MAPKAPK2-Deletion führt zur partiellen Normalisierung des sekretorischen Phänotypen in Telomer-dysfunktionellen Mäusen ohne Auswirkung auf Organerhalt und Überleben

Von der naturwissenschaftlichen Fakultät der

Universität Ulm zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

Dissertation

von

Dipl. Biol. Anne Gompf

Geboren am 14.03.1980 in Zittau

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Axel Groß

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Karl Lenhard Rudolph

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Nils Johnsson

Tag der Promotion: 19.07.2011

Meiner Mutter

Zusammenfassung

Telomerase-Knockout-Mäuse später Generationen zeigen mit sukzessiver Telomerverkürzung frühzeitig Alterungssymptome wie einen Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyp, Myeloproliferation, vermindertes Körpergewicht, Krypten- und Villusatrophie im Darm und haben eine verkürzte Lebenserwartung. Ein Molekül, das bei diesen Alterungserscheinungen eine Rolle spielen könnte, ist die Serin-Threonin-Kinase MK2 (MAPKAP-Kinase 2), die ein direktes Zielprotein der Stress-aktivierten MAP-Kinase p38α/β ist. Neben der Regulation vieler Zytokine und anderer Mediatoren, der Beteiligung an Hämatopoese und entzündlichen Krankheiten sowie der Mitwirkung in der DNS-Schädigungssignalkaskade und am Zellzyklusarrest, könnte MK2 auch im Glucose- und Lipid-Metabolismus eine Rolle spielen. Ziel dieser Arbeit war deshalb die Untersuchung des Einflusses von MK2 auf frühzeitige Alterung bedingt durch Telomerverkürzung im Mausmodell des Telomerase- und *MK2*-Doppelknockouts.

Die Hypothese, dass das Ausschalten von MK2 die zu Seneszenz und Apoptose führende Aktivierung der p53/p21-Signale nach Telomer-verkürzungsbedingter DNS-Schädigung unterdrücken und somit Gewebsschaden vermieden werden könnte, bestätigte sich nicht. Trotz verminderter p53/p21-Aktivierung war das Auftreten chromosomaler Fusionen im Darmepithel der Doppelknockout-Mäuse nicht reduziert und die Darmstruktur geschädigt. Der durch vermehrt sezerniertes Wachstumshormon bei gleichzeitiger Wachstumshormonresistenz und geringem Körpergewicht angezeigte Zustand der Mangelernährung Telomerase-defizienter Mäuse wurde durch den *MK2*-Knockout noch verschlimmert, was vermutlich die Auswirkung einer gestörten Gluconeogenese war. Auf das Überleben Telomerase-defizienter Mäuse hatte das Fehlen der MAPKAP-Kinase 2 jedoch keine Auswirkung. Die systemische Entzündung der Telomerase-Knockout-Tiere, erkennbar am veränderten Zytokinmilieu und vermehrt auftretenden Zellen der angeborenen Immunabwehr, konnte durch die Unterbrechung der p38/MK2-Signale ebenfalls nicht verbessert werden. Die Reduktion von Entzündungsfaktoren im Blutplasma bei Verstärkung der Wachstumshormonsekretion durch MK2-Defizienz änderte nichts an der im Telomer-dysfunktionellen Hintergrund auftretenden Granulozytose, Anämie und Lymphopenie; Splenomegalie konnte durch Proliferationsreduktion der hämatopoetischen Zellen jedoch verhindert werden.

Schlagwörter: Telomerdysfunktion – MK2 – SASP – Myeloproliferation

Summary

With successive telomere shortening late generation Telomerase knockout mice prematurely develop aging symptoms like a senescence-associated secretory phenotype, myeloproliferation, reduced body weight, crypt and villus atrophy in the intestine and have a shortened life expectancy. A candidate molecule for mediating these aging symptoms is MAPKAP-Kinase 2 (MK2), a serine/threonine kinase and direct target of the stress-activated MAP kinase p38α/β. Besides regulating several cytokines and other mediators, its participation in hematopoiesis and inflammatory diseases, as wells as its contribution to DNA damage signaling and cell cycle arrest, MK2 could also be involved in glucose and lipid metabolism. To this end the influence of MAPKAP-Kinase 2 on accelerated aging due to telomere shorting has been analyzed in the mouse model of telomerase and *MK2* double knockout.

We hypothesized that elimination of MK2 could prevent activation of p53/p21 after telomere-shorting induced DNA damage leading to senescence and apoptosis and thereby prevent tissue damage, but could not confirm this hypothesis. Despite reduced activation of p53/p21, chromosomal fusions persisted in the intestinal epithelium of double knockout mice and the intestine was structurally damaged. The nutrient deficiency of Telomerase knockout mice, of which signs are increased growth hormone secretion and simultaneous growth hormone resistance, was exacerbated by loss of MK2 presumably as an effect of disturbed gluconeogenesis. Nevertheless, survival of Telomerase knockout mice was not altered by the absence of MK2. Nor could the systemic inflammation be improved by disruption of p38/MK2 signaling in Telomerase deficient mice, recognizable in the persisting biased cytokine environment and the prevalence of innate immune system cells. The reduction of inflammation factors in the blood plasma paralleled by an increase in growth hormone secretion by MK2 deficiency did not prevent the development of granulocytosis, anemia and lymphopenia seen in the Telomere dysfunctional background, although splenomegaly could be prevented by reduction of hematopoietic cell proliferation.

Key Words: Telomere dysfunction – MK2 – SASP – myeloproliferation

Inhalt

Kapitel	Titel	Seite
	Inhaltsverzeichnis	I
	Abkürzungsverzeichnis	IV
1.	**Einleitung**	1
1.1.	Alterung und Telomere	1
1.2.	Zellzyklus und DNS-Schädigungssignale	3
1.3.	Telomerverkürzung im Rahmen der menschlichen Alterung und bei chronischen Krankheiten	5
1.4.	Telomerase-Knockout-Maus	6
1.5.	Seneszenz-assoziierter sekretorischer Phänotyp (SASP), Entzündungsaltern (*InflamAging*) und Immunoseneszenz	7
1.6.	Altersbedingte Mangelernährung	10
1.7.	Untersuchung molekularer Mechanismen telomerlängenabhängiger Alterung: das Kandidatenmolekül MK2	13
1.8.	Zielstellung	17
2.	**Material und Methoden**	19
2.1.	Mausstämme	19
2.2.	Genotypisierung	19
2.3.	Diäten	21
2.4.	Gewichts- und Überlebenskurven	21
2.5.	Blutzuckermessung und Glucose-Toleranztest	22
2.6.	γ-Bestrahlung	22
2.7.	Transplantationen	22
2.8.	Nekropsie der Mäuse und Organentnahme	23
2.9.	Einbetten der Organe	24
2.10.	Durchflusszytometrie	24
2.11.	ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)	33
2.12.	Glykogenbestimmung	34
2.13.	Western Blots	34
2.14.	Histologische Analysen	35
2.15.	Puffer, Reagenzien, Anwendungen	37
2.16.	Statistik	39

3. Ergebnisse 41
3.1. Darm und DNS-Schädigung 41
3.1.1. Die Deletion von *MK2* hat keinen Einfluss auf das Überleben von Telomerase-defizienten und -profizienten Mäusen 41
3.1.2. Der Verlust der MK2-Expression hat einen negativen Einfluss auf das Körpergewicht von Telomerase-Knockout- und Kontrollmäusen 42
3.1.3. Beim strukturellen Aufbau des Darms spielt MAPKAP-Kinase 2 keine Rolle 43
3.1.4. *MK2*-Defizienz verringert die Akkumulation der Schlüsselmoleküle des DNS-Schädigungssignalweges p53 und p21 45
3.1.5. Das Fehlen der MAPKAP-Kinase 2 führt zum vermehrten Auftreten chromosomaler Fusionen in Telomerase-profizienten Mäusen 47
3.2. Metabolismus 48
3.2.1. Die Deletion von *MK2* führt zu niedrigen Blutzuckerspiegeln und gesteigerter Glucose-Toleranz vor allem in Telomerase-defizienten Mäusen 48
3.2.2. *MK2*-Defizienz hat keinen Einfluss auf die Energiespeicherung in der Leber 49
3.2.3. Eine Glucose-reiche Diät verlängert das Leben Telomerase-defizienter Mäuse 50
3.2.4. Auch auf Glucose-reicher Diät haben $MK2^{-/-}$-Tiere niedrigen Blutzucker 51
3.2.5. *MK2*-Defizienz schwächt die Expression des Insulin-Rezeptors nur leicht 52
3.2.6. *MK2*-Defizienz unterdrückt auch die Expression von PEP-CK 53
3.2.7. Fehlende MAPKAP-Kinase 2 verstärkt die Überexpression von Wachstumshormon in Telomerase-defizienten Mäusen, hat aber auf IGF-1 keinen Einfluss 54
3.2.8. Der Verlust von *MK2* verstärkt die IGFBP-1-Expression 57
3.3. Hämatopoetisches System 58
3.3.1. *MK2*-Defizienz vermindert die Zellularität in Knochenmark und Milz 58
3.3.2. Die Deletion von *MK2* hat nur wenig Einfluss auf das Blutbild 60
3.3.3. Das Fehlen von *MK2* hat einen negativen Einfluss auf die Zahl reifer B-Zellen 62
3.3.4. *MK2*-Defizienz führt zu erhöhten CD4- und CD8-T-Zellzahlen 65
3.3.5. *MK2*-Deletion hat einen negativen Einfluss auf NK-Zellen im Knochenmark 68
3.3.6. *MK2*-Knockout-Mäuse haben anteilig mehr Granulozyten, aber weniger Monozyten und Makrophagen 70
3.3.7. Fehlende MK2-Expression hat einen negativen Einfluss auf die Zahl der Dendritischen Zellen in Knochenmark, Milz und Blut 74

3.3.8. Der *MK2*-Knockout reduziert die Zahl lymphoider Vorläuferzellen, hat aber keinen signifikanten Einfluss auf die B-Zell-Entwicklung im Knochenmark 80
3.3.9. *MK2*-Defizienz führt auch zu einer Reduktion der myeloiden Vorläuferzellen 84
3.3.10. Der *MK2*-Knockout vermindert die Zahl der Erythroblasten in Knochenmark und Milz 84
3.3.11. Auch auf primitivste hämatopoetische Vorläuferzellen und Stammzellen hat der Verlust von *MK2* einen negativen Einfluss 87
3.3.12. *MK2*-Defizienz führt zur partiellen Normalisierung der Zytokinexpression in Telomerase-defizienten Mäusen 91
3.3.13. Die Deletion von *MK2* reduziert die Zahl der Stammzellen, die im Blut zirkulieren und teils auch die extramedulläre Hämatopoese 94
3.3.14. *MK2*-Defizienz hat einen negativen Einfluss auf die Zellzyklusprogression im Knochenmark und in der Milz 96
3.3.15. MK2 hat keinen Einfluss auf die Telomerlänge 98

4. Diskussion 99
4.1. DNS-Schädigung und Zellzyklus im Darmepithel 99
4.2. Darmstruktur und Ernährung 102
4.3. Kataboler Metabolismus und Stress 103
4.4. Zytokine, Hämatopoese und Immunfunktion 107
4.5. Zusammenfassung und Ausblick 113

5. Anhang 117
6. Literaturverzeichnis 124
7. Publikationsliste 139
8. Danksagung 140

Abkürzungen

∅	durchschnittlich
Abb.	Abbildung
APC	Allophycocyanin
BLC (CXCL13)	*B lymphocyte chemoattractant*
bp	Basenpaare
BSA	*bovine serum albumine*
CD	*cluster of differentiation*
CGH	*comparative genome hybridization*
CO_2	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4'-6-Diamidin-2-Phenylindol
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosid-Triphosphate d[A/G/T/C]TP
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
EtOH	Ethanol
FA	Formaldehyd
FBS	*fetal bovine serum*
FISH	Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Flt3	*fms-like tyrosine kinase receptor-3*
G1, G2, G0 (-Phase)	*growth* / Wachstumsphasen des Zellzyklus
G3	dritte Generation Telomerase-Knockout, auch G3 *mTerc*$^{-/-}$
G-CSF	*granulocyte colony stimulating factor*
GM-CSF	*granulocyte/macrophage colony stimulating factor*
Gy	Gray (Energiedosis)
HRP	*horseraddish peroxidase*
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
kb/kg	Kilobasenpaare/Kilogramm
KM	Knochenmark
M (-Phase)	Mitosephase des Zellzyklus
MEFs	embryonale Fibroblasten aus der Maus
µg/µl	Mikrogramm/Mikroliter

mg/ml/mM	Milligramm/Milliliter/Millimolar
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
MHC	*Major Histocompatibility Complex*
MIP-3α (CCL20)	*macrophage inflammatory protein 3 alpha*
MJ	Megajoule
MK2	MAPKAPK2, Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-aktivierte Proteinkinase 2
mTerc	Telomerase-RNS-Komponente der Maus (abgekürzt auch mTR)
MeOH	Methanol
MZ	Milz
NaCl	Natriumchlorid
ng/nm	Nanogramm/Nanometer
P	*probability*, (Überschreitungs-)Wahrscheinlichkeit
PB	Peripheres Blut
PBS	*phosphate-buffered saline*
PCR	*polymerase chain reaction*
PE	Phycoerythrin
PerCP-Cy5.5	Peridinin-Chlorophyll-Proteinkomplex-*Cyanine Dye* 5.5
PFA	Paraformaldehyd
PNA-Sonde	*peptide nucleic acid*-Sonde
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rel.	relativ
s.	siehe
S (-Phase)	Synthesephase des Zellzyklus
sog.	sogenannte
SDS-PAGE	*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*
TBS	*Tris-buffered saline*
TBS-T	*Tris-buffered saline-Tween 20*
Tie-2	Tyrosinkinase mit Immunglobulin- und EGF (*epidermal growth factor*)-Homologiedomänen (CD202)
u.a.	unter anderem
vgl.	verglichen
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1. Alterung und Telomere

Die biologische Alterung ist ein zeitabhängiger Prozess, der zum Funktionsverlust des Organsystems und damit letztendlich zum Tod des Organismus führt. Auf zellulärer Ebene beschreibt Alterung eine abnehmende Teilungsfähigkeit und nachlassende oder anormale funktionelle Aktivität (Hayflick und Moorhead, 1961; Sharpless und DePinho, 2004; Chambers et al., 2007; Sharpless und DePinho, 2007).

