alternden $PON2^{-/-}$ -HSCs eine schlechtere Leistung in Transplantationsversuchen aufweisen als WT-HSCs. Die serielle Transplantation von Knochenmarkzellen $PON2$ -defizienter und wildtypischer Spendertiere in junge Empfängertiere, die in Abschnitt 6.2 bereits angesprochen wurde, zeigte jedoch eine verlängerte

Überlebenszeit bzw. eine höhere Überlebensrate der Empfänger von alten $\text{PON2}^{-/-}$ -BMCs (siehe Abbildung 58).

Die in diesem Abschnitt diskutierten Resultate demonstrieren, dass die HSCs PON2 -defizienter Tiere einige Charakteristika eines beschleunigten HSC-Alterungsprozesses aufweisen, jedoch nicht alle Ergebnisse die Hypothese der Deklaration von $\text{PON2}^{-/-}$ -Mäusen als Alterungsmodell unterstützen. Zusammengefasst konnten jedoch mehr Pro- als Kontra-Argumente verzeichnet werden. Der Fakt, dass einige der oben beschriebenen altersassoziierten Effekte, respektive die Expansion der verschiedenen Subpopulationen innerhalb der LSK-Fraktion sowie die gesteigerte Zellzahl oligopotenter myeloischer Vorläuferzellen, in jungen kontrolltransplantierten $\text{PON2}^{-/-}$ -Tieren ebenfalls erkennbar waren (siehe Abbildung 30) und dadurch vermutlich einen Stress-assoziierten Phänotyp darstellen, dient als weiteres unterstützendes Argument dieser Hypothese. Verschiedene andere Charakteristika älterer HSCs wie beispielsweise vermehrte Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen ⁸⁰, beeinträchtigte Zielfindungsfähigkeit ⁸¹, ⁸² und Modulationen des Zellzyklus ⁸⁰ wurden in alten $\text{PON2}^{-/-}$ -Tieren nicht untersucht und bieten die Möglichkeit, die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Studien in Zukunft zu ergänzen und weitere unterstützende oder ablehnende Argumente der aufgestellten Hypothese zu identifizieren.

7 Zusammenfassung

Der intrazelluläre Level reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Genexpression, verschiedener Zellschicksalsentscheidungen und der Differenzierung, einschließlich der Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen (HSCs) unter sowohl physiologischen als auch pathophysiologischen Bedingungen. Das intrazelluläre Enzym Paraoxonase-2 (PON2) ist für seine anti-oxidative und anti-apoptotische Funktion, unter anderem in der Leukämie bekannt. Das Enzym ist im endoplasmatischen Retikulum sowie den Mitochondrien lokalisiert, wo es eine essentielle Bedeutung in der Steuerung der ROS-Produktion innehat. Dies steht im Einklang mit der Assoziation von PON2 mit dem Therapieansprechen in pädiatrischer akuter lymphatischer Leukämie (ALL) sowie Imatinib-Resistenz in Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie (CML). Diese Verbindung sowie der bekannte Einfluss des *Redox-Signalings* auf die Quieszenz, Apoptose, Differenzierung und Selbsterneuerung von HSCs führte zu der Vermutung, dass PON2 die Hämatopoese reguliert und durch Redox-vermittelte Mechanismen an der Steuerung der HSC-Funktion beteiligt ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals beschrieben, dass eine PON2-Defizienz *in vivo* sowohl zu quantitativen als auch zu morphologischen und funktionellen Veränderungen hämatopoetischer Zellen führt. Durchflusszytometrische Analysen der Milz-, Thymus- und Knochenmarkzellen von PON2^{-/-}-Tieren enthüllten eine gestörte Immunzellreifung in den lymphatischen Organen und veränderte Zellzahlen hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen (HSPCs) im Knochenmark, mit deutlich ausgeprägtem *myeloid skewing* in über 9 Monate alten Tieren. Labormedizinische Untersuchungen des Blutes zeigten quantitativ unveränderte, jedoch morphologisch auffällige Erythrozyten mit veränderter zellulärer Hämoglobin-konzentration sowie vergrößerte und quantitativ veränderte Thrombozyten. Des Weiteren wurden Veränderungen in der myeloid/lymphoid-Verteilung der zellulären Bestandteile des Blutes alter PON2^{-/-}-Tiere aufgedeckt. Die Untersuchungen reziprok transplanteder Chimären demonstrierten, dass die aufgedeckten Effekte hauptsächlich auf intrazelluläres *Signaling* und nicht auf Nischeneffekte zurückzuführen sind. Weiterführende Analysen auf zellspezifischem Level zeigten erhöhte ROS- bzw. Superoxid-Level, verringerte Apoptoseraten sowie unveränderte DNA-Schädigung in hämatopoetischen Zellen PON2-defizienter Mäuse. Anschließend durchgeführte funktionelle Analysen der HSPCs offenbarten eine gesteigerte Repopulationsfähigkeit der PON2^{-/-}-Zellen, die weder von Änderungen im Zellzyklus, der Klonogenität oder der Zielfindungsfähigkeit abgeleitet werden konnte.

Insgesamt wiesen die Resultate dieser Arbeit auf eine Rolle der PON2 in der Reifung von Erythrozyten, Thrombozyten und Lymphozyten sowie in der Differenzierung und Funktionalität von HSPCs hin. Dementsprechend wiesen die Resultate der verschiedenen Analysen PON2-defizienter Tiere auf multiple Differenzierungsblockaden in hämatopoetischen Zellen sowie auf verschiedene Kompensationsmechanismen, die der Vorbeugung erhöhter Apoptoseraten sowie frühzeitigem Funktionsverlust von HSPCs, verursacht durch erhöhte ROS-Level, dienten, hin. Jene Mechanismen erschienen in alten PON2^{-/-}-Tieren so stark ausgeprägt, dass von einem prä-leukämischen Stadium in den HSCs ausgegangen werden konnte. Bei der genaueren Betrachtung aller Veränderungen, die bedingt durch die PON2-Defizienz im Laufe des Alterungsprozesses festgestellt wurden, konnte eine frühzeitige Stammzellalterung diagnostiziert werden und eine weiterführende Prüfung der Verwendbarkeit von PON2^{-/-}-Tieren als Stammzell-Alterungsmodell vorgeschlagen werden.

8 Literaturverzeichnis

1. Furlong CE, Marsillach J, Jarvik GP, Costa LG. Paraoxonases-1, -2 and -3: What are their functions? *Chem Biol Interact.* 2016;259(Pt B):51-62.
2. Aviram M, Rosenblat M. Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Radic Biol Med.* 2004;37(9):1304-16.
3. Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics.* 1996;33(3):498-507.
4. Aldridge WN. Serum esterases. I. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochem J.* 1953;53(1):110-7.
5. Schweikert EM, Devarajan A, Witte I, Wilgenbus P, Amort J, Forstermann U, Shabazian A, Grijalva V, Shih DM, Farias-Eisner R, Teiber JF, Reddy ST, Horke S. PON3 is upregulated in cancer tissues and protects against mitochondrial superoxide-mediated cell death. *Cell Death Differ.* 2012;19(9):1549-60.
6. Draganov DI. Human PON3, effects beyond the HDL: clues from human PON3 transgenic mice. *Circ Res.* 2007;100(8):1104-5.
7. Witte I, Foerstermann U, Devarajan A, Reddy ST, Horke S. Protectors or Traitors: The Roles of PON2 and PON3 in Atherosclerosis and Cancer. *J Lipids.* 2012;2012:342806.
8. Draganov DI, Teiber JF, Speelman A, Osawa Y, Sunahara R, La Du BN. Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *J Lipid Res.* 2005;46(6):1239-47.
9. Teiber JF, Billecke SS, La Du BN, Draganov DI. Estrogen esters as substrates for human paraoxonases. *Arch Biochem Biophys.* 2007;461(1):24-9.
10. Teiber JF, Horke S, Haines DC, Chowdhary PK, Xiao J, Kramer GL, Haley RW, Draganov DI. Dominant role of paraoxonases in inactivation of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone. *Infect Immun.* 2008;76(6):2512-9.
11. Shih DM, Gu L, Xia YR, Navab M, Li WF, Hama S, Castellani LW, Furlong CE, Costa LG, Fogelman AM, Lusis AJ. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature.* 1998;394(6690):284-7.
12. Tward A, Xia YR, Wang XP, Shi YS, Park C, Castellani LW, Lusis AJ, Shih DM. Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice. *Circulation.* 2002;106(4):484-90.
13. Ng CJ, Bourquard N, Grijalva V, Hama S, Shih DM, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ, Young S, Reddy ST. Paraoxonase-2 deficiency aggravates atherosclerosis in mice

- p>despite lower apolipoprotein-B-containing lipoproteins: anti-atherogenic role for paraoxonase-2.
- J Biol Chem*
- . 2006;281(40):29491-500.
14. Ng CJ, Bourquard N, Hama SY, Shih D, Grijalva VR, Navab M, Fogelman AM, Reddy ST. Adenovirus-mediated expression of human paraoxonase 3 protects against the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(6):1368-74.
 15. Martinelli N, Consoli L, Girelli D, Grison E, Corrocher R, Olivieri O. Paraoxonases: Ancient substrate hunters and their evolving role in ischemic heart disease. *Adv Clin Chem*. 2013;59:65-100.
 16. Giordano G, Cole TB, Furlong CE, Costa LG. Paraoxonase 2 (PON2) in the mouse central nervous system: A neuroprotective role? *Toxicol Appl Pharmacol*. 2011;256(3):369-78.
 17. Mochizuki H, Scherer SW, Xi T, Nickle DC, Majer M, Huizenga JJ, Tsui LC, Prochazka M. Human PON2 gene at 7q21.3: cloning, multiple mRNA forms, and missense polymorphisms in the coding sequence. *Gene*. 1998;213(1-2):149-57.
 18. Horke S, Witte I, Wilgenbus P, Kruger M, Strand D, Forstermann U. Paraoxonase-2 reduces oxidative stress in vascular cells and decreases endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation. *Circulation*. 2007;115(15):2055-64.
 19. Schweikert EM, Amort J, Wilgenbus P, Forstermann U, Teiber JF, Horke S. Paraoxonases-2 and -3 Are Important Defense Enzymes against *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Factors due to Their Anti-Oxidative and Anti-Inflammatory Properties. *J Lipids*. 2012;2012:352857.
 20. Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A, Hama S, Grijalva VR, Navab M, Fogelman AM, Reddy ST. Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J Biol Chem*. 2001;276(48):44444-9.
 21. Altenhöfer S, Witte I, Teiber JF, Wilgenbus P, Pautz A, Li H, Daiber A, Witan H, Clement AM, Forstermann U, Horke S. One enzyme, two functions: PON2 prevents mitochondrial superoxide formation and apoptosis independent from its lactonase activity. *J Biol Chem*. 2010;285(32):24398-403.
 22. Crofts AR, Holland JT, Victoria D, Kolling DR, Dikanov SA, Gilbreth R, Lhee S, Kuras R, Kuras MG. The Q-cycle reviewed: How well does a monomeric mechanism of the bc(1) complex account for the function of a dimeric complex? *Biochim Biophys Acta*. 2008;1777(7-8):1001-19.
 23. Muller FL, Liu Y, Van Remmen H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem*. 2004;279(47):49064-73.
 24. Han D, Canali R, Rettori D, Kaplowitz N. Effect of glutathione depletion on sites and topology of superoxide and hydrogen peroxide production in mitochondria. *Mol Pharmacol*. 2003;64(5):1136-44.