Zu den Ursachen der menschlichen Alterung wurden sowohl psychosoziale als auch biologische Theorien entwickelt. Die biologischen Alterungstheorien befassen sich unter anderem mit dem Einfluss von freien Radikalen und der Akkumulation von Fehlreparaturen und Mutationen in der DNS, aber auch mit entzündlichen und neuroendokrinen Prozessen. Nach der Hayflick-Limit-Theorie altern die meisten somatischen Zellen, weil sich mit jeder Zellteilung die Telomere um 50 bis 100 Basenpaare verkürzen und somit die Teilungsfähigkeit menschlicher Fibroblasten auf 50±10 Zellteilungen durch die Induktion von Seneszenz oder Apoptose begrenzt ist (Hayflick, 1965; Harley et al., 1990; Wright und Shay, 1992; Allsopp et al., 1995; Bengtson et al., 2008).

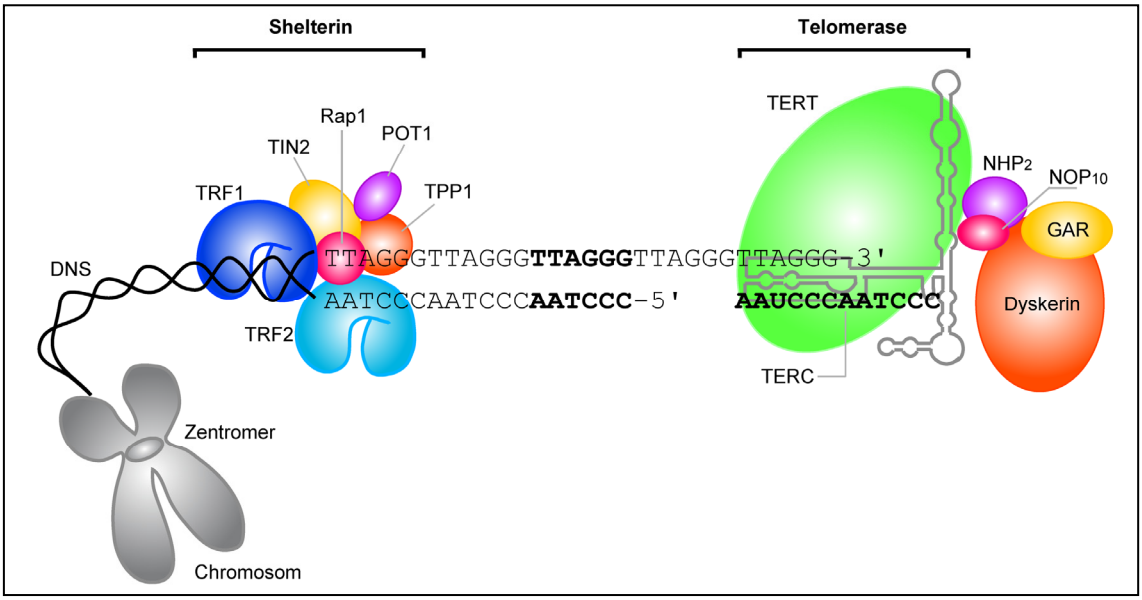

Abb. 1. Schematische Darstellung des Telomerkomplexes und der Telomerase (nach Calado, 2009). Telomere sind die Enden linearer eukaryotischer Chromosomen. Die Telomerase-RNS-Matrize (TERC) ist komplementär zum 3'-Strang-Überhang des Telomers. Die Reverse-Transkriptase-Aktivität der Telomerase (TERT) fügt Nukleotide zum Telomerende hinzu. Telomere sind durch einen Proteinkomplex bedeckt (Shelterin) und die Telomerase mit stabilisierenden Proteinen assoziiert (Dyskerin, NHP_2, NOP_{10}, GAR).

Telomere (griech. télos „Ende“ und méros „Teil“) sind die Endstücke eukaryotischer Chromosomen und umfassen die endständigen ca. 10 Kilobasenpaare (kb) beim Menschen und 12 bis 80 kb bei der Maus (Lansdorp et al., 1996; Zijlmans et al., 1997). Die Telomer-DNS in Vertebraten besteht aus kurzen wiederholt angeordneten Stücken der Sequenz TTAGGG (*tandem repeats*) und bildet einen 3'-Überhang (G-Strang-Überhang), der nach Zurückfaltung und Einwanderung in den Telomer-Doppelstrangbereich (D-Schleife) eine T-Schleife formt. Zusammen mit Telomer-bindenden Proteinen (Shelterin-Komplex und assoziierte Faktoren) bildet die Telomer-DNS einen Nukleoprotein-Komplex, der das Chromosomenende schützt (Abb. 1; Griffith et al., 1999; de Lange, 2005; Aubert und Lansdorp, 2008; Calado, 2009; De Boeck et al., 2009).

Bei der Zellteilung wird die DNS repliziert bevor sie auf die Tochterzellen aufgeteilt wird. Durch die 5'→3'-Syntheserichtung der DNS-abhängigen DNS-Polymerase III bedingt kann der Leitstrang zwar kontinuierlich, der Folgestrang aber nur diskontinuierlich mit Hilfe von RNS-Primern dupliziert werden. Da diese RNS-Primer letztendlich abgebaut werden und die sogenannten Okazaki-Fragmente durch eine weitere DNS-Polymerase und eine DNS-Ligase verbunden werden, entsteht am distalen Primer eine Lücke, die nicht durch die normalen DNS-Polymerasen gefüllt werden kann und sich somit die linearen Chromosomen bei jeder Zellteilung verkürzen (sogenanntes „Endreplikationsproblem“; Abb. 2; Blackburn, 1991).

Telomere können (wieder)hergestellt werden: einerseits durch rekombinationsbasierte Mechanismen (ALT, *alternative lengthening of telomeres*; Bhattacharyya et al., 2010), hauptsächlich jedoch durch ein Enzym, welches Telomere *de novo* synthetisieren kann (Abb. 1 und Abb. 2). Telomerase ist eine RNS-abhängige DNS-Polymerase, ein Ribonukleoproteinkomplex bestehend aus einer RNS-Komponente (TERC, *telomerase RNA component*) und einer Protein-Komponente (TERT, *telomerase reverse transcriptase*). TERC dient als interne Matrize zur Synthese neuer Telomer-DNS durch TERT (Collins, 2006). Die Telomer-Synthese wirkt der Telomer-Verkürzung entgegen. Telomerase ist im adulten Organismus aber nicht in allen Geweben aktiv, sondern nur in Keimbahnzellen, hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen, sowie in aktivierten T-Zellen und Keimzentrums-B-Zellen (Norrback und Roos, 1997; Bekaert et al., 2004). Telomerase ist außerdem in der Mehrheit menschlicher Tumoren (re)aktiviert (Shay und Bacchetti, 1997; Kim, 1997). Kritisch kurze Telomere verlieren ihre protektive Funktion, die Enden der linearen Chromosomen werden als geschädigte DNS erkannt und prozessiert – der Zellzyklus wird angehalten (Abb. 3).

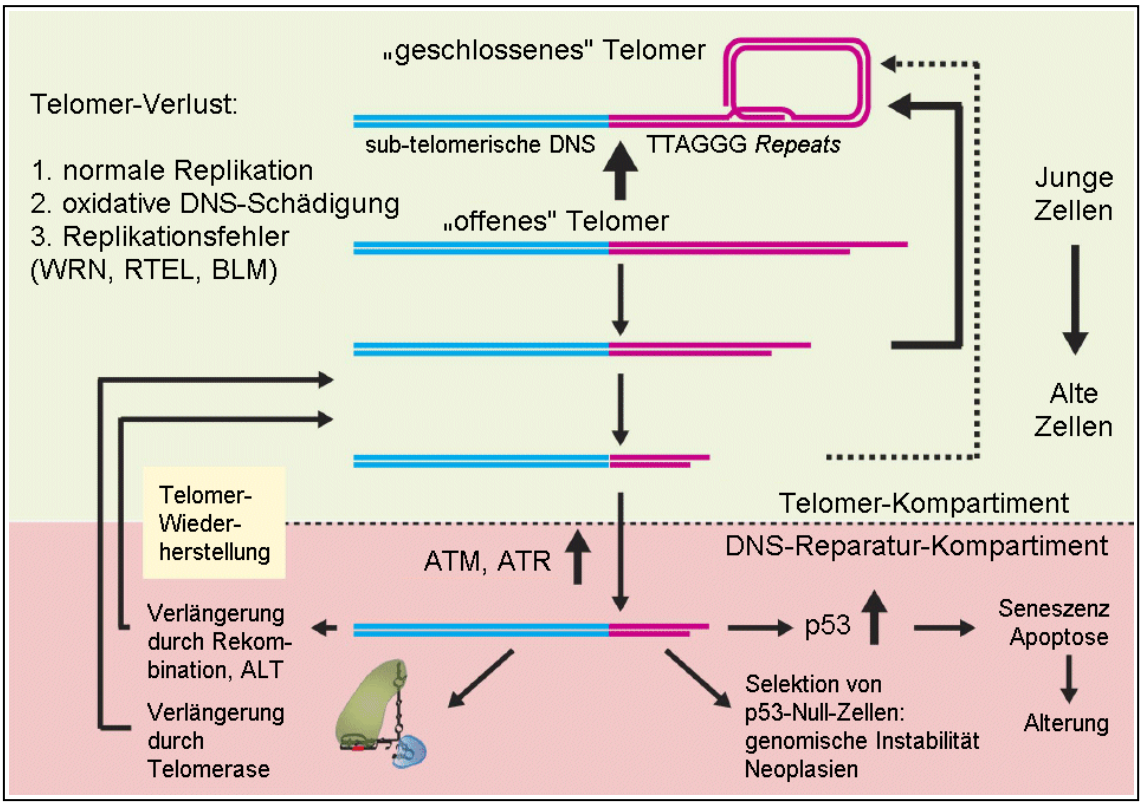

Abb. 2. Modell der Telomerverkürzung während der Zellteilung in primären somatischen Zellen (nach Aubert und Lansdorp, 2008). Kritisch kurze Telomere sind nicht mehr von DNS-Strangbrüchen zu unterscheiden und werden daraufhin von Enzymen der DNS-Reparatur erkannt und prozessiert. WRN, Werner-Syndrom-Gen (Helikase); RTEL, *regulator of telomere lenght*-Gen; BLM, Bloom-Syndrom-Gen (Helikasen); ALT, *alternative lengthening of telomeres*; ATM, *Ataxia telangiectasia-mutated*, und ATR, *ATM and Rad3-related* – Kinasen in der DNS-Schädigungssignalkaskade.

1.2. Zellzyklus und DNS-Schädigungssignale

Der Zellzyklus ist als eine koordinierte Abfolge von Phasen des Zellwachstums (G1, G2), der DNS-Synthese (S) und der Zellteilung (M) organisiert, wobei das Fortschreiten in die jeweils nächste Phase den erfolgreichen Abschluss der vorangegangenen voraussetzt. Diese Qualitätskontrolle wird in Zellzyklus-Kontrollpunkten verwirklicht (G1/S, intra-S, G2/M), die eine Reaktion auf Probleme während der Zellteilung wie DNS-Schädigung ermöglichen. Nicht mehr teilungsaktive Zellen befinden sich in der sogenannten G0-Phase außerhalb des Zyklus.