25. Devarajan A, Bourquard N, Hama S, Navab M, Grijalva V, Morvardi S, Clarke C, Vergnes L, Reue K, Teiber JF, Reddy ST. Paraoxonase 2 deficiency alters mitochondrial function and exacerbates the development of atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal*. 2011;14(3):341-51.
26. Hagmann H, Kuczkowski A, Ruehl M, Lamkemeyer T, Brodesser S, Horke S, Dryer S, Schermer B, Benzing T, Brinkkoetter PT. Breaking the chain at the membrane: paraoxonase 2 counteracts lipid peroxidation at the plasma membrane. *Faseb J*. 2014;28(4):1769-79.
27. Ng CJ, Hama SY, Bourquard N, Navab M, Reddy ST. Adenovirus mediated expression of human paraoxonase 2 protects against the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Mol Genet Metab*. 2006;89(4):368-73.
28. Ng CJ, Shih DM, Hama SY, Villa N, Navab M, Reddy ST. The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med*. 2005;38(2):153-63.
29. Reddy ST, Devarajan A, Bourquard N, Shih D, Fogelman AM. Is it just paraoxonase 1 or are other members of the paraoxonase gene family implicated in atherosclerosis? *Curr Opin Lipidol*. 2008;19(4):405-8.
30. Shih DM, Xia YR, Wang XP, Wang SS, Bourquard N, Fogelman AM, Lusis AJ, Reddy ST. Decreased obesity and atherosclerosis in human paraoxonase 3 transgenic mice. *Circ Res*. 2007;100(8):1200-7.
31. Ebert J, Wilgenbus P, Teiber JF, Jurk K, Schwierczek K, Dohrmann M, Xia N, Li H, Spiecker L, Ruf W, Horke S. Paraoxonase-2 regulates coagulation activation through endothelial tissue factor. *Blood*. 2018.
32. Witte I, Altenhofer S, Wilgenbus P, Amort J, Clement AM, Pautz A, Li H, Forstermann U, Horke S. Beyond reduction of atherosclerosis: PON2 provides apoptosis resistance and stabilizes tumor cells. *Cell Death Dis*. 2011;2(1):e112.
33. Ott M, Robertson JD, Gogvadze V, Zhivotovsky B, Orrenius S. Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(3):1259-63.
34. Kagan VE, Tyurin VA, Jiang J, Tyurina YY, Ritov VB, Amoscato AA, Osipov AN, Belikova NA, Kapralov AA, Kini V, Vlasova, II, Zhao Q, Zou M, Di P, Svistunenko DA, Kurnikov IV, Borisenko GG. Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. *Nat Chem Biol*. 2005;1(4):223-32.
35. Ott M, Zhivotovsky B, Orrenius S. Role of cardiolipin in cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ*. 2007;14(7):1243-7.
36. Schroder M, Kaufman RJ. ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res*. 2005;569(1-2):29-63.
37. Witte I, Horke S. Assessment of endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in endothelial cells. *Methods Enzymol*. 2011;489:127-46.

38. Statistisches Bundesamt Deutschland. Destatis - Todesursachen in Deutschland 2015 de.statista.com2017 [Available from: <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/240/umfrage/verteilung-der-sterbefaelle-nach-todesursachen/>].
39. Statistisches Bundesamt Deutschland. Anteil der häufigsten Krebsarten bei Kindern in Deutschland im Zeitraum von 2001 bis 2010 de.statista.com2017 [Available from: <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/222802/umfrage/anteil-der-haeufigsten-krebsarten-bei-kindern-in-deutschland/>].
40. Pise-Masison CA, Radonovich M, Mahieux R, Chatterjee P, Whiteford C, Duvall J, Guillerm C, Gessain A, Brady JN. Transcription profile of cells infected with human T-cell leukemia virus type I compared with activated lymphocytes. *Cancer Res.* 2002;62(12):3562-71.
41. Ross ME, Zhou X, Song G, Shurtleff SA, Girtman K, Williams WK, Liu HC, Mahfouz R, Raimondi SC, Lenny N, Patel A, Downing JR. Classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Blood.* 2003;102(8):2951-9.
42. Kang H, Chen IM, Wilson CS, Bedrick EJ, Harvey RC, Atlas SR, Devidas M, Mullighan CG, Wang X, Murphy M, Ar K, Wharton W, Borowitz MJ, Bowman WP, Bhojwani D, Carroll WL, Camitta BM, Reaman GH, Smith MA, Downing JR, Hunger SP, Willman CL. Gene expression classifiers for relapse-free survival and minimal residual disease improve risk classification and outcome prediction in pediatric B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2010;115(7):1394-405.
43. Frank O, Brors B, Fabarius A, Li L, Haak M, Merk S, Schwindel U, Zheng C, Muller MC, Gretz N, Hehlmann R, Hochhaus A, Seifarth W. Gene expression signature of primary imatinib-resistant chronic myeloid leukemia patients. *Leukemia.* 2006;20(8):1400-7.
44. Krüger M, Amort J, Wilgenbus P, Helmstadter JP, Grechowa I, Ebert J, Tenzer S, Moergel M, Witte I, Horke S. The anti-apoptotic PON2 protein is Wnt/beta-catenin-regulated and correlates with radiotherapy resistance in OSCC patients. *Oncotarget.* 2016;7(32):51082-95.
45. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;82(1):47-95.
46. Testa U, Labbaye C, Castelli G, Pelosi E. Oxidative stress and hypoxia in normal and leukemic stem cells. *Exp Hematol.* 2016;44(7):540-60.
47. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science.* 1978;201(4359):875-80.
48. Deby C, Goutier R. New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutases. *Biochem Pharmacol.* 1990;39(3):399-405.
49. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 1979;59(3):527-605.

50. Mosaad YM. Hematopoietic stem cells: an overview. *Transfus Apher Sci.* 2014;51(3):68-82.
51. Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis.* 2000;5(5):415-8.
52. Valdivia A, Perez-Alvarez S, Aroca-Aguilar JD, Ikuta I, Jordan J. Superoxide dismutases: a physiopharmacological update. *J Physiol Biochem.* 2009;65(2):195-208.
53. Rieger MA, Schroeder T. Hämatopoetische Stammzellen. *BioSpektrum.* 2007;Band: 13, Heft: 3:254-6.
54. Chotinantakul K, Leraanansaksiri W. Hematopoietic stem cell development, niches, and signaling pathways. *Bone Marrow Res.* 2012;2012:270425.
55. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature.* 2000;404(6774):193-7.
56. Wolfensohn S, Lloyd M. Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare. Blackwell Publishing Ltd.; 11.2007.
57. Passegue E, Jamieson CH, Ailles LE, Weissman IL. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100 Suppl 1:11842-9.
58. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells.* 1978;4(1-2):7-25.
59. Spencer JA, Ferraro F, Roussakis E, Klein A, Wu J, Runnels JM, Zaher W, Mortensen LJ, Alt C, Turcotte R, Yusuf R, Cote D, Vinogradov SA, Scadden DT, Lin CP. Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals. *Nature.* 2014;508(7495):269-73.
60. Eliasson P, Jonsson JI. The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice place to be. *J Cell Physiol.* 2010;222(1):17-22.
61. Anthony BA, Link DC. Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells. *Trends Immunol.* 2014;35(1):32-7.
62. Pilo F, Angelucci E. A storm in the niche: Iron, oxidative stress and haemopoiesis. *Blood Rev.* 2018;32(1):29-35.
63. Huang X, Cho S, Spangrude GJ. Hematopoietic stem cells: generation and self-renewal. *Cell Death Differ.* 2007;14(11):1851-9.
64. Kucia M, Reca R, Miekus K, Wanzeck J, Wojakowski W, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. *Stem Cells.* 2005;23(7):879-94.
65. Bellantuono I. Haemopoietic stem cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(4):607-20.

66. Brown JM, Weissman IL. Progress and prospects in hematopoietic stem cell expansion and transplantation. *Exp Hematol*. 2004;32(8):693-5.
67. Szilvassy SJ, Humphries RK, Lansdorp PM, Eaves AC, Eaves CJ. Quantitative assay for totipotent reconstituting hematopoietic stem cells by a competitive repopulation strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(22):8736-40.
68. Snoeck HW. Mitochondrial regulation of hematopoietic stem cells. *Curr Opin Cell Biol*. 2017;49:91-8.
69. Simsek T, Kocabas F, Zheng J, Deberardinis RJ, Mahmoud AI, Olson EN, Schneider JW, Zhang CC, Sadek HA. The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. *Cell Stem Cell*. 2010;7(3):380-90.
70. Suda T, Takubo K, Semenza GL. Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. *Cell Stem Cell*. 2011;9(4):298-310.
71. Takubo K, Nagamatsu G, Kobayashi CI, Nakamura-Ishizu A, Kobayashi H, Ikeda E, Goda N, Rahimi Y, Johnson RS, Soga T, Hirao A, Suematsu M, Suda T. Regulation of glycolysis by Pdk functions as a metabolic checkpoint for cell cycle quiescence in hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2013;12(1):49-61.
72. Ito K, Suda T. Metabolic requirements for the maintenance of self-renewing stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(4):243-56.
73. Shao L, Li H, Pazhanisamy SK, Meng A, Wang Y, Zhou D. Reactive oxygen species and hematopoietic stem cell senescence. *Int J Hematol*. 2011;94(1):24-32.
74. Ghaffari S. Oxidative stress in the regulation of normal and neoplastic hematopoiesis. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10(11):1923-40.
75. Chan JY, Kwong M, Lo M, Emerson R, Kuypers FA. Reduced oxidative-stress response in red blood cells from p45NFE2-deficient mice. *Blood*. 2001;97(7):2151-8.
76. Lee JM, Chan K, Kan YW, Johnson JA. Targeted disruption of Nrf2 causes regenerative immune-mediated hemolytic anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(26):9751-6.
77. Park S, Han CR, Park JW, Zhao L, Zhu X, Willingham M, Bodine DM, Cheng SY. Defective erythropoiesis caused by mutations of the thyroid hormone receptor alpha gene. *PLoS Genet*. 2017;13(9):e1006991.
78. Tothova Z, Kollipara R, Huntly BJ, Lee BH, Castrillon DH, Cullen DE, McDowell EP, Lazo-Kallanian S, Williams IR, Sears C, Armstrong SA, Passegue E, DePinho RA, Gilliland DG. FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell*. 2007;128(2):325-39.
79. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*. 1956;11(3):298-300.
80. Porto ML, Rodrigues BP, Menezes TN, Ceschim SL, Casarini DE, Gava AL, Pereira

- TM, Vasquez EC, Campagnaro BP, Meyrelles SS. Reactive oxygen species contribute to dysfunction of bone marrow hematopoietic stem cells in aged C57BL/6 J mice. *J Biomed Sci.* 2015;22:97.
81. Liang Y, Van Zant G, Szilvassy SJ. Effects of aging on the homing and engraftment of murine hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood.* 2005;106(4):1479-87.
 82. Morrison SJ, Wandycz AM, Akashi K, Globerson A, Weissman IL. The aging of hematopoietic stem cells. *Nat Med.* 1996;2(9):1011-6.
 83. Rossi DJ, Bryder D, Seita J, Nussenzweig A, Hoeijmakers J, Weissman IL. Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature.* 2007;447(7145):725-9.
 84. Nijnik A, Woodbine L, Marchetti C, Dawson S, Lambe T, Liu C, Rodrigues NP, Crockford TL, Cabuy E, Vindigni A, Enver T, Bell JI, Slijepcevic P, Goodnow CC, Jeggo PA, Cornall RJ. DNA repair is limiting for haematopoietic stem cells during ageing. *Nature.* 2007;447(7145):686-90.
 85. Sudo K, Ema H, Morita Y, Nakauchi H. Age-associated characteristics of murine hematopoietic stem cells. *J Exp Med.* 2000;192(9):1273-80.
 86. Kim M, Moon HB, Spangrude GJ. Major age-related changes of mouse hematopoietic stem/progenitor cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;996:195-208.
 87. Kamminga LM, van Os R, Ausema A, Noach EJ, Weersing E, Dontje B, Vellenga E, de Haan G. Impaired hematopoietic stem cell functioning after serial transplantation and during normal aging. *Stem Cells.* 2005;23(1):82-92.
 88. Rossi DJ, Bryder D, Zahn JM, Ahlenius H, Sonu R, Wagers AJ, Weissman IL. Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(26):9194-9.
 89. Pang WW, Price EA, Sahoo D, Beerman I, Maloney WJ, Rossi DJ, Schrier SL, Weissman IL. Human bone marrow hematopoietic stem cells are increased in frequency and myeloid-biased with age. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(50):20012-7.
 90. Chambers SM, Shaw CA, Gatz C, Fisk CJ, Donehower LA, Goodell MA. Aging hematopoietic stem cells decline in function and exhibit epigenetic dysregulation. *PLoS Biol.* 2007;5(8):e201.
 91. Wahlestedt M, Bryder D. The slippery slope of hematopoietic stem cell aging. *Exp Hematol.* 2017;56:1-6.
 92. Beerman I, Bhattacharya D, Zandi S, Sigvardsson M, Weissman IL, Bryder D, Rossi DJ. Functionally distinct hematopoietic stem cells modulate hematopoietic lineage potential during aging by a mechanism of clonal expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(12):5465-70.
 93. Cho RH, Sieburg HB, Muller-Sieburg CE. A new mechanism for the aging of

- hematopoietic stem cells: aging changes the clonal composition of the stem cell compartment but not individual stem cells. *Blood*. 2008;111(12):5553-61.
94. Denninger MD, Leins H, Schirmbeck R, Florian MC, Geiger H. HSC Aging and Senescent Immune Remodeling. *Trends Immunol*. 2015;36(12):815-24.
 95. Maekawa S, Iemura H, Kato T. Enhanced erythropoiesis in mice exposed to low environmental temperature. *J Exp Biol*. 2013;216(Pt 5):901-8.
 96. Socolovsky M. Molecular insights into stress erythropoiesis. *Curr Opin Hematol*. 2007;14(3):215-24.
 97. Barminko J, Reinholt B, Baron MH. Development and differentiation of the erythroid lineage in mammals. *Dev Comp Immunol*. 2016;58:18-29.
 98. Ney PA. Normal and disordered reticulocyte maturation. *Curr Opin Hematol*. 2011;18(3):152-7.
 99. D'Andrea AD, Lodish HF, Wong GG. Expression cloning of the murine erythropoietin receptor. *Cell*. 1989;57(2):277-85.
 100. von Lindern M, Zauner W, Mellitzer G, Steinlein P, Fritsch G, Huber K, Lowenberg B, Beug H. The glucocorticoid receptor cooperates with the erythropoietin receptor and c-Kit to enhance and sustain proliferation of erythroid progenitors in vitro. *Blood*. 1999;94(2):550-9.
 101. Bauer A, Tronche F, Wessely O, Kellendonk C, Reichardt HM, Steinlein P, Schutz G, Beug H. The glucocorticoid receptor is required for stress erythropoiesis. *Genes Dev*. 1999;13(22):2996-3002.
 102. Broudy VC, Lin NL, Priestley GV, Nocka K, Wolf NS. Interaction of stem cell factor and its receptor c-kit mediates lodgment and acute expansion of hematopoietic cells in the murine spleen. *Blood*. 1996;88(1):75-81.
 103. Lenox LE, Perry JM, Paulson RF. BMP4 and Madh5 regulate the erythroid response to acute anemia. *Blood*. 2005;105(7):2741-8.
 104. Klein U, Dalla-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(1):22-33.
 105. Chapman J, Azevedo AM. Splenomegaly. StatPearls. Treasure Island (FL)2018.
 106. Zhu J, Emerson SG. Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. *Oncogene*. 2002;21(21):3295-313.
 107. Lausen J. Contributions of the histone arginine methyltransferase PRMT6 to the epigenetic function of RUNX1. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2013;23(3):265-74.
 108. Mitchell PJ, Tjian R. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science*. 1989;245(4916):371-8.

109. Ptashne M, Gann A. Transcriptional activation by recruitment. *Nature*. 1997;386(6625):569-77.
110. Xu L, Glass CK, Rosenfeld MG. Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr Opin Genet Dev*. 1999;9(2):140-7.
111. Gill G. Regulation of the initiation of eukaryotic transcription. *Essays Biochem*. 2001;37:33-43.
112. Narlikar GJ, Fan HY, Kingston RE. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell*. 2002;108(4):475-87.
113. Lecuyer E, Herblot S, Saint-Denis M, Martin R, Begley CG, Porcher C, Orkin SH, Hoang T. The SCL complex regulates c-kit expression in hematopoietic cells through functional interaction with Sp1. *Blood*. 2002;100(7):2430-40.
114. Kerenyi MA, Orkin SH. Networking erythropoiesis. *J Exp Med*. 2010;207(12):2537-41.
115. Fujiwara T, Alqadi YW, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Harigae H. Role of transcriptional corepressor ETO2 in erythroid cells. *Exp Hematol*. 2013;41(3):303-15 e1.
116. Wilkinson AC, Gottgens B. Transcriptional regulation of haematopoietic stem cells. *Adv Exp Med Biol*. 2013;786:187-212.
117. Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*. 2005;434(7035):843-50.
118. Reya T, Duncan AW, Ailles L, Domen J, Scherer DC, Willert K, Hintz L, Nusse R, Weissman IL. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*. 2003;423(6938):409-14.
119. Kirstetter P, Anderson K, Porse BT, Jacobsen SE, Nerlov C. Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block. *Nat Immunol*. 2006;7(10):1048-56.
120. Staal FJ, Chhatta A, Mikkers H. Caught in a Wnt storm: Complexities of Wnt signaling in hematopoiesis. *Exp Hematol*. 2016;44(6):451-7.
121. Collu GM, Hidalgo-Sastre A, Brennan K. Wnt-Notch signalling crosstalk in development and disease. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(18):3553-67.
122. Rane SG, Reddy EP. JAKs, STATs and Src kinases in hematopoiesis. *Oncogene*. 2002;21(21):3334-58.
123. Wang Z, Bunting KD. STAT5 in hematopoietic stem cell biology and transplantation. *JAKSTAT*. 2013;2(4):e27159.
124. Singh N, Phillips RA, Iscove NN, Egan SE. Expression of notch receptors, notch ligands, and fringe genes in hematopoiesis. *Exp Hematol*. 2000;28(5):527-34.