Die DNS-Schädigungssignalkaskade besteht aus mehreren parallelen Zweigen. Der sequentielle Aufbau aus Schädigungssensoren und *Upstream*-Kinasen, Mediatoren, *Transducer*-Kinasen und Effektor-Molekülen ist allen gemein (Abb. 3). Zyklin-abhängige Kinasen (CDKs, *cyclin-dependent kinases*), die eine entscheidende Rolle im Fortschreiten des Zellzyklus spielen, werden durch phasenabhängig exprimierte Zykline, aber auch durch Cdc25-Phosphatasen, p53/p21 und auch durch den p38/MK2-Signal-

weg in ihrer Aktivität reguliert (Manke et al., 2005). In Antwort auf DNS-Schädigung werden die Zellzyklus-Kontrollpunkte aktiviert, was in Zellzyklusarrest resultiert, der Zeit zur DNS-Reparatur gibt, oder bei zu schwer beschädigter DNS zu Seneszenz oder Apoptose führt (Sancar et al., 2004; Bucher und Britten, 2008).

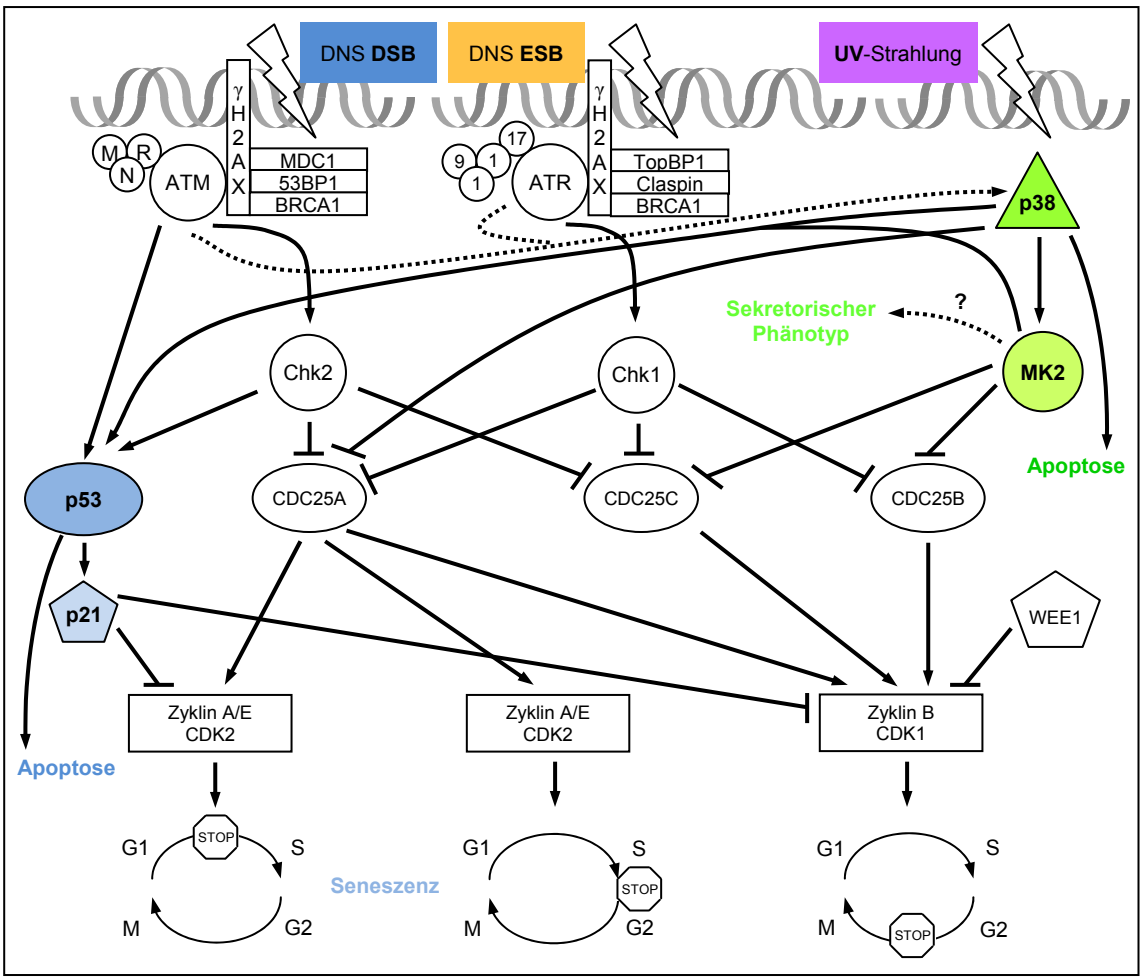

Abb. 3. Signaltransduktion an den Zellzyklus-Kontrollpunkten. Links: DSB (DNS-Doppelstrangbruch), MRN-Komplex aus Schädigungssensoren Mre11, Rad50, Nbs1; *Upstream*-Kinase ATM (*Ataxia telangiectasia-mutated*); Mediatoren MDC1 (*mediator of DNA damage checkpoint 1*), 53BP1 (p53-Bindeprotein-1) und BRCA1 (*breast cancer 1*); *Transducer*-Kinase Chk2 (*checkpoint kinase 2*); Mitte: ESB (DNS-Einzelstrang-bruch), Schädigungssensoren Rad17, Rad9-Rad1-Hus1; *Upstream*-Kinase ATR (*ATM and Rad3-related*); Mediatoren TopBP1 (*DNA topoisomerase 2-binding protein 1*), Claspin und BRCA1; *Transducer*-Kinase Chk1 (*checkpoint kinase 1*); γ-H2AX (phosphoryliertes Histon der H2A-Familie); Rechts: DNS-Schaden nach UV-Strahlung; *Transducer*-Kinase MK2 (MAPKAP-Kinase 2). Effektor-Moleküle: CDC25-Phosphatasen (*cell division cycle 25*), p53. Nach Bucher und Britten, 2008, modifiziert nach Reinhardt et al., 2007 und Thornton und Rincon, 2009.

Werden kritisch kurze, ungeschützte Telomere als Doppelstrangbrüche erkannt und prozessiert, führt die Reparatur durch nicht-homologe Endenverknüpfung (*non-homologous end joining*, NHEJ) zu chromosomalen Fusionen. Kennzeichnend für Telomer-dysfunktionelle Zellen ist das Auftreten von dizentrischen Chromosomen (Counter et al.,

1992; Hande et al., 1999), die auseinanderbrechen, werden die zwei Kinetochore in der Anaphase des Zellzyklus zu verschiedenen Spindelpolen gezogen (sichtbar als Anaphasenbrücken). Durch erneute „Reparatur" entstehen wiederum dizentrische Chromosomen, die zerreißen. Dieser Zyklus aus Zerreißen und Fusion (*breakage-fusion-brigde cycle*, *BFB*, zuerst von Barbara McClintock in Mais beschrieben) führt zu genomischer Instabilität (Riha et al., 2006). Replikative Seneszenz, also Kontrollpunkt-initiierter irreversibler Zellzyklusarrest oder Zelltod durch Apoptose verhindern aber im Normalfall die Proliferation chromosomal instabiler Zellen und wirken so als Tumorsuppressor-Mechanismen (Satyanarayana et al., 2003; Lechel et al., 2005).

Einige Moleküle aus der DNS-Schädigungssignalkaskade sind direkt oder indirekt auch an der Aufrechterhaltung der Telomerlänge beteiligt (d'Adda di Fagagna et al., 2003; Takai et al., 2003; Slijepcevic, 2006; Misri et al., 2008). So wurde gezeigt, dass bei Verlust des Telomer-Bindeproteins TRF2 die ATM-Signaltransduktion aktiviert wird, die zur p53-Stabilisierung und zu einem p21-vermittelten G1/S-Arrest führt (Karlseder et al., 1999).

1.3. Telomerverkürzung im Rahmen der menschlichen Alterung und bei chronischen Krankheiten

Im Menschen treten Telomerverkürzungen im Rahmen der Alterung insbesondere in hochproliferativen Geweben auf und es gibt Hinweise darauf, dass Telomerverkürzung die Lebenserwartung und das Auftreten von krankhaften Organveränderungen im Rahmen der menschlichen Alterung beeinflusst (Allsopp et al., 1995; Cawthon et al., 2003; Collerton et al., 2007).

Bei chronischen Erkrankungen, die einen erhöhten Zellumsatz bedingen, kommt es zu einer beschleunigten Verkürzung der Telomere, wie zum Beispiel bei aplastischer Anämie (Brümmendorf et al., 2001; Vulliamy et al., 2002), rheumatoider Arthritis (Fujii et al., 2009) und HIV (Nichols et al., 1999), bei Leberzirrhose (Kitada et al., 1995), idiopathischer Lungenfibrose (Armanios et al., 2007) und Colitis Ulcerosa (Risques et al., 2008). Eine Mutation in der RNS-Komponente der Telomerase (TERC) wurde in der autosomal dominanten Variante der Krankheit Dyskeratosis Congenita festgestellt, die unter anderem mit Knochenmarksversagen und frühzeitiger Alterung einhergeht (Vulliamy et al., 2001); in Patienten mit Knochenmarksversagen wurden aber auch Mutationen in der Telomerase-Reversen-Transkriptase (TERT) gefunden (Yamaguchi et al., 2005; Vulliamy et al., 2005; Vulliamy et al., 2006). Diese Krankheiten unterscheiden sich zwar im Bild der klinischen Symptome, können jedoch alle von Telomerase-Defizienz herrühren, da das Spektrum der beteilig-

ten Gewebe durch das Ausmaß und den Mechanismus der Telomerase-Inhibition und Telomerverkürzung beeinflusst wird (Jiang et al., 2007; Armanios, 2009).

1.4. Telomerase-Knockout-Maus

Da Maus-Inzuchtstämme bedeutend längere Telomere haben als Menschen (Lansdorp et al., 1996; Zijlmans et al., 1997), ist es in diesen Mäusen nicht möglich, den Einfluss der Telomerverkürzung auf die Alterung zu untersuchen. Eine künstliche Verkürzung der Telomere in der Maus kann aber durch die genetische Ausschaltung der Telomerase erreicht werden, durch die Deletion des Gens für die Telomerase-Reverse-Transkriptase (*mTert*; Yuan et al., 1999; Rajaraman et al., 2007) oder des Gens für die Telomerase-RNS-Komponente (*mTerc*; Blasco et al., 1997; Rudolph et al., 1999).

In den hinsichtlich der Alterung am besten untersuchten *mTerc*-Knockout-Mäusen sind in der ersten und zweiten Inzuchtgeneration noch keine Auswirkungen der Telomerase-Defizienz zu erkennen, ab der dritten Generation (G3) jedoch, mit sukzessiver Telomerverkürzung (Abb. 4 A), zeigen diese Mäuse verschiedene Symptome frühzeitiger Alterung: reduzierte Fertilität bis hin zur Sterilität, ulzerative Hautläsionen und verminderte Wundheilung, ergrauendes Fell und Fellverlust (Alopezie), Buckelbildung (Kyphose), vermindertes Körpergewicht, Krypten- und Villusatrophie im Darm und eine verkürzte Lebenserwartung (Abb. 4 B; Rudolph et al., 1999).

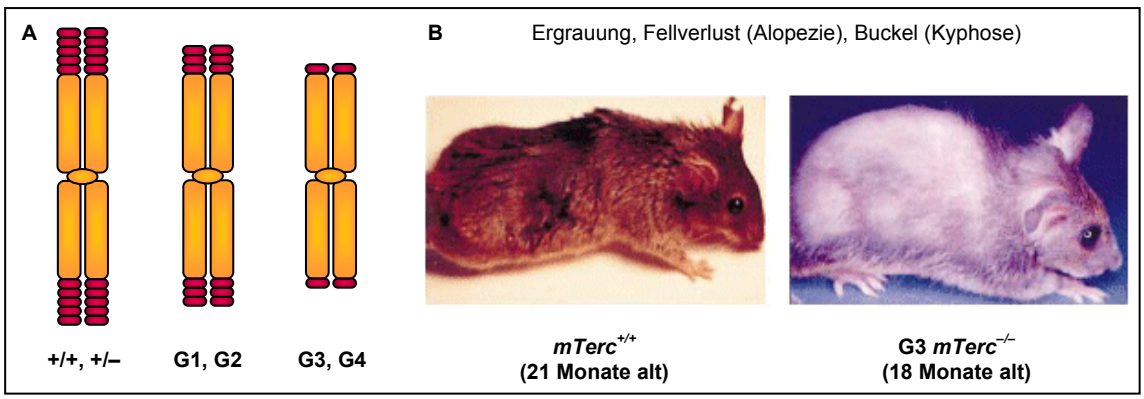

Abb. 4. A) Schematische Darstellung der Telomerlängen in Wildtypmäusen (*mTerc*$^{+/+}$ und *mTerc*$^{+/-}$) und in den Generationen Telomerase-defizienter Mäuse (G1 bis G4 *mTerc*$^{-/-}$). B) Äußeres Erscheinungsbild der Wildtyp- und G3 Telomerase-Knockout-Mäuse, hier im gemischten genetischen Hintergrund der Originalpublikation (Blasco et al., 1997; Rudolph et al., 1999).