125. Kushwah R, Guezguez B, Lee JB, Hopkins CI, Bhatia M. Pleiotropic roles of Notch signaling in normal, malignant, and developmental hematopoiesis in the human. *EMBO Rep.* 2014;15(11):1128-38.
126. Ellisen LW, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD, Sklar J. TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell.* 1991;66(4):649-61.
127. Weng AP, Millholland JM, Yashiro-Ohtani Y, Arcangeli ML, Lau A, Wai C, Del Bianco C, Rodriguez CG, Sai H, Tobias J, Li Y, Wolfe MS, Shachaf C, Felsher D, Blacklow SC, Pear WS, Aster JC. c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes Dev.* 2006;20(15):2096-109.
128. Sharma VM, Calvo JA, Draheim KM, Cunningham LA, Hermance N, Beverly L, Krishnamoorthy V, Bhasin M, Capobianco AJ, Kelliher MA. Notch1 contributes to mouse T-cell leukemia by directly inducing the expression of c-myc. *Mol Cell Biol.* 2006;26(21):8022-31.
129. Palomero T, Lim WK, Odom DT, Sulis ML, Real PJ, Margolin A, Barnes KC, O'Neil J, Neuberg D, Weng AP, Aster JC, Sigaux F, Soulier J, Look AT, Young RA, Califano A, Ferrando AA. NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(48):18261-6.
130. Thompson BJ, Buonamici S, Sulis ML, Palomero T, Vilimas T, Basso G, Ferrando A, Aifantis I. The SCFFBW7 ubiquitin ligase complex as a tumor suppressor in T cell leukemia. *J Exp Med.* 2007;204(8):1825-35.
131. Zweidler-McKay PA, He Y, Xu L, Rodriguez CG, Karnell FG, Carpenter AC, Aster JC, Allman D, Pear WS. Notch signaling is a potent inducer of growth arrest and apoptosis in a wide range of B-cell malignancies. *Blood.* 2005;106(12):3898-906.
132. Klinakis A, Lobry C, Abdel-Wahab O, Oh P, Haeno H, Buonamici S, van De Walle I, Cathelin S, Trimarchi T, Araldi E, Liu C, Ibrahim S, Beran M, Zavadil J, Efstratiadis A, Taghon T, Michor F, Levine RL, Aifantis I. A novel tumour-suppressor function for the Notch pathway in myeloid leukaemia. *Nature.* 2011;473(7346):230-3.
133. Alghisi E, Distel M, Malagola M, Anelli V, Santoriello C, Herwig L, Krudewig A, Henkel CV, Russo D, Mione MC. Targeting oncogene expression to endothelial cells induces proliferation of the myelo-erythroid lineage by repressing the Notch pathway. *Leukemia.* 2013;27(11):2229-41.
134. Eruslanov E, Kusmartsev S. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Methods Mol Biol.* 2010;594:57-72.
135. Nishinaka Y, Aramaki Y, Yoshida H, Masuya H, Sugawara T, Ichimori Y. A new sensitive chemiluminescence probe, L-012, for measuring the production of superoxide anion by cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;193(2):554-9.
136. Watanabe N, Forman HJ. Autoxidation of extracellular hydroquinones is a causative event for the cytotoxicity of menadione and DMNQ in A549-S cells. *Arch Biochem*

- Biophys.* 2003;411(1):145-57.
137. Segawa K, Nagata S. An Apoptotic 'Eat Me' Signal: Phosphatidylserine Exposure. *Trends Cell Biol.* 2015;25(11):639-50.
 138. Gerdes J, Dallenbach F, Lennert K, Lemke H, Stein H. Growth fractions in malignant non-Hodgkin's lymphomas (NHL) as determined in situ with the monoclonal antibody Ki-67. *Hematol Oncol.* 1984;2(4):365-71.
 139. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol.* 1984;133(4):1710-5.
 140. Kuo LJ, Yang LX. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo.* 2008;22(3):305-9.
 141. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
 142. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014;30(15):2114-20.
 143. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics.* 2013;29(1):15-21.
 144. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15(12):550.
 145. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics.* 2010;26(1):139-40.
 146. Libregts SF, Gutierrez L, de Bruin AM, Wensveen FM, Papadopoulos P, van Ijcken W, Ozgur Z, Philipsen S, Nolte MA. Chronic IFN-gamma production in mice induces anemia by reducing erythrocyte life span and inhibiting erythropoiesis through an IRF-1/PU.1 axis. *Blood.* 2011;118(9):2578-88.
 147. Van Putten L. The life span of red cells in the rat and the mouse as determined by labeling with DFP32 in vivo. *Blood.* 1958;13(8):789-94.
 148. Manning KL, McDonald TP. C3H mice have larger spleens, lower platelet counts, and shorter platelet lifespans than C57BL mice: an animal model for the study of hypersplenism. *Exp Hematol.* 1997;25(10):1019-24.
 149. Wang Y, Schulte BA, LaRue AC, Ogawa M, Zhou D. Total body irradiation selectively induces murine hematopoietic stem cell senescence. *Blood.* 2006;107(1):358-66.
 150. Kühl S, Kühl M. Stammzellbiologie: UTB GmbH; 2012 12.09.2012.
 151. Cooke KR, Kobzik L, Martin TR, Brewer J, Delmonte J, Jr., Crawford JM, Ferrara JL.

- An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin. *Blood*. 1996;88(8):3230-9.
152. Mardiney M, 3rd, Malech HL. Enhanced engraftment of hematopoietic progenitor cells in mice treated with granulocyte colony-stimulating factor before low-dose irradiation: implications for gene therapy. *Blood*. 1996;87(10):4049-56.
 153. Yusuf RZ, Scadden DT. Homing of hematopoietic cells to the bone marrow. *J Vis Exp*. 2009(25).
 154. Shanley DP, Aw D, Manley NR, Palmer DB. An evolutionary perspective on the mechanisms of immunosenescence. *Trends Immunol*. 2009;30(7):374-81.
 155. Dominguez-Gerpe L, Rey-Mendez M. Evolution of the thymus size in response to physiological and random events throughout life. *Microsc Res Tech*. 2003;62(6):464-76.
 156. Gui J, Mustachio LM, Su DM, Craig RW. Thymus Size and Age-related Thymic Involution: Early Programming, Sexual Dimorphism, Progenitors and Stroma. *Aging Dis*. 2012;3(3):280-90.
 157. Jang YY, Sharkis SJ. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood*. 2007;110(8):3056-63.
 158. Tracy L, Shaw T. A biochemical basis for the myeloid:lymphoid cell ratio, increases in which are associated with poor prognoses in numerous pathological conditions. *Pathology*. 2015;47(Supplement 1):S92-S3.
 159. Urao N, Ushio-Fukai M. Redox regulation of stem/progenitor cells and bone marrow niche. *Free Radic Biol Med*. 2013;54:26-39.
 160. Wang LL, Jin L, Xu HM, Hao YW. Correlation between reactive oxygen species of cryopreserved peripheral blood mononuclear cells and expression of homing adhesion molecules on peripheral blood hematopoietic stem/progenitor cells. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2012;20(6):1452-6.
 161. Ebert J. Die Rolle der Paraoxonase-2 in endothelialen Redox-Signalwegen und Entzündungsprozessen in der Blutgerinnung: Johannes Gutenberg Universität Mainz; 2016.
 162. Byron JW, Lajtha LG. Estimation of haemopoietic stem cells with erythropoietin: a consideration of dose-response curves. *Br J Haematol*. 1968;15(1):47-55.
 163. Testa U. Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis. *Leukemia*. 2004;18(7):1176-99.
 164. Wang J, Geiger H, Rudolph KL. Immunoaging induced by hematopoietic stem cell aging. *Curr Opin Immunol*. 2011;23(4):532-6.

165. Tuljapurkar SR, McGuire TR, Brusnahan SK, Jackson JD, Garvin KL, Kessinger MA, Lane JT, BJ OK, Sharp JG. Changes in human bone marrow fat content associated with changes in hematopoietic stem cell numbers and cytokine levels with aging. *J Anat.* 2011;219(5):574-81.
166. Ergen AV, Boles NC, Goodell MA. Rantes/Ccl5 influences hematopoietic stem cell subtypes and causes myeloid skewing. *Blood.* 2012;119(11):2500-9.
167. Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol.* 2002;192(1):1-15.
168. Feng Z, Lin M, Wu R. The Regulation of Aging and Longevity: A New and Complex Role of p53. *Genes Cancer.* 2011;2(4):443-52.
169. Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. Crosstalk between Oxidative Stress and SIRT1: Impact on the Aging Process. *Int J Mol Sci.* 2013;14(2):3834-59.
170. Nakamura-Ishizu A, Suda T. Aging of the hematopoietic stem cells niche. *Int J Hematol.* 2014;100(4):317-25.
171. Muslimovic A, Ismail IH, Gao Y, Hammarsten O. An optimized method for measurement of gamma-H2AX in blood mononuclear and cultured cells. *Nat Protoc.* 2008;3(7):1187-93.
172. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984;123(1):291-8.
173. Olive PL, Durand RE, Jackson SM, Le Riche JC, Luo C, Ma R, McLaren DB, Aquino-Parsons C, Thomson TA, Trotter T. The comet assay in clinical practice. *Acta Oncol.* 1999;38(7):839-44.
174. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol.* 2004;26(3):249-61.
175. Ahnstrom G, Erixon K. Measurement of strand breaks by alkaline denaturation and hydroxyapatite chromatography. *DNA Repair.* Vol. 1: Marcel Dekker, Ink., NY; 1980. p. 403-19.
176. Lu H, Shamanna RA, Keijzers G, Anand R, Rasmussen LJ, Cejka P, Croteau DL, Bohr VA. RECQL4 Promotes DNA End Resection in Repair of DNA Double-Strand Breaks. *Cell Rep.* 2016;16(1):161-73.
177. Lu L, Jin W, Wang LL. Aging in Rothmund-Thomson syndrome and related RECQL4 genetic disorders. *Ageing Res Rev.* 2017;33:30-5.
178. Yalcin S, Marinkovic D, Mungamuri SK, Zhang X, Tong W, Sellers R, Ghaffari S. ROS-mediated amplification of AKT/mTOR signalling pathway leads to myeloproliferative syndrome in Foxo3(-/-) mice. *EMBO J.* 2010;29(24):4118-31.
179. Mantel C, Messina-Graham S, Moh A, Cooper S, Hangoc G, Fu XY, Broxmeyer HE.

- Mouse hematopoietic cell-targeted STAT3 deletion: stem/progenitor cell defects, mitochondrial dysfunction, ROS overproduction, and a rapid aging-like phenotype. *Blood*. 2012;120(13):2589-99.
180. Sattler M, Verma S, Shrikhande G, Byrne CH, Pride YB, Winkler T, Greenfield EA, Salgia R, Griffin JD. The BCR/ABL tyrosine kinase induces production of reactive oxygen species in hematopoietic cells. *J Biol Chem*. 2000;275(32):24273-8.
 181. Xia P, Wang S, Du Y, Huang G, Satoh T, Akira S, Fan Z. Insulin-InsR signaling drives multipotent progenitor differentiation toward lymphoid lineages. *J Exp Med*. 2015;212(13):2305-21.
 182. Li J, Cai D, Yao X, Zhang Y, Chen L, Jing P, Wang L, Wang Y. Protective Effect of Ginsenoside Rg1 on Hematopoietic Stem/Progenitor Cells through Attenuating Oxidative Stress and the Wnt/beta-Catenin Signaling Pathway in a Mouse Model of d-Galactose-induced Aging. *Int J Mol Sci*. 2016;17(6).
 183. Sayin VI, Ibrahim MX, Larsson E, Nilsson JA, Lindahl P, Bergo MO. Antioxidants accelerate lung cancer progression in mice. *Sci Transl Med*. 2014;6(221):221ra15.
 184. Liu D, Liu A. Administration of vitamin E prevents thymocyte apoptosis in murine sarcoma S180 tumor bearing mice. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2012;58 Suppl:OL1671-9.
 185. Singh SK, Wu W, Zhang L, Klammer H, Wang M, Iliakis G. Widespread dependence of backup NHEJ on growth state: ramifications for the use of DNA-PK inhibitors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2011;79(2):540-8.
 186. Tadokoro T, Ramamoorthy M, Popuri V, May A, Tian J, Sykora P, Rybanska I, Wilson DM, 3rd, Croteau DL, Bohr VA. Human RECQL5 participates in the removal of endogenous DNA damage. *Mol Biol Cell*. 2012;23(21):4273-85.
 187. Shamanna RA, Singh DK, Lu H, Mirey G, Keijzers G, Salles B, Croteau DL, Bohr VA. RECQ helicase RECQL4 participates in non-homologous end joining and interacts with the Ku complex. *Carcinogenesis*. 2014;35(11):2415-24.
 188. Smeets MF, DeLuca E, Wall M, Quach JM, Chalk AM, Deans AJ, Heierhorst J, Purton LE, Izon DJ, Walkley CR. The Rothmund-Thomson syndrome helicase RECQL4 is essential for hematopoiesis. *J Clin Invest*. 2014;124(8):3551-65.
 189. Lee KY, Chan KY, Tsang KS, Chen YC, Kung HF, Ng PC, Li CK, Leung KT, Li K. Ubiquitous expression of MAKORIN-2 in normal and malignant hematopoietic cells and its growth promoting activity. *PLoS One*. 2014;9(3):e92706.
 190. Lapidot T, Dar A, Kollet O. How do stem cells find their way home? *Blood*. 2005;106(6):1901-10.
 191. Ludin A, Gur-Cohen S, Golan K, Kaufmann KB, Itkin T, Medaglia C, Lu XJ, Ledergor G, Kollet O, Lapidot T. Reactive oxygen species regulate hematopoietic stem cell self-renewal, migration and development, as well as their bone marrow microenvironment. *Antioxid Redox Signal*. 2014;21(11):1605-19.

192. Tsai JJ, Dudakov JA, Takahashi K, Shieh JH, Velardi E, Holland AM, Singer NV, West ML, Smith OM, Young LF, Shono Y, Ghosh A, Hanash AM, Tran HT, Moore MA, van den Brink MR. Nrf2 regulates haematopoietic stem cell function. *Nat Cell Biol.* 2013;15(3):309-16.
193. Sawada S, Gowrishankar K, Kitamura R, Suzuki M, Suzuki G, Tahara S, Koito A. Disturbed CD4⁺ T cell homeostasis and in vitro HIV-1 susceptibility in transgenic mice expressing T cell line-tropic HIV-1 receptors. *J Exp Med.* 1998;187(9):1439-49.
194. Peled A, Petit I, Kollet O, Magid M, Ponomaryov T, Byk T, Nagler A, Ben-Hur H, Many A, Shultz L, Lider O, Alon R, Zipori D, Lapidot T. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science.* 1999;283(5403):845-8.
195. Jeong M, Piao ZH, Kim MS, Lee SH, Yun S, Sun HN, Yoon SR, Chung JW, Kim TD, Jeon JH, Lee J, Kim HN, Choi JY, Choi I. Thioredoxin-interacting protein regulates hematopoietic stem cell quiescence and mobilization under stress conditions. *J Immunol.* 2009;183(4):2495-505.
196. Uckelmann H, Blaszkiewicz S, Nicolae C, Haas S, Schnell A, Wurzer S, Wagener R, Aszodi A, Essers MA. Extracellular matrix protein Matrilin-4 regulates stress-induced HSC proliferation via CXCR4. *J Exp Med.* 2016;213(10):1961-71.
197. Chen Y, Ma X, Zhang M, Wang X, Wang C, Wang H, Guo P, Yuan W, Rudolph KL, Zhan Q, Ju Z. Gadd45a regulates hematopoietic stem cell stress responses in mice. *Blood.* 2014;123(6):851-62.
198. Warren LA, Rossi DJ. Stem cells and aging in the hematopoietic system. *Mech Ageing Dev.* 2009;130(1-2):46-53.
199. Bauer C, Kurtz A, Eckardt K, Tannahill L. Regulation of erythropoietin synthesis. *Nephron.* 1989;51(Suppl 1):3-10.
200. Wenger RH, Hoogewijs D. Regulated oxygen sensing by protein hydroxylation in renal erythropoietin-producing cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010;298(6):F1287-96.
201. Dumitriu B, Bhattaram P, Dy P, Huang Y, Quayum N, Jensen J, Lefebvre V. Sox6 is necessary for efficient erythropoiesis in adult mice under physiological and anemia-induced stress conditions. *PLoS One.* 2010;5(8):e12088.
202. Dumitriu B, Patrick MR, Petschek JP, Cherukuri S, Klingmuller U, Fox PL, Lefebvre V. Sox6 cell-autonomously stimulates erythroid cell survival, proliferation, and terminal maturation and is thereby an important enhancer of definitive erythropoiesis during mouse development. *Blood.* 2006;108(4):1198-207.
203. Cantu C, Ierardi R, Alborelli I, Fugazza C, Cassinelli L, Piconese S, Bose F, Ottolenghi S, Ferrari G, Ronchi A. Sox6 enhances erythroid differentiation in human erythroid progenitors. *Blood.* 2011;117(13):3669-79.
204. Marinkovic D, Zhang X, Yalcin S, Luciano JP, Brugnara C, Huber T, Ghaffari S.

- Foxo3 is required for the regulation of oxidative stress in erythropoiesis. *J Clin Invest.* 2007;117(8):2133-44.
205. Lau CI, Outram SV, Saldana JI, Furmanski AL, Dessens JT, Crompton T. Regulation of murine normal and stress-induced erythropoiesis by Desert Hedgehog. *Blood.* 2012;119(20):4741-51.
 206. Kosan C, Rashkovan M, Ross J, Schaffer AM, Saba I, Lemsaddek W, Trudel M, Moroy T. The transcription factor Miz-1 is required for embryonic and stress-induced erythropoiesis but dispensable for adult erythropoiesis. *Am J Blood Res.* 2014;4(1):7-19.
 207. Savoia A, Kunishima S, De Rocco D, Zieger B, Rand ML, Pujol-Moix N, Caliskan U, Tokgoz H, Pecci A, Noris P, Srivastava A, Ward C, Morel-Kopp MC, Alessi MC, Bellucci S, Beurrier P, de Maistre E, Favier R, Hezard N, Hurtaud-Roux MF, Latger-Cannard V, Lavenu-Bombled C, Proulle V, Meunier S, Negrier C, Nurden A, Randrianaivo H, Fabris F, Platokouki H, Rosenberg N, HadjKacem B, Heller PG, Karimi M, Balduini CL, Pastore A, Lanza F. Spectrum of the mutations in Bernard-Soulier syndrome. *Hum Mutat.* 2014;35(9):1033-45.
 208. Smith KG, Hewitson TD, Nossal GJ, Tarlinton DM. The phenotype and fate of the antibody-forming cells of the splenic foci. *Eur J Immunol.* 1996;26(2):444-8.
 209. Hsu MC, Toellner KM, Vinuesa CG, MacLennan IC. B cell clones that sustain long-term plasmablast growth in T-independent extrafollicular antibody responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(15):5905-10.
 210. Dawar S, Shahrin NH, Sladojevic N, D'Andrea RJ, Dorstyn L, Hiwase DK, Kumar S. Impaired haematopoietic stem cell differentiation and enhanced skewing towards myeloid progenitors in aged caspase-2-deficient mice. *Cell Death Dis.* 2016;7(12):e2509.
 211. Ito K, Takubo K, Arai F, Satoh H, Matsuoka S, Ohmura M, Naka K, Azuma M, Miyamoto K, Hosokawa K, Ikeda Y, Mak TW, Suda T, Hirao A. Regulation of reactive oxygen species by Atm is essential for proper response to DNA double-strand breaks in lymphocytes. *J Immunol.* 2007;178(1):103-10.
 212. Yalcin S, Zhang X, Luciano JP, Mungamuri SK, Marinkovic D, Vercherat C, Sarkar A, Grisotto M, Taneja R, Ghaffari S. Foxo3 is essential for the regulation of ataxia telangiectasia mutated and oxidative stress-mediated homeostasis of hematopoietic stem cells. *J Biol Chem.* 2008;283(37):25692-705.
 213. Miyamoto K, Araki KY, Naka K, Arai F, Takubo K, Yamazaki S, Matsuoka S, Miyamoto T, Ito K, Ohmura M, Chen C, Hosokawa K, Nakauchi H, Nakayama K, Nakayama KI, Harada M, Motoyama N, Suda T, Hirao A. Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Cell Stem Cell.* 2007;1(1):101-12.
 214. Liu J, Cao L, Chen J, Song S, Lee IH, Quijano C, Liu H, Keyvanfar K, Chen H, Cao LY, Ahn BH, Kumar NG, Rovira, II, Xu XL, van Lohuizen M, Motoyama N, Deng CX, Finkel T. Bmi1 regulates mitochondrial function and the DNA damage response pathway. *Nature.* 2009;459(7245):387-92.

215. Dykstra B, Olthof S, Schreuder J, Ritsema M, de Haan G. Clonal analysis reveals multiple functional defects of aged murine hematopoietic stem cells. *J Exp Med*. 2011;208(13):2691-703.

9 Publikationen

Im Rahmen dieser Arbeit entstanden folgende Veröffentlichungen:

Originalarbeiten:

Ebert J, Wilgenbus P, Teiber JF, Jurk K, Schwierczek K, Döhrmann M, Xia N, Li H, Spiecker L, Ruf W, Horke S. Paraoxonase-2 regulates coagulation activation through endothelial tissue factor. *Blood* 2018; DOI 10.1182/blood-2017-09-807040

Vorträge:

Spiecker L, Kindler T, Horke S, Witte I. Paraoxonase-2 and its effects on hematopoietic stem cell proliferation and differentiation. 5th Annual Conference of the German Stem Cell Network (GSCN), Jena, 11. - 13. September 2017.

Abstracts:

Spiecker L, Kindler T, Horke S, Witte I. Paraoxonase-2 and its effects on hematopoietic stem cell proliferation and differentiation. 5th Annual Conference of the German Stem Cell Network (GSCN), Jena, 11. - 13. September 2017.