Arbeiten der Gruppe um Prof. K. L. Rudolph zeigten, dass die Deletion von Komponenten des DNS-Schädigungssignalweges (p21 und Exo1) zu einer Verbesserung der Stammzellfunktion, des Organerhalts und der Lebensspanne in Telomer-dysfunk-

tionellen Mäusen führen kann (Choudhury et al., 2007; Schätzlein et al., 2007). Die Deletion der *Transducer*-Kinase Chk2 jedoch scheint nur eine untergeordnete Rolle zu spielen (Nalapareddy et al., 2010) und das Ausschalten des Effektor-Moleküls p53 im Darmepithel führt sogar zu einer weiteren Verkürzung der Lebensspanne von Telomer-dysfunktionellen Mäusen (Begus-Nahrmann et al., 2009). In einem anderen Mausmodell wurde dasselbe Phänomen bei Deletion von p53 auch in der Haut beobachtet (Ruzankina et al., 2009). Die Induktion der DNS-Schädigungssignalkaskade in Antwort auf Telomer-Dysfunktion limitiert also einerseits Organerhalt und Lebensspanne, andererseits werden dabei auch Mechanismen in Gang gesetzt, die dem Gewebserhalt dienen, wie z.B. die Beseitigung von chromosomal-instabilen Stammzellen, die anormal differenzieren und eine Gewebsatrophie und Fehlfunktion beschleunigen (Begus-Nahrmann et al., 2009).

1.5. Seneszenz-assoziierter sekretorischer Phänotyp (SASP), Entzündungsaltern (*InflamAging*) und Immunoseneszenz

Neben diesen zellintrinsischen Kontrollpunkten ruft Telomerverkürzung auch zellextrinsische Veränderungen hervor, die z.B. die Differenzierungsfähigkeit von hämatopoetischen Stammzellen beeinflussen. In Ju et al., 2007 wurde gezeigt, dass die in Telomer-dysfunktionellen Mäusen zu beobachtende Hemmung der B-Lymphozytenentwicklung im Knochenmark bei gleichzeitiger Steigerung der Granulopoese im Wesentlichen durch Faktoren im zellulären Umfeld und nicht durch intrinsische Stammzelldefekte verursacht wird.

Ein möglicher, auch in dieser Arbeit identifizierter Faktor, könnte G-CSF (Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor) sein, welches im Blutplasma gealterter Telomer-dysfunktioneller Mäuse um ein Vielfaches erhöht war (Ju et al., 2007). G-CSF-Knockout-Mäuse zeigen eine reduzierte Anzahl und eine verminderte Mobilisierung neutrophiler Granulozyten in die Zirkulation, außerdem eine verminderte Fähigkeit zur Kontrolle von Infektionen (Lieschke et al., 1994). G-CSF wirkt proliferationsstimulierend auf Granulozytenvorläuferzellen und unterstützt die phagozytische Fähigkeit reifer Granulozyten (Demetri und Griffin, 1991). Synthetisch hergestelltes G-CSF (Filgrastim) wird seit vielen Jahren in der Klinik gegen Chemotherapie-bedingte Neutropenie eingesetzt, auch gegen Myelosuppression nach Knochenmarkstransplantation (Welte et al., 1996) und zur Mobilisierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen ins Blut von Knochenmarksspendern (Nervi et al., 2006). Während das Anwachsen transplantierter Stammzellen im Knochenmarksempfänger eine Interaktion der Zellen mit dem Knochenmarksstroma (der Nische)

voraussetzt, ist die Unterbindung derselben zur Stammzellmobilisierung notwendig. G-CSF bewirkt im Spenderknochenmark die vermehrte Ausschüttung der Granulozyten-Proteinasen Elastase und Cathepsin-G, die eine VCAM (*vascular cell adhesion molecule*)-vermittelte Stammzell-Stroma-Interaktion degradieren können. Unter Stressbedingungen, wie bei einer Infektion oder einer Operation, steigt der Blut-G-CSF-Spiegel in Patienten an (Cebon et al., 1994; Noursadeghi et al., 2005), was für eine Rolle von G-CSF sowohl bei der Granulozytenfunktion und -differenzierung als auch in der Notfall-Granulopoese spricht.

Vor allem durch die Gruppe um J. Campisi wurde beschrieben, dass seneszente Zellen eine ganze Reihe von Faktoren sezernieren (Coppé et al., 2008; Rodier et al., 2009), wie z.B. Matrix-Metalloproteinasen, Wachstumsfaktoren und inflammatorische Zytokine, die zur altersassoziierten Gewebsumgestaltung und/oder chronischen Entzündung beitragen können. Dieser Seneszenz-assoziierte sekretorische Phänotyp (SASP) wurde bisher hauptsächlich in kultivierten menschlichen Fibroblasten und anderen Zelllinien gezeigt (Coppé et al., 2008; Rodier et al., 2009), aber auch in Blutplasma von alten und/oder chronisch kranken Menschen sowie in Kurzzeitkulturen murinen Knochenmarks (Jiang et al., 2008) und in embryonalen Mausfibroblasten (Coppé et al., 2010), und scheint ein universelles altersassoziiertes Phänomen zu sein (Zender und Rudolph, 2009; Goto, 2009; Freund et al., 2010). Untersuchungen an „Hundertjährigen" zeigten jedoch, dass es im Menschen neben geschlechtsspezifischen Unterschieden offenbar auch genetische Prädispositionen für stärkeres oder schwächeres Entzündungsaltern gibt (Franceschi und Bonafè, 2003).

Entzündungsaltern ist charakterisiert als schwache, kontrollierte, asymptomatische, chronische und systemische Entzündung, die hauptsächlich durch vermehrt zirkulierende pro-inflammatorische Zytokine vermittelt wird (Giunta, 2006). Ob durch direkte Wirkung der altersassoziiert-sezernierten Zytokine und Wachstumsfaktoren auf Stamm- und Immunzellen, oder indirekt durch Gewebsumgestaltung auf Ebene der Stromazellen in primären und sekundären lymphatischen Organen, die die Entwicklung und Stimulation der Immunzellen beeinflussen – die Funktion des Immunsystems ist im Alter verändert. Dabei ist die T- und B-Zell-Entwicklung im Alter vermindert (Montecino-Rodriguez und Dorshkind, 2006) und die hauptsächlich von den Lymphozyten vermittelte sogenannte adaptive Immunfunktion beeinträchtigt (Desai et al., 2010).

Neben dem mit zunehmendem Alter steigenden Risiko an myeloproliferativen Störungen wie Leukämien zu erkranken (Lichtman und Rowe, 2004; Horner et al., 2009), verrät schon der Ausdruck „Entzündungsaltern", dass im alternden Menschen die sogenannten

angeborenen (entzündungsvermittelnden) Immunmechanismen fehlreguliert sind (Hajishengallis, 2010; Desai et al., 2010). Bereits die Funktion der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen, aus denen sämtliche Immunzellen hervorgehen, ist im Alter beeinträchtigt (Abb. 5).

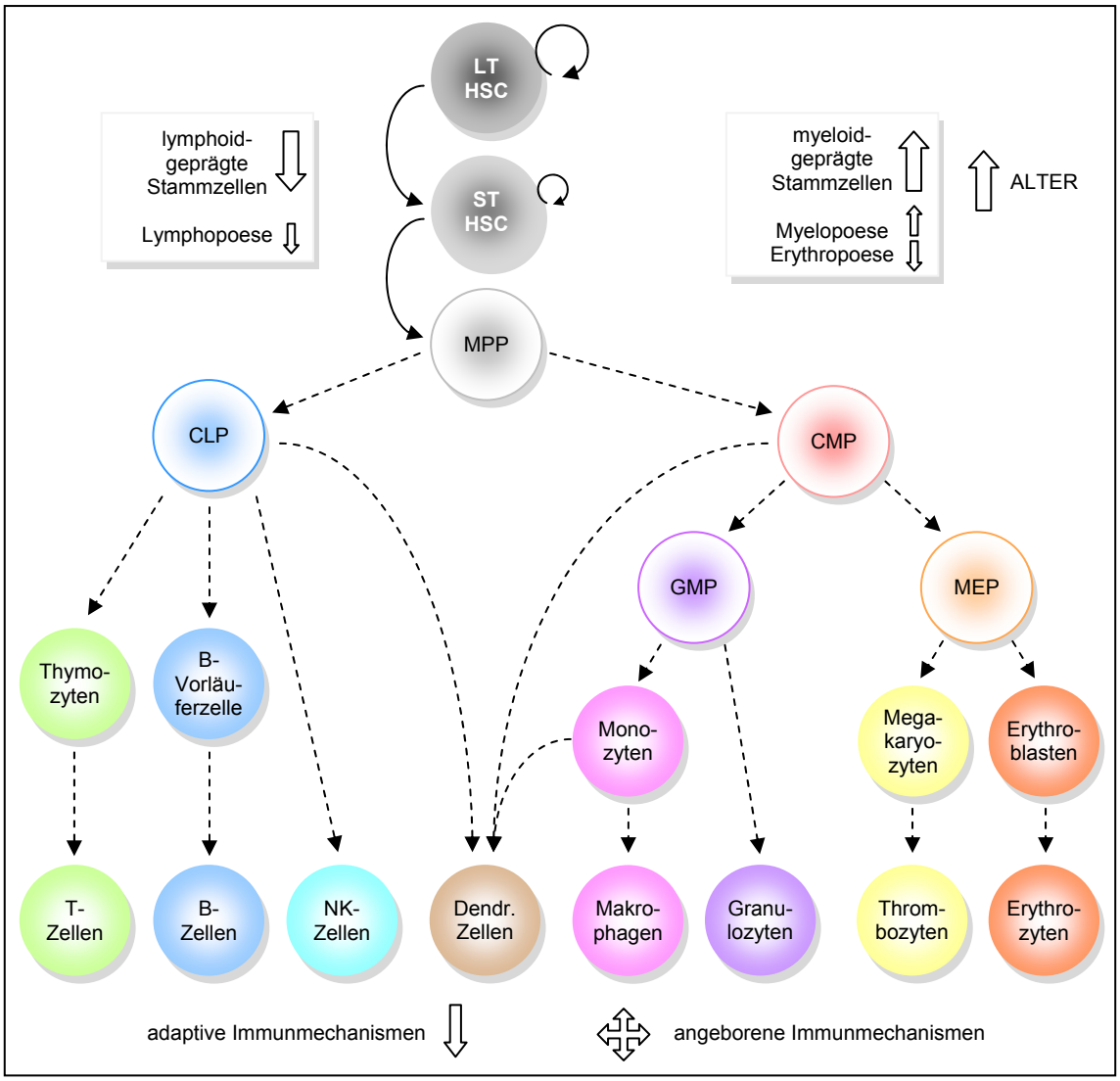

Abb. 5. Vereinfachtes Schema der Hämatopoese und Auswirkungen des Alterns. LT- und ST-HSC im Knochenmark haben mehr oder weniger Selbsterneuerungspotential (Kreispfeile) und bringen sich differenzierende Tochterzellen hervor (nach unten gerichtete Pfeile). Gestrichelte Pfeile symbolisieren, dass außer den hier dargestellten Zwischenstufen der Zellentwicklung noch weitere experimentell nachgewiesen wurden. *Die T-Zell-Reifung findet im Thymus statt (Thymozyten), Makrophagen entwickeln sich in Geweben aus im Blut zirkulierenden Monozyten, erst im Blut werden Thrombozyten von Megakaryozyten abgeschnürt und Erythrozyten entstehen aus ihren Vorläuferzellen. LT-, *long-term* und ST-HSC, *short-term hematopoetic stem cell*; MPP, *multipotent progenitor*; CLP, *common lymphoid* und CMP, *common myeloid progenitor*; MEP, *megakaryocyte/erythroid progenitor*; GMP, *granulocyte/macrophage progenitor*; NK, Natürliche Killerzellen. Nach Kondo et al., 2003 und Bryder et al., 2006.

Dabei wurde die Theorie der „Populationsalterung“ auf Grund der Akkumulation von DNS-Schäden hier von den Modellen der „Klonalen Selektion“ und der „Populationsverschiebung“ abgelöst. Diese Modelle gehen davon aus, dass nicht alle Stammzellen gleichmäßig proliferieren und dadurch altern, sondern der Anteil der funktionsfähigen und/oder lymphoid-geprägten Stammzellsubpopulation am Gesamtstammzellvorrat im Alter kleiner wird (Muller-Sieburg et al., 2004; Sharpless und DePinho, 2007; Warren und Rossi, 2009; Kawamoto et al., 2010; Rudolph et al., 2010). Die logische Konsequenz aus dieser Verschiebung ist eine verminderte Lymphopoese zugunsten einer erhöhten Myelopoese.
Nach dem derzeitigen Konzept der Entzündungsalterung hängt der generelle Anstieg in der Lebenserwartung über die letzten Dekaden mit der parallel gesunkenen lebenslangen Antigen-Belastung und damit Erkrankung an z.B. Atemwegsinfekten oder Enteritis zusammen (Finch und Crimmins, 2004). Ein Ort, an dem der Körper ständig mit Antigenen konfrontiert wird, ist der Darm, dessen Schleimhaut und Epithel eine mechanische Barriere gegen das Eindringen von Pathogenen bilden. Der Darm wird aber außerdem über das mukosale Immunsystem (*mucosa-associated lymphoid tissue*, MALT) mit Abwehrfunktion versorgt, die im Gesunden in Einklang mit den Darmbakterien funktioniert. Es gibt Hinweise darauf, dass der chronisch entzündliche Prozess der Alterung Einfluss auf die Zusammensetzung der Darmflora hat (Biagi et al., 2010) und umgekehrt (Guigoz et al., 2008). Änderungen in der Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota wurden in einigen chronisch-entzündlichen Krankheiten des Menschen gefunden, wie z.B. bei Zöliakie, Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa (Abt und Artis, 2009), wobei letztere auch mit Telomerverkürzung in Zusammenhang steht (siehe 1.3).