Spiecker L, Kindler T, Horke S, Witte I. Paraoxonase-2 alters hematopoietic stem cell differentiation through redox signaling. 46th Annual Scientific Meeting of the ISEH – International Society for Experimental Hematology, Frankfurt (Main), 24. - 27. August 2017.

Spiecker L, Schüler A, Kindler T, Horke S, Witte I. Modulation of hematopoiesis by the anti-oxidative enzyme Paraoxonase-2. XXI. Wilsede meeting on „Modern Trends in Human Leukemia and Cancer“, Wilsede, 18. - 21. Juni 2016.

10 **Danksagung**

xxx

11 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Lisa Spiecker
Geburtsdatum: 06.03.1989
Geburtsort: Kirchheimbolanden
Staatsangehörigkeit: deutsch

Promotion

01/2015 - 04/2018 Promotion am Institut für Pharmakologie, Arbeitsgruppe Zell- und Redox-Signalwege / Dr. Ines Witte – Prof. Dr. H. Kleinert, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz (Fachbereich Biologie)

Hochschulstudium

10/2012 - 07/2014 Master Biologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz (Note 1,2)
Fachgebiet: molekulare Zoologie
Thema: “Zur Struktur und Funktion der Rhogozyten der Süßwasserschnecke *Lymnaea stagnalis*“

10/2010 - 09/2012 Bachelor Biologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz (Note 2,2)
Fachgebiet: molekulare Tierphysiologie
Thema: “Die Keratine des Europäischen Aals *Anguilla anguilla*“

10/2008 - 09/2010 Bachelor Biowissenschaften, TU Kaiserslautern

Schulbildung

08/1999 - 03/2008 Allgemeine Hochschulreife (Note: 2,6), Integrierte Gesamtschule Rockenhausen

Stipendium

06/2016 “Young Scientist“-Stipendium der Mildred Scheel Stiftung zur Teilnahme am XXI. Wilsede meeting 2016 - „Modern Trends in Human Leukemia and Cancer“

12 Anhang

Tabelle 22: Mittels DESeq2 identifizierte differentiell exprimierte Gene. Dargestellt wird die Gen-Beschreibung, das Gen-Symbol, die x-fache Änderung sowie der p-Wert aller *targets*.

Gen-Beschreibung (BioMART)	Symbol	x-fache Änderung (Log2FoldChange)	p-Wert
<i>CD19 antigen</i>	Cd19	25,03136102	1,5E-18
<i>RAB36, member RAS oncogene family</i>	Rab36	24,87178347	2,4E-18
<i>predicted gene 5483</i>	Gm5483	24,19553538	3,7E-16
<i>regulator of G-protein signaling 9</i>	Rgs9	23,87116638	1,9E-15
<i>B lymphoid kinase</i>	Blk	23,77137659	2,5E-15
<i>predicted gene 45191</i>	Gm45191	23,73265408	2,8E-15
<i>interleukin 22 receptor, alpha 2</i>	Il22ra2	23,61005882	3,8E-15
<i>stefin A2 like 1</i>	Stfa2l1	23,57685554	4,2E-15
<i>family with sequence similarity 46, member C</i>	Fam46c	23,53629323	4,7E-15
<i>syndecan binding protein (syntenin) 2</i>	Sdcbp2	23,51229515	5,0E-15
<i>fibronectin type III domain containing 11</i>	Fndc11	23,46111683	5,7E-15
<i>ATPase, Cu⁺⁺ transporting, beta polypeptide</i>	Atp7b	23,41451337	6,4E-15
<i>predicted gene, 37521</i>	Gm37521	23,40701411	6,6E-15
<i>predicted gene 42471</i>	Gm42471	23,33944882	7,8E-15
<i>predicted gene, 38140</i>	Gm38140	23,28202833	9,1E-15
<i>purinergic receptor P2Y, G-protein coupled 13</i>	P2ry13	23,2058153	7,9E-17
<i>CD276 antigen</i>	Cd276	23,1538644	1,3E-14
<i>RIKEN cDNA 3110067C02 gene</i>	3110067C02Rik	23,01359686	1,8E-14
<i>WD repeat domain 86</i>	Wdr86	22,99189074	1,9E-14
<i>V-set and transmembrane domain containing 5</i>	Vstm5	22,90694565	2,4E-14
<i>transmembrane protein 52B</i>	Tmem52b	22,81971795	3,0E-14
<i>sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6A</i>	Sema6a	22,79727564	3,2E-14
<i>inhibitor of DNA binding 3</i>	Id3	22,78697229	3,3E-14
<i>HORMA domain containing 2</i>	Hormad2	22,71268147	4,0E-14
<i>predicted gene 16157</i>	Gm16157	22,69384023	4,2E-14

<i>coiled-coil domain containing 136</i>	Ccdc136	22,68360778	4,3E-14
<i>RIKEN cDNA 1700028J19 gene</i>	1700028J19Rik	22,66213925	4,6E-14
<i>coagulation factor II</i>	F2	22,5972233	5,4E-14
<i>predicted gene, 37053</i>	Gm37053	22,55822757	5,9E-14
<i>ras homolog family member V</i>	Rhov	22,44652487	7,9E-14
<i>0</i>	AC124577.2	22,42367992	8,4E-14
<i>ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 17</i>	Abca17	22,41249301	8,6E-14
<i>F-box protein 2</i>	Fbxo2	22,31871075	1,1E-13
<i>deleted in lymphocytic leukemia, 7</i>	Dleu7	22,28483726	1,2E-13
<i>predicted gene, 38843</i>	Gm38843	22,23367175	1,4E-13
<i>predicted gene 45217</i>	Gm45217	22,1894637	1,5E-13
<i>lysyl oxidase-like 1</i>	Loxl1	22,16004544	1,6E-13
<i>EF hand domain containing 1</i>	Efhd1	22,04221658	2,2E-13
<i>RIKEN cDNA 4833413G10 gene</i>	4833413G10Rik	22,03616286	2,2E-13
<i>WAP four-disulfide core domain 18</i>	Wfdc18	21,96640456	2,7E-13
<i>intelectin 1 (galactofuranose binding)</i>	Itln1	21,94898432	2,8E-13
<i>predicted gene, 44086</i>	Gm44086	21,92595717	2,9E-13
<i>predicted gene 43707</i>	Gm43707	21,89570767	3,2E-13
<i>CD4 antigen</i>	Cd4	21,89227889	3,2E-13
<i>predicted gene 13571</i>	Gm13571	21,88257953	3,3E-13
<i>Rho GTPase activating protein 22</i>	Arhgap22	21,87309775	3,4E-13
<i>expressed sequence AA414768</i>	AA414768	21,85088785	3,5E-13
<i>RIKEN cDNA 2310074N15 gene</i>	2310074N15Rik	21,81099589	3,9E-13
<i>smal lysine rich protein 1, pseudogene</i>	Smkr-ps	21,78915179	4,1E-13
<i>predicted gene, 37415</i>	Gm37415	21,7495856	4,6E-13
<i>T cell-interacting, activating receptor on myeloid cells 1</i>	Tarm1	21,72766523	4,8E-13
<i>nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 10</i>	Nudt10	21,64860014	5,9E-13
<i>predicted gene 15751</i>	Gm15751	21,64030328	6,0E-13
<i>interferon activated gene 208</i>	Ifi208	21,63702985	6,0E-13
<i>predicted gene 43625</i>	Gm43625	21,61215624	6,4E-13
<i>placental growth factor</i>	Pgf	21,60346803	6,5E-13

Anhang

<i>predicted gene, 33474</i>	Gm33474	21,56416909	7,2E-13
<i>RIKEN cDNA 4930525G20 gene</i>	4930525G20Rik	21,50309428	8,4E-13
<i>jun proto-oncogene, opposite strand</i>	Junos	21,48062948	8,8E-13
<i>myocardial zonula adherens protein</i>	Myzap	21,44691149	9,6E-13
<i>RIKEN cDNA C230066G23 gene</i>	C230066G23Rik	21,37112096	1,2E-12
<i>cDNA sequence BC018473</i>	BC018473	16,35814209	2,2E-77
<i>transmembrane protein 17</i>	Tmem17	11,2375805	7,0E-16
<i>predicted gene 28370</i>	Gm28370	10,66560427	2,6E-05
<i>predicted gene, 35082</i>	Gm35082	9,866536481	7,7E-09
<i>ferritin light polypeptide 2, pseudogene</i>	Ftl2-ps	9,651694344	6,6E-06
<i>predicted gene, 37010</i>	Gm37010	9,565801048	3,3E-04
<i>serine (or cysteine) peptidase inhibitor; clade B (ovalbumin), member 10</i>	Serpinb10	9,545877917	5,2E-08
<i>predicted gene, 44152</i>	Gm44152	9,488568938	7,6E-07
<i>predicted gene, 26865</i>	Gm26865	9,326379411	6,0E-05
<i>ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2</i>	Abcc2	9,311600553	8,3E-05
<i>predicted gene 8420</i>	Gm8420	9,289125053	1,5E-117
<i>protease, serine 8 (prostasin)</i>	Prss8	9,144459796	2,8E-04
<i>tripartite motif-containing 34B</i>	Trim34b	8,936305635	4,6E-12
<i>coiled-coil domain containing 155</i>	Ccdc155	8,885542154	7,0E-04
<i>cyclin B1 interacting protein 1</i>	Ccnb1ip1	8,840744537	7,2E-04
<i>transmembrane protein 44</i>	Tmem44	8,668359814	8,6E-05
<i>predicted gene, 38075</i>	Gm38075	8,646426436	1,2E-06
<i>predicted gene 28707</i>	Gm28707	8,609785053	1,7E-06
<i>predicted gene 42728</i>	Gm42728	8,548608841	4,9E-04
<i>RIKEN cDNA 4933415A04 gene</i>	4933415A04Rik	8,547251496	4,0E-04
<i>galactose-3-O-sulfotransferase 3</i>	Gal3st3	8,522005831	3,7E-04
<i>ATPase, H⁺ transporting, lysosomal V0 subunit E2</i>	Atp6v0e2	8,404046575	1,6E-11
<i>ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 1</i>	St6galnac1	8,288697517	6,0E-04
<i>predicted gene 11963</i>	Gm11963	8,281128385	6,3E-04
<i>rad and gem related GTP binding protein 2</i>	Rem2	8,227807996	2,3E-04