1.6. Altersbedingte Mangelernährung

Obwohl eine strukturelle intestinale Veränderung, wie sie mit massiver Krypten- und Villusatrophie in alternden Telomerase-defizienten Mäusen auftritt (Rudolph et al., 1999; Schätzlein et al., 2007), im menschlichen Darm im Rahmen der Alterung nicht (in dem Ausmaß) stattfindet (Lipski et al., 1992; Trbojević-Stanković et al., 2010), könnte die im Alter zu beobachtende Abnahme des Körpergewichts beim Menschen (Mowe et al., 1994; Dey et al., 1999) durchaus mit der altersbedingt veränderten Darmflora und daraus folgender gestörter Verdauung und Absorption zusammenhängen (Riepe et al., 1980; Parlesak et al., 2003; Drozdowski und Thomson, 2006).
Endokrinologische Faktoren spielen beim Ernährungszustand eine ebenso große Rolle. Drei Hormonsysteme, darunter die sogenannte somatotrope Achse, zeigen eine Vermin-

derung zirkulierender Hormonkonzentrationen während der normalen Alterung (Abb. 6; Lamberts et al., 1997). Der Name somatotrope Achse stammt vom Schlüsselhormon, dem Wachstumshormon (*growth hormone*, GH), das auch Somatotropin heißt. Das Wachstumshormon und dessen hauptsächlicher Vermittler, der Wachstumsfaktor IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*), sind die bestimmenden Faktoren somatischen Wachstums und der Aufrechterhaltung der strukturellen Körperzusammensetzung (Abb. 7).

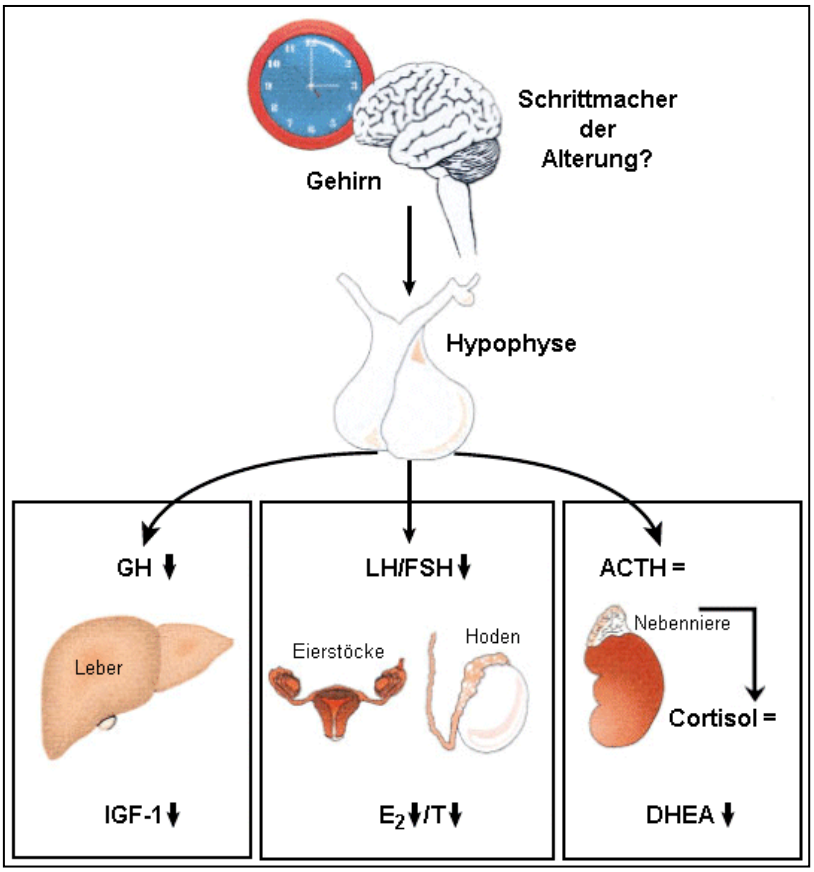

Abb. 6. Schematische Darstellung der Signalwege dreier Hormonsysteme, die eine altersbedingte Abnahme (↓) in der Menge zirkulierender Hormone zeigen. Die Somatotrope Achse mit GH (*growth hormone*) und IGF-1 (*insuline-like growth factor 1*) in der Somatopause. Die Gonadotropine LH (luteinisierendes Hormon), FSH (Follikel-stimulierendes Hormon) und E_2 (Estradiol) bzw. T (Testosteron) in der Meno- bzw. Andropause. ACTH (adreno-corticotropes Hormon), Cortisol und das in der Adrenopause abnehmende DHEA (Dehydroepiandrosteron). Übersetzt und ergänzt von Lamberts et al., 1997.

Die verminderte Wachstumshormonausschüttung im Alter verursacht einen akuten katabolen Zustand wie den Abbau oder die verminderte Synthese von Speicherfetten und Speicherkohlenhydraten (Glykogen) in der Leber bzw. im Fettgewebe. Eine Wachstumshormon-Ersatztherapie hingegen führt zur Zunahme der Muskelmasse und -stärke sowie der Knochenmasse in Wachstumshormon-defizienten Patienten. Hingegen

Wachstumshormon-defiziente Mäuse und Mäuse mit genetisch reduzierter IGF-1-Signaltransduktion zeigen eine verlängerte Lebenserwartung (Bartke, 2005).

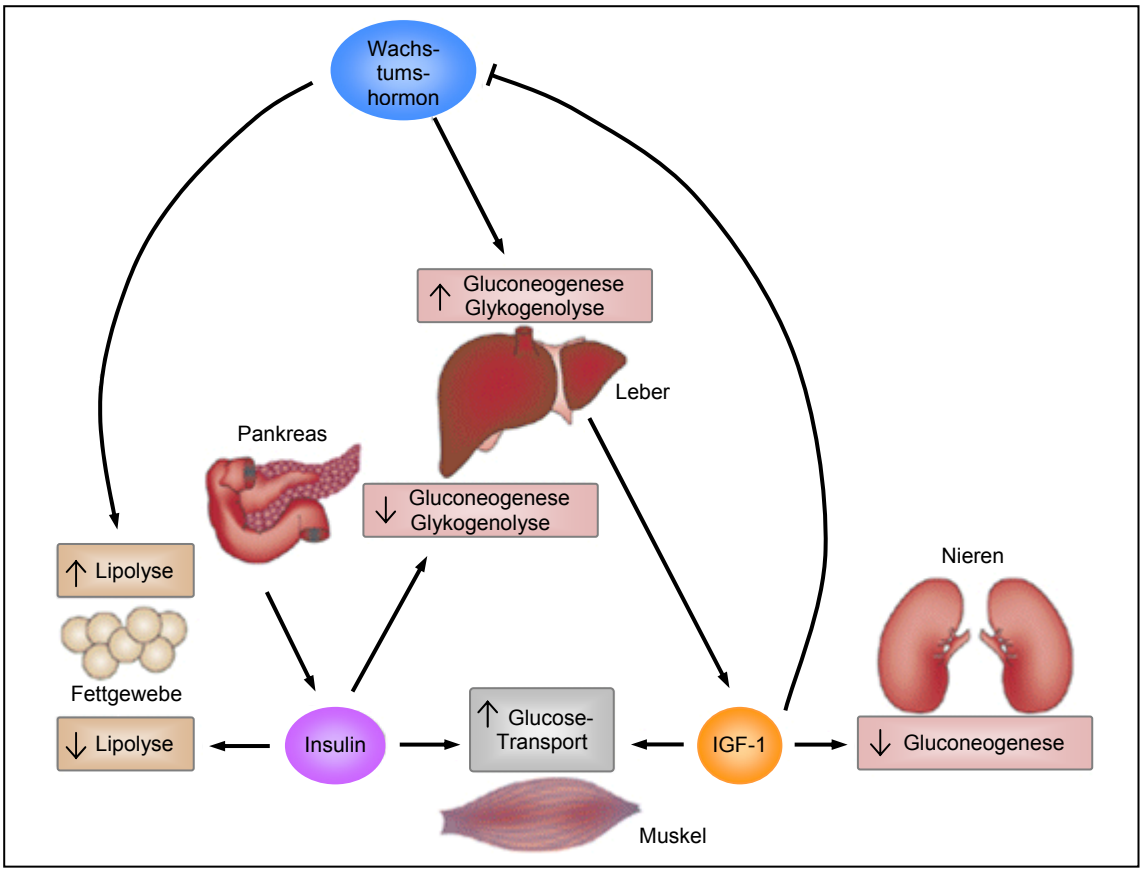

Abb. 7. Metabolische Funktionen von Wachstumshormon (GH, *growth hormone*) und IGF-1 (*insuline-like growth factor 1*). Wachstumshormon wirkt auf die Leber und dem vom Pankreas sezernierten Insulin bei der Inhibition der Gluconeogenese entgegen. Wachstumshormon wirkt auf das Fettgewebe und der Inhibition der Lipolyse durch Insulin entgegen. IGF-1 inhibiert die renale Gluconeogenese und die Wachstumshormon-Sekretion durch die Hypophyse. Über den IGF-1-Rezeptor unterstützt IGF-1 den Insulin-induzierten Glucose-Transport im Muskel. Übersetzt und ergänzt von Clemmons, 2007.

Kalorienrestriktion (nicht Mangelernährung), die über Insulin/IGF-1 und mTOR (*target of rapamycin*) wirkt, könnte ein Mechanismus sein, um die bei Mäusen lebensverlängernde Wirkung der Wachstumshormonreduktion zu erklären. Kalorienrestriktion führt insgesamt zu einer Verminderung des oxidativen Stoffwechsels und damit auch zu einer reduzierten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) in den Mitochondrien, was wiederum die Schädigung von DNS, Proteinen und Lipiden verringert. Allerdings hat Kalorienbeschränkung in Mäusen auch negative Auswirkungen auf die Immunfunktion und führt zu einer verschlechterten Wundheilung und Infektionsanfälligkeit (Lamberts et al., 1997; Bartke, 2005; Gredilla und Barja, 2005; Brown-Borg, 2007; Russel und Kahn, 2007; Fontana et al., 2010).

Immunsystem und (neuro)endokrines System sind über die Wechselwirkung ihrer Mediatoren, der Zytokine bzw. der Hormone, eng miteinander verbunden. So haben Hormone anti-inflammatorische Eigenschaften auf Zellen des angeborenen Immunsystems, pro-inflammatorische Zytokine können wiederum zu Hormonresistenz führen. Die pro-inflammatorischen Zytokine Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNFα), Interleukin (IL)-1 und IL-6 sind nachgewiesene Mediatoren der hepatischen Wachstumshormonresistenz, die sich primär durch erhöhte Wachstumshormonlevel bei gleichzeitiger Reduktion von in der Leber produziertem IGF-1 äußert (Lang et al., 2005; O'Connor et al., 2008).

1.7. Untersuchung molekularer Mechanismen telomerlängenabhängiger Alterung: das Kandidatenmolekül MK2

Durch das Ausschalten bestimmter Signalwege bzw. einzelner Signalwegkomponenten kann deren Funktion bestimmt werden. So führte die Deletion von p21 als Schlüsselmolekül der DNS-Schädigungssignalkaskade oder von Exonuklease-1 als Bestandteil der DNS-*Mismatch*-Reparatur (MMR) zu einer Verlängerung der Lebensspanne und Verbesserung der Organhomöostase in Telomerase-defizienten Mäusen (Choudhury et al., 2007; Schätzlein et al., 2007). Mit dem Darm-spezifischen Ausschalten von p53 in Telomerase-defizienten Mäusen konnte außerdem gezeigt werden, dass die Entfernung chromosomal instabiler intestinaler Stammzellen aus dem Darmgewebe für dessen Funktion unbedingt notwendig ist (Begus-Nahrmann et al., 2009).