Anhang

<i>predicted gene 5292</i>	Gm5292	8,195713445	1,0E-49
<i>POU domain, class 6, transcription factor 1</i>	Pou6f1	8,048203481	7,3E-04
<i>predicted gene, 26862</i>	Gm26862	8,030368114	6,8E-12
<i>thioesterase superfamily member 6</i>	Them6	7,985144259	6,6E-04
<i>formin 1</i>	Fmn1	7,961526733	6,0E-04
<i>retinol dehydrogenase 5</i>	Rdh5	7,861451424	1,6E-05
<i>predicted gene, 18860</i>	Gm18860	7,751227619	2,8E-21
<i>RecQ protein-like 4</i>	Recql4	7,745501089	1,5E-05
<i>F-box and leucine-rich repeat protein 12, opposite strand</i>	Fbxl12os	7,69828909	1,3E-05
<i>ribosomal protein S13, pseudogene 1</i>	Rps13-ps1	7,553268386	3,4E-260
<i>predicted gene, 37566</i>	Gm37566	7,50673449	3,6E-04
<i>predicted gene, 44075</i>	Gm44075	7,424854053	6,7E-05
<i>RIKEN cDNA 9130208D14 gene</i>	9130208D14Rik	7,268901351	4,1E-10
<i>predicted gene 11772</i>	Gm11772	6,977838885	1,6E-04
<i>predicted gene, 26814</i>	Gm26814	6,685212796	7,5E-05
<i>interferon activated gene 204</i>	Ifi204	6,655861821	6,1E-07
<i>predicted gene 7478</i>	Gm7478	6,629867165	2,2E-08
<i>predicted gene 7639</i>	Gm7639	6,455918716	2,3E-07
<i>UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A8</i>	Ugt1a8	6,374420067	3,7E-06
<i>predicted gene 12312</i>	Gm12312	6,29923066	1,1E-12
<i>predicted gene 7224</i>	Gm7224	6,291870238	2,3E-04
<i>predicted gene 14094</i>	Gm14094	6,096026012	6,7E-12
<i>predicted pseudogene 10704</i>	Gm10704	6,024685765	4,0E-24
<i>predicted gene 43554</i>	Gm43554	5,819730627	1,1E-04
<i>predicted gene 28438</i>	Gm28438	5,677603011	7,2E-59
<i>predicted gene 8979</i>	Gm8979	5,56798436	2,2E-04
<i>predicted gene 11645</i>	Gm11645	5,318084777	1,1E-10
<i>zinc finger protein 960</i>	Zfp960	4,933913508	2,0E-06
<i>mitochondrial ribosomal protein L48 pseudogene</i>	Mrpl48-ps	4,451385497	1,1E-14
<i>predicted gene 6123</i>	Gm6123	4,007527082	2,9E-11
<i>cathepsin E</i>	Ctse	3,875919577	5,8E-16

Anhang

<i>myotubularin related protein 9</i>	Mtmr9	3,826119461	1,8E-06
<i>RNA binding motif protein 45</i>	Rbm45	3,684802771	1,0E-08
<i>mitochondrially encoded tRNA phenylalanine</i>	mt-Tf	3,216616334	3,6E-04
<i>CDK5 regulatory subunit associated protein 1</i>	Cdk5rap1	3,201401119	1,5E-07
<i>eukaryotic translation initiation factor 5A-like 3, pseudogene</i>	Eif5al3-ps	2,906270012	9,6E-18
<i>solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y⁺ system), member 8</i>	Slc7a8	2,884125649	2,2E-04
<i>cysteine and glycine-rich protein 1</i>	Csrp1	2,751999652	3,7E-04
<i>chemokine (C-X-C motif) receptor 4</i>	Cxcr4	2,100326859	5,6E-06
<i>HEAT repeat containing 5B</i>	Heatr5b	2,091291197	1,5E-05
<i>WD repeat and FYVE domain containing 1</i>	Wdfy1	2,044459665	2,4E-04
<i>glutaminytRNA synthase (glutamine-hydrolyzing)-like 1</i>	Qrs11	2,037575531	6,3E-05
<i>zinc finger protein 993</i>	Zfp993	1,8230878	7,8E-06
<i>calmodulin regulated spectrin-associated protein 1</i>	Camsap1	1,721539564	7,2E-04
<i>guanine nucleotide binding protein (G protein), beta 4</i>	Gnb4	1,718839168	7,4E-07
<i>predicted gene 6768</i>	Gm6768	1,629982603	1,7E-05
<i>SRY (sex determining region Y)-box 6</i>	Sox6	1,487462887	1,4E-04
<i>makorin, ring finger protein, 2</i>	Mkrm2	1,408550689	3,0E-04
<i>phosphatidylserine synthase 1</i>	Ptdss1	1,345002767	1,1E-05
<i>DEP domain containing MTOR-interacting protein</i>	Deptor	1,08243417	1,2E-04
<i>myb-like, SWIRM and MPN domains 1</i>	Mysm1	1,009818192	6,1E-04
<i>geranylgeranyl diphosphate synthase 1</i>	Ggps1	-1,035687668	4,7E-06
<i>coiled-coil serine rich 1</i>	Ccser1	-1,038445209	6,4E-04
<i>v-myc avian myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived</i>	Mycn	-1,042977542	7,4E-04
<i>proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 5</i>	Psmb5	-1,04780096	3,4E-08
<i>PYD and CARD domain containing</i>	Pycard	-1,05984934	9,2E-05
<i>transmembrane protein 8 (five membrane-spanning domains)</i>	Tmem8	-1,063328385	5,8E-04
<i>aquarius</i>	Aqr	-1,095236771	6,2E-04
<i>LanC (bacterial lantibiotic synthetase component C)-like 1</i>	Lancl1	-1,214673647	2,3E-05

Anhang

<i>SAC1 suppressor of actin mutations 1-like (yeast)</i>	Sacm11	-1,237359121	2,6E-04
<i>RAR-related orphan receptor alpha</i>	Rora	-1,302193078	1,1E-05
<i>insulin receptor</i>	Insr	-1,345104211	4,8E-04
<i>brain expressed X-linked 4</i>	Bex4	-1,403357048	3,4E-04
<i>protoporphyrinogen oxidase</i>	Ppox	-1,694761908	3,0E-04
<i>ribosomal protein S13, pseudogene 2</i>	Rps13-ps2	-1,702942549	3,5E-06
<i>zinc finger protein 322A</i>	Zfp322a	-1,782929724	1,9E-04
<i>paraoxonase 2</i>	Pon2	-2,128301178	1,5E-04
<i>forkhead box O4</i>	Foxo4	-2,473680207	4,7E-04
<i>coiled-coil domain containing 62</i>	Ccdc62	-2,825667033	5,1E-07
<i>chromodomain protein, Y chromosome-like</i>	Cdyl	-3,298909177	3,0E-05
<i>cation channel, sperm associated 2</i>	Catsper2	-3,453037356	6,2E-04
<i>erythroid differentiation regulator 1</i>	Erdr1	-3,547819666	2,1E-04
<i>insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 2</i>	Igf2bp2	-3,597291622	3,2E-04
<i>predicted gene 15893</i>	Gm15893	-3,885770477	9,5E-04
<i>tripartite motif-containing 5</i>	Trim5	-3,887480473	1,6E-16
<i>tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13, opposite strand</i>	Tnfsf13os	-3,958403662	1,6E-05
<i>RIKEN cDNA 2610507I01 gene</i>	2610507I01Rik	-4,26107387	7,0E-04
<i>predicted gene 1966</i>	Gm1966	-4,330032632	1,0E-27
<i>mitochondrially encoded tRNA arginine</i>	mt-Tr	-4,894727367	3,8E-04
<i>homeobox B6</i>	Hoxb6	-5,205456821	1,0E-04
<i>predicted gene 44676</i>	Gm44676	-5,609901243	7,6E-04
<i>NHS-like 2</i>	Nhsl2	-6,31846458	4,3E-04
<i>ribosomal protein S27A, pseudogene 1</i>	Rps27a-ps1	-6,785949594	7,5E-04
<i>RIKEN cDNA 6430548M08 gene</i>	6430548M08Rik	-6,822669543	3,5E-05
<i>hemoglobin, beta adult t chain</i>	Hbb-bt	-7,069548565	1,1E-08
<i>predicted gene 15585</i>	Gm15585	-7,070227149	9,1E-04
<i>predicted gene 6225</i>	Gm6225	-7,105661887	2,6E-04
<i>RIKEN cDNA 4930431P19 gene</i>	4930431P19Rik	-7,23481202	8,3E-04
<i>leishmanolysin-like (metallopeptidase M8 family)</i>	Lmln	-7,372841495	1,5E-04
<i>serine (or cysteine) peptidase inhibitor,</i>	Serpine2	-7,374431773	8,5E-04

<i>clade E, member 2</i>			
<i>RIKEN cDNA 5430434F05 gene</i>	5430434F05Rik	-7,41793182	4,0E-09
<i>maternally expressed 3</i>	Meg3	-7,452661199	1,2E-06
<i>transmembrane protein 136</i>	Tmem136	-7,463611072	1,5E-05
<i>solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 5</i>	Slc16a5	-7,535412828	9,6E-05
<i>histone cluster 1, H4m</i>	Hist1h4m	-7,806716442	1,5E-11
<i>predicted gene 16185</i>	Gm16185	-7,818645373	4,7E-04
<i>RIKEN cDNA 1700012C14 gene</i>	1700012C14Rik	-7,820396797	1,1E-04
<i>histone cluster 3, H2ba</i>	Hist3h2ba	-7,890796995	4,7E-05
<i>Rhesus blood group-associated B glycoprotein</i>	Rhbg	-8,107828147	8,3E-04
<i>GTPase, very large interferon inducible 1</i>	Gvin1	-8,239198331	2,0E-11
<i>cation channel sperm associated auxiliary subunit gamma 1</i>	Catsperg1	-8,285643035	3,5E-04
<i>predicted gene, 16754</i>	Gm16754	-8,322534661	1,6E-07
<i>glutamine repeat protein 1</i>	Glrp1	-8,333826612	8,6E-05
<i>predicted gene 27184</i>	Gm27184	-8,363815663	4,9E-04
<i>Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virus (FBR-MuSV) ubiquitously expressed (fox derived), pseudogene 2</i>	Fau-ps2	-8,389725463	4,5E-05
<i>Eph receptor B4</i>	Ephb4	-8,509855544	7,5E-05
<i>predicted gene, 37520</i>	Gm37520	-8,54850521	8,2E-08
<i>predicted gene, 16523</i>	Gm16523	-8,604967229	1,4E-06
<i>predicted gene, 26896</i>	Gm26896	-8,648473429	3,0E-18
<i>predicted gene 43305</i>	Gm43305	-8,725797732	7,0E-15
<i>predicted gene 43149</i>	Gm43149	-8,73618634	5,5E-04
<i>predicted gene 45854</i>	Gm45854	-8,811960094	1,6E-04
<i>predicted gene, 37120</i>	Gm37120	-9,021109052	5,1E-04
<i>nephronophthisis 4 (juvenile) homolog (human)</i>	Nphp4	-9,082160404	1,3E-05
<i>family with sequence similarity 171, member B</i>	Fam171b	-9,197158592	1,2E-04
<i>immunoglobulin superfamily, member 9</i>	Igsf9	-9,297370492	7,4E-05
<i>protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3E</i>	Ppp1r3e	-9,394596742	4,7E-06
<i>predicted gene 16083</i>	Gm16083	-9,39635815	3,5E-08

Anhang

<i>spermatogenesis associated 18</i>	Spata18	-9,433023454	4,9E-05
<i>telomerase reverse transcriptase</i>	Tert	-9,499420091	1,1E-06
<i>solute carrier family 12, member 4</i>	Slc12a4	-9,525830021	9,4E-05
<i>mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 3</i>	mt-Nd3	-9,536535149	5,5E-24
<i>predicted gene 45220</i>	Gm45220	-9,588800951	8,0E-06
<i>solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 9</i>	Slc9a9	-9,635618441	6,8E-04
<i>transformation related protein 53 inducible nuclear protein 2</i>	Trp53inp2	-9,668173544	6,5E-11
<i>F-box protein 27</i>	Fbxo27	-9,7583426	1,5E-05
<i>stonin 2</i>	Ston2	-9,817975719	3,5E-09
<i>olfactory receptor 65</i>	Olfr65	-9,878529776	1,9E-04
<i>GTPase, IMAP family member 7</i>	Gimap7	-9,993065261	9,7E-06
<i>predicted gene, 37706</i>	Gm37706	-10,00694975	8,3E-06
<i>RIKEN cDNA 6820402A03 gene</i>	6820402A03Rik	-10,01549252	2,1E-09
<i>tripartite motif-containing 12A</i>	Trim12a	-10,03509846	7,4E-58
<i>transglutaminase 1, K polypeptide</i>	Tgm1	-10,27267743	9,0E-09
<i>HIV-1 Tat interactive protein 2</i>	Htatip2	-11,8557427	1,2E-32
<i>glucosamine-6-phosphate deaminase 2</i>	Gnpda2	-12,60686876	2,7E-40
<i>ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3</i>	Entpd3	-21,48373901	8,6E-13
<i>predicted gene 17098</i>	Gm17098	-22,15330553	1,7E-13
<i>syntaxin 1A (brain)</i>	Stx1a	-22,18428925	1,6E-13
<i>predicted gene, 38375</i>	Gm38375	-22,20594363	1,5E-13
<i>predicted gene 45693</i>	Gm45693	-22,24072454	1,4E-13
<i>shisa family member 7</i>	Shisa7	-22,26095827	1,3E-13
<i>predicted gene 43127</i>	Gm43127	-22,36564706	9,9E-14
<i>RIKEN cDNA 2600006K01 gene</i>	2600006K01Rik	-22,37430997	9,7E-14
<i>0</i>	AC171277.1	-22,37746787	9,6E-14
<i>RIKEN cDNA F730016J06 gene</i>	F730016J06Rik	-22,38829071	9,2E-14
<i>predicted gene 15989</i>	Gm15989	-22,4577613	7,8E-14
<i>predicted gene 44571</i>	Gm44571	-22,48870603	7,2E-14
<i>transmembrane protein 171</i>	Tmem171	-22,56908775	5,9E-14
<i>predicted gene, 38042</i>	Gm38042	-22,59164108	5,4E-14

<i>NLR family, pyrin domain containing 5, pseudogene</i>	Nlrp5-ps	-22,5933471	5,5E-14
<i>predicted gene 45240</i>	Gm45240	-22,60097431	5,4E-14
<i>predicted gene, 37366</i>	Gm37366	-22,6229567	5,1E-14
<i>docking protein 7</i>	Dok7	-22,65149396	4,7E-14
<i>profilin family, member 4</i>	Pfn4	-22,65902395	4,7E-14
<i>predicted gene 29590</i>	Gm29590	-22,66434906	4,6E-14
<i>killer cell lectin-like receptor subfamily B member 1F</i>	Klrb1f	-22,66954494	4,5E-14
<i>predicted gene, 37482</i>	Gm37482	-22,70137547	4,2E-14
<i>predicted gene 45159</i>	Gm45159	-22,71502736	4,0E-14
<i>oocyte secreted protein 1</i>	Oosp1	-22,72299043	4,0E-14
<i>predicted gene 43817</i>	Gm43817	-22,73790648	3,8E-14
<i>olfactomedin-like 2B</i>	Olfml2b	-22,74574702	3,7E-14
<i>cysteine-rich secretory protein 2</i>	Crisp2	-22,79258197	3,3E-14
<i>solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, betaine/GABA), member 12</i>	Slc6a12	-22,79433486	3,3E-14
<i>predicted gene 20658</i>	Gm20658	-22,83784169	2,9E-14
<i>RIKEN cDNA 3010001F23 gene</i>	3010001F23Rik	-22,86390109	2,8E-14
<i>RIKEN cDNA 1110046J04 gene</i>	1110046J04Rik	-22,86619179	2,7E-14
<i>RIKEN cDNA 1110025M09 gene</i>	1110025M09Rik	-22,92403576	2,4E-14
<i>adhesion G protein-coupled receptor E1</i>	Adgre1	-22,92760884	2,3E-14
<i>predicted gene 15916</i>	Gm15916	-22,99225895	2,0E-14
<i>reprimin, TP53 dependent G2 arrest mediator candidate</i>	Rprm	-22,99343949	2,0E-14
<i>protocadherin gamma subfamily B, 7</i>	Pcdhgb7	-23,04357009	1,7E-14
<i>predicted gene, 38156</i>	Gm38156	-23,07491543	1,6E-14
<i>predicted gene, 37802</i>	Gm37802	-23,07796103	1,6E-14
<i>amidohydrolase domain containing 1</i>	Amdhd1	-23,11609547	1,4E-14
<i>glycoprotein Ib, beta polypeptide</i>	Gp1bb	-23,13901478	1,3E-14
<i>transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 7</i>	Trpc7	-23,14242304	1,3E-14
<i>vomerolateral 1 receptor 90</i>	Vmn1r90	-23,15333651	1,3E-14
<i>predicted gene 43667</i>	Gm43667	-23,1775869	1,2E-14
<i>androgen dependent TFPI regulating protein</i>	Adtrp	-23,21503122	1,1E-14

Anhang

<i>ataxin 7-like 1, opposite strand 1</i>	Atxn7l1os1	-23,2203735	1,1E-14
<i>solute carrier family 23 member 4</i>	Slc23a4	-23,27816954	9,2E-15
<i>serine (or cysteine) peptidase inhibitor; clade G, member 1</i>	Serping1	-23,2991328	8,8E-15
<i>prostaglandin F2 receptor negative regulator</i>	Ptgfrn	-23,36381318	7,4E-15
<i>apoptosis-associated tyrosine kinase</i>	Aatk	-23,38063123	7,1E-15
<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 3</i>	Cxcl3	-23,38132154	7,1E-15
<i>predicted gene, 26719</i>	Gm26719	-23,45170483	5,9E-15
<i>expressed sequence C78859</i>	C78859	-23,49390277	5,3E-15
<i>lipase, hepatic</i>	Lipc	-23,51512406	5,0E-15
<i>predicted gene 10640</i>	Gm10640	-23,56305604	4,4E-15
<i>diacylglycerol lipase, alpha</i>	Dagla	-23,56527739	4,3E-15
<i>PHD finger protein 24</i>	Phf24	-23,59320838	4,0E-15
<i>PIH1 domain containing 2</i>	Pih1d2	-23,60594338	3,9E-15
<i>premelanosome protein</i>	Pmel	-23,61183403	3,8E-15
<i>SH2 domain containing 6</i>	Sh2d6	-23,62036469	3,8E-15
<i>smoothelin-like 2</i>	Smtnl2	-23,63267207	3,6E-15
<i>gulonolactone (L-) oxidase</i>	Gulo	-23,6449075	3,5E-15
<i>predicted gene 43417</i>	Gm43417	-23,71397163	2,9E-15
<i>predicted gene 5464</i>	Gm5464	-23,79812673	2,3E-15
<i>RIKEN cDNA 4933431G14 gene</i>	4933431G14Rik	-23,84087615	2,1E-15
<i>predicted gene, 37482</i>	Gm37482	-23,87972717	1,9E-15
<i>opsin 3</i>	Opn3	-23,89195005	1,8E-15
<i>insulin receptor substrate 3</i>	Irs3	-23,91844965	1,7E-15
<i>serine protease inhibitor; Kunitz type 1</i>	Spint1	-23,95382794	1,5E-15
<i>predicted gene 43533</i>	Gm43533	-23,95776519	1,5E-15
<i>SH2 domain containing 4A</i>	Sh2d4a	-24,00016319	1,4E-15
<i>CD300C molecule 2</i>	Cd300c2	-24,03202865	1,2E-15
<i>RIKEN cDNA 2610300M13 gene</i>	2610300M13Rik	-24,04905465	1,2E-15
<i>RIKEN cDNA 4930438A08 gene</i>	4930438A08Rik	-24,05504715	1,2E-15
<i>aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 2</i>	Arntl2	-24,18812185	8,1E-16
<i>G protein-coupled receptor 84</i>	Gpr84	-24,2663739	6,5E-16

Anhang

<i>CD83 antigen</i>	Cd83	-24,37339248	4,9E-16
<i>UDP-GalNAc:betaGlcNAc beta 1,3-galactosaminyltransferase, polypeptide 1</i>	B3galnt1	-24,41385849	4,4E-16
<i>glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 5</i>	Gdpd5	-24,42383447	4,2E-16
<i>profilin 2</i>	Pfn2	-24,48294591	3,6E-16
<i>matrix metalloproteinase 25</i>	Mmp25	-24,6218136	2,5E-16
<i>interferon activated gene 209</i>	Ifi209	-24,62916238	2,4E-16
<i>polymerase (DNA directed), mu</i>	Polm	-25,18864755	5,0E-17
<i>cathepsin G</i>	Ctsg	-25,2495185	4,2E-17
<i>RAS-like, family 11, member A</i>	Rasl11a	-25,25223611	4,9E-18