Ein Molekül, das bei jedem der oben beschriebenen Telomerase-Knockout-Alterungssymptome eine Rolle spielen könnte, ist die Serin-Threonin-Kinase Mitogen-aktivierte Proteinkinase-aktivierte Proteinkinase 2 (MAPKAPK2, MK2). MK2 ist direktes Zielprotein der Stress-aktivierten MAP-Kinase p38α/β im Stresskinasesignalweg, der durch Wachstumsfaktoren, Zytokine, UV-Strahlung, Hyperosmolarität und Hitze aktiviert wird. MK2 hat selbst sowohl zytoplasmatische als auch nukleäre Zielmoleküle wie z.B. *Heat Shock*-Protein 25/27, Tyrosinhydroxylase, 5-Lipoxygenase und Glykogensynthase bzw. die Transkriptionsfaktoren *Serum Response*-Faktor (SRF), E47, ER81 der ETS-Familie und *cAMP response element-binding protein* (CREB; Roux und Blenis, 2004; Gaestel, 2006). MK2 wiederum beeinflusst auch p38: p38 wird durch die Interaktion mit MK2 stabilisiert (Kotlyarov et al., 2002; Yannoni et al., 2004) und im Komplex über das *Nuclear Export Signal* von MK2 aus dem Zellkern exportiert (Abb. 8; Ben-Levy et al., 1998; Gong et al., 2010). P38 selbst hat ebenfalls sowohl nukleäre als auch zytoplasmatische Zielfaktoren wie z.B. die Transkriptionsfaktoren ATF2 (*activating transcription factor*

2), C/EBPβ (*CAAT-enhancer binding protein beta*) und STAT4 (*signal transducers and activators of transcription 4*) bzw. neben MK2 noch weitere Kinasen wie z.B. PRAK (*p38 regulated/activated kinase*, auch MK5 genannt), MKS1/2 (*mitogen- and stress-activated kinase 1 and 2*) und die mit MK2 kooperierende MK3 (MAPKAPK3; Dodeller und Schulze-Koops, 2006).

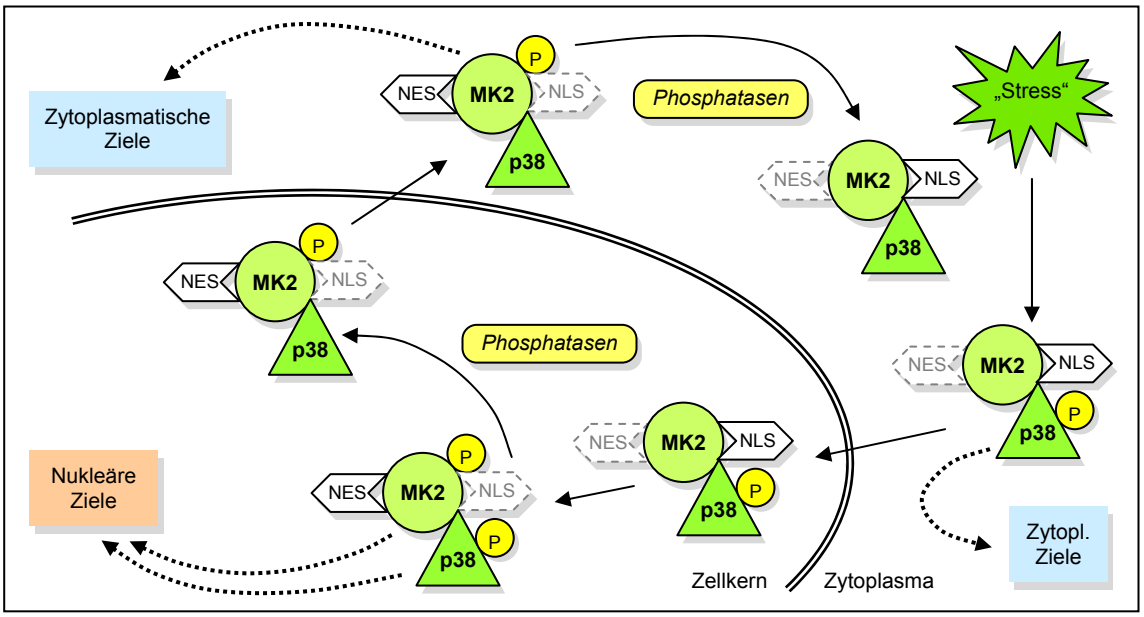

Abb. 8. P38/MK2-Interaktion. Die Aktivierung der Stresskinasekaskade führt zur Phosphorylierung und Aktivierung von p38. Über das NLS (*Nuclear Localization Signal*) von MK2 wird der p38/MK2-Komplex in den Zellkern gebracht. P38 phosphoryliert MK2 und induziert dadurch eine Konformationsänderung in MK2, die zur Maskierung des NLS und zur Aufdeckung des NES (*Nuclear Export Signal*) führt, über welches der Komplex wieder ins Zytoplasma wechselt. Nach Ben-Levy et al., 1998 und Gong et al., 2010.

MK2 reguliert Zytokine wie Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNFα), Interferon gamma (IFNγ), und die Interleukine 1, 6 und 8, wobei die Regulation für einige Faktoren nachgewiesenermaßen auf Ebene der mRNS-Stabilität oder der Translation stattfindet (Kotlyarov et al., 1999; Winzen et al., 1999; Neininger et al., 2002; Hitti et al., 2006; Ronkina et al., 2007). P38 scheint auch eine Rolle bei der Sekretion von G-CSF zu spielen – über die Aktivierung von MK2 oder nicht, ist nicht bekannt (Rausch und Marshall, 1999; Yamanishi et al., 2007). Über die Regulation von Zytokinen und nachgeschalteter Prozesse wie z.B. der Aktivierung von Makrophagen, ist MK2 auch in entzündlichen Krankheiten wie Morbus Crohn, Psoriasis, rheumatoider Arthritis und Arteriosklerose beschrieben worden (Kontoyiannis et al., 2002; Johansen et al., 2006; Hegen et al., 2006; Jagavelu et al., 2007). Ein Schlüsselenzym in der Leukotrienbiosynthese, 5-Lipoxygenase, wird *in vitro* durch MK2 phosphoryliert und zwar abhängig von der Anwesenheit ungesättigter Fettsäuren, aus denen

Leukotriene – inflammatorische Mediatoren – aufgebaut sind (Werz et al., 2000; Werz et al., 2002). MK2 phosphoryliert und aktiviert auch die Tyrosinhydroxylase, die für den einleitenden Schritt in der Synthese der Katecholamine Dopamin, Adrenalin und Noradrenalin im Nebennierenmark verantwortlich ist (Thomas et al., 1997; Toska et al., 2002). Außerdem ist MK2 zusammen mit seinem Zielprotein *Heat Shock*-Protein 25/27 für die Dauer des *Nuclear Factor Kappa B* (NFκB)-Signals bei einer lokalen Atemwegsinfektion verantwortlich (Gorska et al., 2007) und wirkt neben der *Extracellular Signal-regulated*-Kinase (ERK) in der *Toll like*-Rezeptor-induzierten Endozytose in dendritischen Zellen (Zaru et al., 2007; Dong et al., 2002).

Die durch ERK aktivierte MK2-Synthese ist auch für die Osteogenese unerlässlich (San Miguel et al., 2005). P38 spielt außerdem bei der Erythrozytendifferenzierung eine Rolle (Tamura et al., 2000; Uddin et al., 2004) und begrenzt als Mediator reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) eventuell durch direkte Interaktion von MK2 mit $p66^{ShcA}$ die Lebensdauer hämatopoetischer Stammzellen (Yannoni et al., 2004; Ito et al., 2006). Über die Interaktion von MK2 mit Proteinen der *Polycomb*-Gruppe wie HPH2, kontrolliert die p38-Signalkaskade aber auch die Fähigkeit hämatopoetischer Stammzellen sich selbst zu erneuern (Schwermann et al., 2009).

In *Drosophila melanogaster* wurde in einer genomweiten Erfassung von Proteinkinasen, die für das Fortschreiten des Zellzyklus benötigt werden, auch MK2 gefunden, welches hier bei Stilllegung durch RNAi für Spindelabnormalitäten und Chromosomen-Ausrichtungsdefekte verantwortlich war (Bettencourt-Dias et al., 2004). Später wurde MK2 als Kontrollpunkt-Kinase identifiziert, die neben den *Checkpoint*-Kinasen 1 und 2 (Chk1 und Chk2) DNS-Schädigungssignale und Zellzyklus-Arrest in Säugerzellen steuert, indem sie Cdc25 (*Cell division cycle 25*) phosphoryliert (Abb. 3; Manke et al., 2005). Außerdem ist MK2 für die Phosphorylierung des negativen Regulatorproteins der p53-Stabilität Mdm2 (*murine double minute 2*) zuständig und somit an Ausmaß und Dauer einer p53-abhängigen DNS-Schädigungsantwort beteiligt (Weber et al., 2005). P53-defiziente Zellen sind bei der Erhaltung ihrer genomischen Stabilität, also dem Überleben nach Zellzyklusarrest, sogar auf den Zellzykluskontrollsignalweg über MK2 angewiesen (Reinhardt et al., 2007). Die kleine GTPase RhoA und ihr GEF (*Guanine nucleotide exchange factor*) Net1, die an der Ausbildung von Stressfasern nach DNS-Schädigung beteiligt sind, aktivieren den p38/MK2-Signalweg und beeinflussen darüber das Überleben DNS-geschädigter Zellen (Guerra et al., 2008; Gaestel, 2006; Thornton und Rincon, 2009; Reinhardt und Yaffe, 2009). Kürzlich wurde auch gezeigt, dass p38 in Antwort auf

DNS-Schädigung im Zellkern akkumuliert und somit die Voraussetzung für einen p38/MK2-vermittelten Zellzyklusarrest schafft (Wood et al., 2009).

Das Werner-Syndrom, eine seltene Krankheit mit frühzeitiger Alterung, wird durch einen Defekt im Werner-Protein hervorgerufen, einer RecQ-Helikase mit Exonuklease-Aktivität. Die vorzeitig eintretende zelluläre Seneszenz in kultivierten Werner-Syndrom-Fibroblasten wird wahrscheinlich durch die (Replikations-)Stress-induzierte p38/MK2-Kinasekaskade vermittelt, da die p38-abhängige Stabilisierung von p21 mit Zellzyklusarrest sowie die Aktivierung von MK2 und Hsp27 durch selektive p38-Inhibitoren verhindert werden können (Bagley et al., 2010).

Neben der Regulation vieler Zytokine und anderer Mediatoren, der Beteiligung an der Hämatopoese und an entzündlichen Krankheiten sowie der Mitwirkung in der DNS-Schädigungssignalkaskade und am Zellzyklusarrest, könnte MK2 auch im Glucose- und Lipid-Metabolismus eine Rolle spielen. In ihrer Funktion als Kinase der Tyrosinhydroxylase hat MK2 Einfluss auf die Biosynthese der Katecholamine, die wiederum auf metabolische Prozesse wie die Glykogenolyse, die Gluconeogenese und die Lipolyse wirken. Der p38-Signalweg wird in glatten Aortamuskelzellen und Nierenzellen durch Hyperglykämie (Überzuckerung z.B. in Diabetes) aktiviert (Igarashi et al., 1999; Wilmer et al., 2001; Kang et al., 2001), nicht aber in Skelettmuskelzellen (Kawano et al., 2001). Dabei ist die insulinstimulierte Aktivierung des Glucosetransporters GLUT4 zumindest in Muskelzellen nicht vom p38-Signalweg abhängig, obwohl die Aktivierung von p38 eine gesteigerte Insulinsensitivität des Glucosetransports zur Folge hat (Antonescu et al., 2005; Geiger et al., 2005). Im Gegensatz zu den *in vitro*-Studien mit Inhibitoren und Stimulatoren von p38α/β, zeigten Studien an Knockout-Mäusen jedoch keinen Einfluss der p38-Beta-Isoform auf die insulinstimulierte Glucoseaufnahme in Muskel- und Fettzellen (Turban et al., 2005). In diabetischen Mäusen mit hohen Blutzuckerspiegeln konnte eine vermehrte Phosphorylierung des MK2-Zielproteins Hsp25 nachgewiesen werden, die in diabetischen MK2-Knockout-Mäusen nicht auftrat. Allerdings hatte die Blockade des MK2/Hsp25-Signalweges keinen Einfluss auf die Entstehung der diabetischen Nephropathie (Park et al., 2008). Mäuse, in denen p38 chemisch oder auf RNS-Ebene inhibiert worden war, zeigten reduzierte Hunger-Blutzukkerspiegel, was auf eine unterdrückte Gluconeogenese in der Leber zurückzuführen war (neben der Aufnahme der nahrungsentstammenden Glucose aus dem Blut ins Gewebe ein weiterer Mechanismus der Glucosehomöostase im Blut). Über die Interaktion mit C/EBP (*CAAT-enhancer binding protein*) und dem CREB (*cAMP response element*

binding)-Protein fördert p38 die hepatische und renale Gluconeogenese durch die Stimulation der Transkription von Schlüsselenzymen wie PEP-CK (Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase) und G6Pase (Glucose-6-Phosphatase; Liu und Cao, 2009). Die Aktivierung der p38/MK2-Signalkaskade könnte außerdem die Konversion von Glucose zu Glykogen verhindern, da eine einleitende Phosphorylierung der Glykogensynthase durch p38 gezeigt wurde (Kuma et al., 2004) und weitere, inaktivierende Phosphorylierung(en) durch MK2 (Stokoe et al., 1992). Die p38-verursachte Hemmung der Lipogenese (Xiong et al., 2007) und Stimulierung der Fettsäure-Betaoxidation (Barger et al., 2001; Wu et al., 2006) führte zu verminderter Lipidakkumulation in der Leber. Zusammengenommen wird durch die p38/MK2-Signaltransduktion der katabole Metabolismus unterstützt (Liu und Cao, 2009).

1.8. Zielstellung

Die bisherige Forschung an MAPKAPK2 zeigt, dass diese Kinase Einfluss auf viele Signalwege hat, die in der Alterung eine Rolle spielen. Bis heute gibt es jedoch keine Studie, welche die Bedeutung von MK2 bei der Alterung beschreibt. Ziel dieser Arbeit war deshalb die Untersuchung des Einflusses der ausgeschalteten MAPKAP-Kinase 2 (MK2) auf frühzeitige Alterung bedingt durch Telomerverkürzung im Mausmodell des Telomerase- und *MK2*-Doppelknockouts (Blasco et al., 1997 und Rudolph et al., 1999; Kotlyarov et al., 1999; siehe 2.1). Besonderes Augenmerk lag hierbei auf der Analyse der in Telomerase-Knockout-Mäusen alterungsbedingt auftretenden Phänotypen der Atrophie des Darmepithels, des Hunger-Metabolismus sowie der zu myeloiden Zellen hin verschobenen Hämatopoese und der veränderten Zytokinsekretion.

2. Material und Methoden

2.1. Mausstämme

Telomerase-heterozygote Mäuse wurden mit *MK2*-heterozygoten Mäusen gekreuzt, um doppelt-heterozygote Tiere zu generieren. Diese wurden anschließend durch drei Generationen der Telomerase-Defizienz gekreuzt, um Kohorten mit folgenden Genotypen zu erhalten:

G3 $mTerc^{-/-}$ $MK2^{+/+}$, G3 $mTerc^{-/-}$ $MK2^{+/-}$, G3 $mTerc^{-/-}$ $MK2^{-/-}$.

Aus Verpaarungen von Wildtypmäusen mit *MK2*-heterozygoten Tieren entstanden die Kontrollkohorten mit folgenden Genotypen:

$mTerc^{+/+}$ $MK2^{+/+}$, $mTerc^{+/+}$ $MK2^{+/-}$, $mTerc^{+/+}$ $MK2^{-/-}$.

Die Telomerase-Aktivität in der Maus wurde bei Vorhandensein immer mit $mTerc^{+/+}$ bezeichnet, bei Fehlen mit $mTerc^{-/-}$ beschrieben, wobei das kleine m für Maus steht – im Gegensatz zum menschlichen *TERC*(-Gen).

Für Transplantationsexperimente wurden kongene CD45.1$^{+/+}$ und CD45.1^{+}/CD45.2^{+} (heterozygote) Mäuse als kompetitive Spender beziehungsweise Transplantatempfänger benutzt. Wildtyp-, Telomerase-defiziente und *MK2*-defiziente Mäuse exprimieren das CD45.2-Allel in ihren weißen Blutzellen und lassen sich so von Konkurrenzspender- und Empfängerzellen unterscheiden. CD45.1-Mäuse (B6.SJL-*Ptprc*^{a} *Pepc*^{b}/BoyJ, The Jackson Laboratory) wurden mit Wildtypmäusen gekreuzt, um CD45.1^{+}/CD45.2^{+} Tiere zu erhalten.

Alle Mäuse waren im C57BL/6J-Hintergrund. Die Tiere wurden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen im Zentralen Tierlabor und Institut für Versuchstierkunde der Medizinischen Hochschule Hannover und im Tierforschungszentrum der Universität Ulm gezüchtet und gehalten.

Wenn nicht anders im Text erwähnt, wurden die Tiere in einem Alter zwischen 14 und 16 Monaten beziehungsweise nachdem sie an Körpergewicht verloren hatten analysiert.

Alle tierexperimentellen Methoden wurden unter Berücksichtigung der im Tierschutzgesetz verankerten Richtlinien durchgeführt und waren von den Landesregierungen Niedersachsen und Baden-Württemberg genehmigt.

2.2. Genotypisierung

Die PCR-basierte Genotypisierung der gezüchteten Mäuse erfolgte auf genomischer DNS, die mittels Salzfällung aus Schwanz- oder Leberbiopsielysaten isoliert wurde (ini-

tiale und terminale Genotypisierung, siehe 2.15). In beiden PCRs, für das Telomerase- und das *MK2*-Gen, wurde in einem Ansatz je ein Amplifikationsprodukt für das Wildtyp-Allel und eins für das Knockout-Allel gebildet. Folgende Primer, Reaktionsmixe und PCR-*Cycler*-Programme wurden benutzt:

MK2-PCR

```
Primer MK2F 5′-CGT GGG GGT GGG GTG ACA TGC TGG TTG AC-3′
Primer MK2R 5′-GGT GTC ACC TTG ACA TCC CGG TGA G-3′
Primer NeoF 5′-TGC TCG CTC GAT GCG ATG TTT CGC-3′
```

Binden NeoF- und MK2R-Primer, erhält man ein 800 bp-großes Fragment für das Knockout-Allel. Binden MK2F- und MK2R-Primer, erhält man ein 500 bp-großes Fragment für das Wildtyp-Allel (Abb. 9).

Pro Probe bestand der Reaktionsmix aus 11,6 µl steril-filtriertem Wasser, 5 µl 5-fachem GoTaq Flexi-Reaktionspuffer und 2,5 µl 25 mM $MgCl_2$ (Promega), 1,8 µl Primer-Mix (9 pmol pro Primer, Synthese durch biomers.net), 2 µl dNTP-Mix (2,5 mM pro dNTP, Bioline), 0,1 µl GoTaq-Polymerase (5 U/µl, Promega) und 2 µl genomischer DNS (ca. 100 ng) oder Wasser als Kontrolle. Der Reaktionsablauf erfolgte mit 95°C für eine Minute, dann 35 Zyklen bestehend aus 1. 96°C für eine Minute, 2. 59°C für eine Minute, 3. 72°C für eine Minute, abschließend 72°C für 5 Minuten.

mTerc-PCR

```
Primer mTR-R      5′-TTC TGA CCA CCA CCA ACT TCA AT-3′
Primer mTR-WT-F   5′-CTA AGC CGG CAC TCC TTA CAA G-3′
Primer 5PPgK(-F) 5′-GGG GCT GCT AAA GCG CAT-3′
```

Binden 5PPgK(-F) und mTR-R-Primer, erhält man ein 180 bp-großes Fragment für das Knockout-Allel. Binden mTR-WT-F und mTR-R-Primer, erhält man ein 250 bp-großes Fragment für das Wildtyp-Allel (Abb. 10).

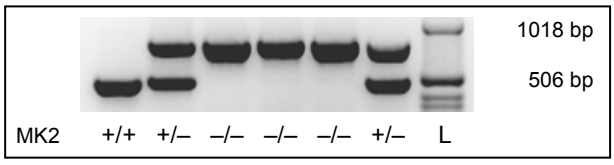

Abb. 9. Ergebnis einer Genotypisierungs-PCR mit *MK2*-Knockout- und Wildtyp-Allel-spezifischen Primern (L, *ladder*).

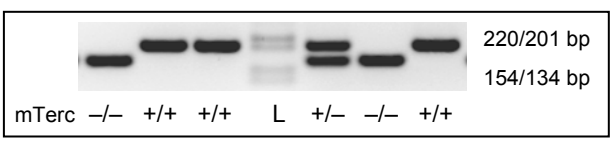

Abb. 10. Ergebnis einer Genotypisierungs-PCR mit mTerc-Knockout- und Wildtyp-Allel-spezifischen Primern (L, *ladder*).

Pro Probe bestand der Reaktionsmix aus 9,9 µl steril-filtriertem Wasser, 5 µl 5-fachem GoTaq Flexi-Reaktionspuffer und 3 µl 25 mM $MgCl_2$, 1 µl pro Primer (10 pmol), 2 µl

dNTP-Mix, 0,1 µl GoTaq-Polymerase und 2 µl genomischer DNS oder Wasser als Kontrolle. Der Reaktionsablauf erfolgte mit 95°C für 10 Minuten, dann 28 Zyklen bestehend aus 1. 94°C für eine Minute, 2. 55°C für eine Minute, 3. 72°C für eine Minute, abschließend 72°C für 6 Minuten.

Die PCR-Reaktionen wurden in Ethidiumbromid (Sigma Aldrich) enthaltenden Agarosegelen in horizontalen Elektrophoresekammern (Sub-Cell System, Bio-Rad) analysiert, wobei die Konzentration der Agarose (SeaKem LE Agarose, Lonza) für die relativ kleinen DNS-Fragmente der Telomerase-PCR bei 2% lag, für die *MK2*-PCR-Produkte wurde mit 1,5% Agarose in TBE gearbeitet. Ein Glycerol-basierter Ladepuffer sowie die Migrationskontrollfarben Xylencyanol und Orange G waren bereits im Reaktionspuffer enthalten. Zum Abgleich der Basenpaarlängen der Fragmente lief in jedem Gel ein Größenstandard mit (1 Kb DNA *ladder*, Invitrogen). Die Ethidiumbromidfluoreszenz wurde durch UV-Licht angeregt und mittels Software dokumentiert (Infinity-Geldokumentationssystem und Vision-Capt Software, Vilber Lourmat).

2.3. Diäten

Normale Diät = Experimentalfuttermittel für Ratten und Mäuse (ssniff E15000-04, EF R/M Kontrolle: umsetzbare Energie 15,4 MJ/kg: 61% Kohlenhydrate (46,8% Stärke, 10,8% Zucker), 30% Proteine, 9% Fette). Glucosereiche Diät = Experimentalfuttermittel für Ratten und Mäuse, zuckerreich (ssniff E15629-34, EF R/M glucosereich: umsetzbare Energie 15,9 MJ/kg: 67% Kohlenhydrate (> 50% Glucose, > 12% Oligosaccharide/ Dextrine), 27% Proteine, 6% Fette).

2.4. Gewichts- und Überlebenskurven

Telomerase-defiziente Mäuse wurden ab einem Alter von 6 Monaten aller ein bis zwei Wochen gewogen, Wildtyp- und MK2-defiziente Mäuse aller vier Wochen. Der prozentuale Gewichtsverlust wurde über einen Zeitraum mit stabilem Körpergewicht berechnet und in Gewichtskurven über einen Zeitraum von 14 Monaten dargestellt. Das Alter der Tiere zu den jeweiligen Wiegezeitpunkten wurde hierfür in Gruppen eingeteilt, die jeweils einen Monat umfasste. Mäuse, die ≥20% ihres Körpergewichts verloren hatten und/oder starke Mobilitätseinschränkungen zeigten, wurden für die Überlebenskurven (Kaplan-Meier) als tot gezählt.

2.5. Blutzuckermessung und Glucose-Toleranztest

Der Blutzuckerspiegel der Tiere wurde mittels Glucometer und Schnellteststreifen (OneTouch Ultra, LifeScan) an Blut der hinteren Hohlvene oder des retrobulbären Sinus gemessen. Glucose-Toleranztests wurden nach einer sechzehnstündigen Fastenzeit (über Nacht) durch intraperitoneale Glucose-Injektion (2 g D-Glucose pro kg Körpergewicht, 20% Glucose in 0,9% NaCl) durchgeführt. Vor der Injektion zum Zeitpunkt 0 und 15, 30, 60 und 120 Minuten nach der Injektion wurde der Schwanz mit einem Skalpell angeritzt und der aus der lateralen Schwanzvene hervorquellende Bluttropfen direkt auf den Blutzucker-Teststreifen aufgebracht.

2.6. γ-Bestrahlung

Vor einer Transplantation wurden die Empfängertiere in einem Gammacell® 40 Exactor (*Low Dose-Rate*)-Irradiator von MDS Nordion mit einer Einmaldosis von 12 Gy bestrahlt. Dieser Dosiswert war in einem initialen Experiment für die Bestrahlung von Mäusen in einer autoklavierbaren Metallbox optimiert worden, wobei die 12 Gy-Einzeldosis eine maximale Überlebensrate bei minimaler Zahl verbleibender Empfängertier-Zellen und minimalem Stress für die Empfängertiere bot (Abb. 11, *Gating* siehe Abb. 17). Die Strahlungsquelle war Caesium^{137}.

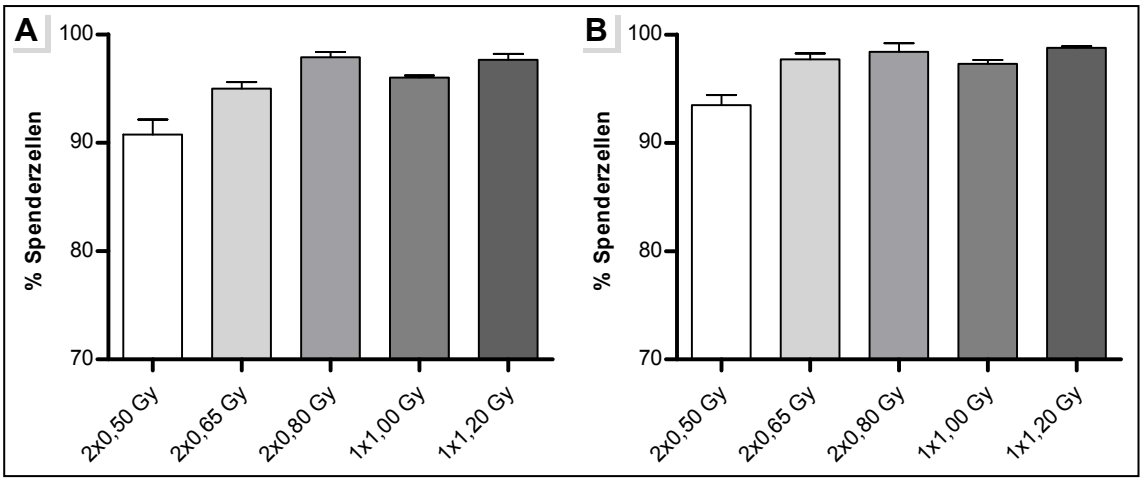

Abb. 11. Prozentualer Anteil Spenderzellen (CD45.1$^+$/Ly5.1$^+$) an den weißen Blutzellen des Empfängertiers (CD45.2$^+$/Ly5.2$^+$, siehe 2.7) einen (links) und drei (rechts) Monate nach Knochenmarkstransplantion in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis (Gy, Gray).

2.7. Transplantationen

Unfraktioniertes Spender-Knochenmark (CD45.2) wurde mit Knochenmark eines Konkurrenzspenders (CD45.1) in einem Verhältnis von 3:2 ($9•10^5$ und $6•10^5$ Zellen)

gemischt und unter Kurzzeitinhalationsnarkose (Isofluran, Baxter) in den Blutkreislauf von 2 bis 4 Monate alten letal-bestrahlten Empfängermäusen (CD45.1/CD45.2) injiziert. Die letale Dosis lag hier bei einmaligen 12 Gy, da die Tiere in einer autoklavierbaren Metallbox bestrahlt wurden. Die Überlebensrate lag bei 100%. In vier unabhängigen Experimenten wurde Knochenmark von 4 Spendern pro Genotyp in je drei Empfängertiere transplantiert.

Welchen Beitrag die Stammzellen des jeweiligen transplantierten Knochenmarks zur Repopulation des Blutsystems der Empfängertiere hatte, sowie auf den Beitrag überlebender Rezipientenzellen wurde bei der durchflusszytometrischen Chimerismus-Analyse im peripheren Blut 1, 3 und 6 Monate nach der Transplantation kontrolliert (*Gating* siehe Abb. 17). Hierbei konnten unter den CD45.1/CD45.2-Zellen keine B- oder myeloiden Zellen gefunden werden, sondern nur CD3-positive T-Zellen (unter 3% aller lebenden weißen Blutzellen), sodass davon ausgegangen werden kann, dass nur transplantierte Stammzellen zur Repopulation des hämatopoetischen Systems der Empfängertiere beitrugen – die T-Zellen waren nur Überlebende des Empfängertiers.

2.8. Nekropsie der Mäuse und Organentnahme

Die Mäuse wurden durch Inhalation von Kohlendioxid (> 80% CO_2) tief narkotisiert (Zwischenzehenreflextest) und anschließend durch Eröffnung des Brustraumes oberhalb des Zwerchfells getötet.

Nach der Blutentnahme aus der hinteren Hohlvene (Vena cava posterior) mittels einer EDTA-gespülten Spritze wurden folgende Organe entnommen: Hoden beziehungsweise Ovarien inklusive anhängender Drüsen und Gänge, Pankreas, Milz, Darm inklusive mesenteriale Lymphknoten (falls vergrößert), alle Leberlappen, Nieren inklusive Nebennieren, Viszeralfett sofern vorhanden, Beinmuskeln, Beinknochen, Thymus sofern vorhanden, Herz, Lunge und Gehirn.

Von dem frisch entnommenen Blut wurde mittels eines Blutanalysegerätes (scil Vet abc, scil animal care company) ein Blutbild erstellt und mittels Glucometer und Schnellteststreifen (OneTouch Ultra, LifeScan) der basale Blutzuckerspiegel bestimmt. Blutplasma wurde durch Sedimentation der zellulären Blutbestandteile gewonnen, aus welchen dann durch Erythrozytenlyse die Leukozyten isoliert wurden.

Bei paarig vorkommenden Organen wurde jeweils eines auf Trockeneis schockgefroren (spätere Lagerung bei -80°C), während das zweite über Nacht bei 4°C in FA fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet wurde. Alle anderen Organe wurden dafür in zwei

Hälften geschnitten. Von der Milz wurde ein dritter Teil und außerdem das komplette Beinknochenmark für durchflusszytometrischen Analysen in kaltes PBS überführt.

2.9. Einbetten der Organe

Das Einbetten FA-fixierter Organe erfolgte automatisch im Einbettautomaten (STP 120 Spin) nach folgendem Protokoll:

- aufsteigende Alkoholreihe aus 50%, 70%, 80%, 90%, 100% Ethanol für je 2 Stunden,
- 3malige Inkubation in Xylol für je 2 Stunden,
- 3malige Inkubation in ca. 60°C-warmem Paraffin für je 2 Stunden.

Direkt nach der Entnahme aus dem Einbettautomaten erfolgte das Ausgießen in Blöcke an einer Ausgießstation (Microm EC 350).

2.10. Durchflusszytometrie

Knochenmarkszellen wurden durch Spülen der Ober- und Unterschenkelknochen mit PBS isoliert, Milzzellen durch Zerreiben des Organs auf einem Sieb (70 µm BD Falcon™ Cell Strainer, Becton Dickinson). Blut wurde entweder unter Kurzzeitinhalationsnarkose (Isofluran, Baxter) durch Punktion des retrobulbären Sinus mit einer Kalium-EDTA-Kapillare (Sarstedt) oder durch postmortale Entnahme aus der hinteren Hohlvene (Vena cava posterior) mittels einer EDTA-gespülten Spritze entnommen.
Erythrozyten wurden mit einem Ammoniumchlorid-basierten Puffer (siehe 2.15) lysiert. Danach wurden Milz- und Knochenmarkszellen mit einem Vi-CELL-Analyzer (Beckman Coulter), Blutzellen in der Neubauer-Kammer gezählt.
Untersuchung von Oberflächenantigenen. Vor der Inkubation mit Fluorochrom-markierten Antikörpern gegen oberflächliche oder intrazelluläre Antigene wurden unter anderem die auf den Zellen exprimierten Fc-Rezeptoren mit einem proteinhaltigen Färbepuffer geblockt (PBS, 2% FBS, 2 mM EDTA).
Bei Färbungen, die biotinylierte Antikörper beinhalteten, wurden die Zellen zuerst nur mit diesen allein für ca. 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach einem Waschschritt mit Färbepuffer wurden die Zellen dann mit Antikörper-Mastermixen inkubiert, die ggf. auch das Fluorochrom-markierte Streptavidin enthielten. Hierbei lag die Inkubationsdauer zwischen 30 und 60 Minuten bei 4°C im Dunkeln, der anti-CD34-Antikörper hingegen benötigte eine mindestens zweistündige Inkubation.

Da Stammzellen eine sehr kleine Population darstellen, müssen zu deren Sichtbarmachung terminal differenzierte Zellen ausgeschlossen werden, was über gesamtlinienspezifische Antikörper möglich ist. Diese Antikörper müssen wiederum in einem Mix zusammengefasst werden, da kein Analysegerät genügend Kanäle für Einzelfärbungen aller hierfür benötigten Marker besitzt. Der hier verwendete Linien-Markermix [Lin] bestand aus primär mit APC markierten anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 (T-Zell-Linie, je 0,2 mg/ml und 1:500), anti-B220 (B-Zell-Linie, 0,2 mg/ml, 1:250), anti-CD11b (Myeloide Zellen, 0,2 mg/ml, 1:250), anti-Gr1 (Granulozyten, 0,2 mg/ml, 1:125) und anti-Ter119 (Erythrozytenvorläuferzellen, 0,2 mg/ml, 1:125) Antikörpern in Färbepuffer.

Tabelle 1. Antikörperkombinationen zur Analyse von Oberflächenmarkern in Blut, Milz, Knochenmark.

Fluoro-chrom	Pacific Blue / eFluor450‡	FITC / Alexa 488	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC / Alexa 647	APC-Cy7 / -Alexa 750 /-eFlour780‡
Laser	405 nm	488 nm	488 nm	488 nm	488 nm	633 nm	633 nm
Filter	450/50	530/30	575/25	695/40	780/60	660/20	780/60
I)	– nur MZ: F4/80‡ 0,2 mg/ml 1:250	– Gr1‡ 0,5 mg/ml 1:500	– B220† 0,2 mg/ml 1:500	– CD8† 0,2 mg/ml 1:500	Antigen → Originalkonzentration → Verdünnung → CD11b† 0,2 mg/ml 1:500	CD11c† 0,2 mg/ml 1:500	CD115-Bio‡ 0,5 mg/ml 1:250 SA‡ 0,2 mg/ml 1:300
II)	CD11b-Bio‡ 0,5 mg/ml 1:250 SA‡ 0,2 mg/ml 1:300	– CD8† 0,5 mg/ml 1:500	– nur MZ und KM: CD71‡ 0,2 mg/ml 1:750	– CD3† 0,2 mg/ml 1:500	– NK1.1† 0,2 mg/ml 1:500	– nur MZ und KM: Ter119† 0,2 mg/ml 1:500	– CD4† 0,2 mg/ml 1:500
III)	CD34‡ 0,2 mg/ml 1:100	Sca-1† 0,5 mg/ml 1:200	Flt3‡ 0,2 mg/ml 1:200	IL-7Rα‡ 0,2 mg/ml 1:100	FcγR‡ 0,2 mg/ml 1:100	[Lin‡] siehe Text	cKit‡ 0,2 mg/ml 1:200
IV)	Ly6C-Bio† 0,5 mg/ml 1:250 SA‡ 0,2 mg/ml 1:300	– B220† 0,5 mg/ml 1:500	– CD43† 0,2 mg/ml 1:500	– IgM† 0,2 mg/ml 1:200	– AA4.1‡ 0,2 mg/ml 1:500	– IgD‡ 0,2 mg/ml 1:500	– CD19† 0,2 mg/ml 1:500
V)	–	CD3† 0,5 mg/ml 1:500	B220† 0,2 mg/ml 1:500	CD45.2† 0,2 mg/ml 1:500	CD11b† 0,2 mg/ml 1:500	CD45.1‡ 0,2 mg/ml 1:500	–

† von BD Biosciences, ‡ von Ebioscience, * von BioLegend – trotz Kopplung an verschiedene Fluorochrome und Bestellung bei verschiedenen Firmen sind Antikörper einer Spezifität immer vom selben Klon; Bio, Biotin; SA, Streptavidin; Lin, Linie. MZ, Milz; PB, Peripheres Blut; KM, Knochenmark.

Nach Zugabe der Antikörper-Mastermixe lag das Volumen der Färbereaktion bei etwa 100 µl. Zu jeder Reaktion wurde kurz vor der Messung DAPI (100 ng/ml) hinzuge-

geben, um tote Zellen (DAPI-positiv) aus der Analyse ausschließen zu können. Für Stammzellanalysen wurden mindestens eine Million Zellen analysiert, für alle anderen Färbungen 100.000 Zellen.

Bei allen Färbungen wurde zuerst auf die Hauptpopulation (Abb. 12 A), dann auf Einzelzellen (Abb. 12 B) und schließlich auf lebendige Zellen eingegrenzt (Abb.12 C).

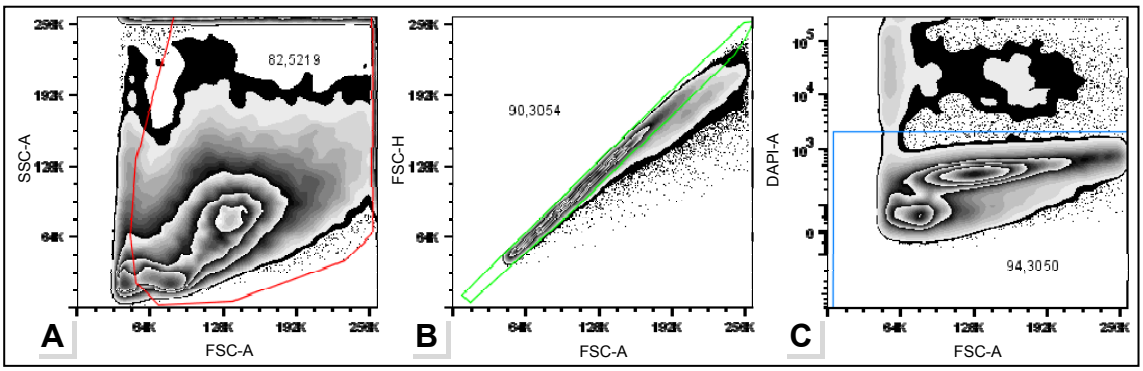

Abb. 12. Generelle *Gating*-Strategie aller Färbungen auf Hauptpopulation (A), Einzelzellen (B) und lebendige Zellen (C) am Beispiel von Knochenmark.

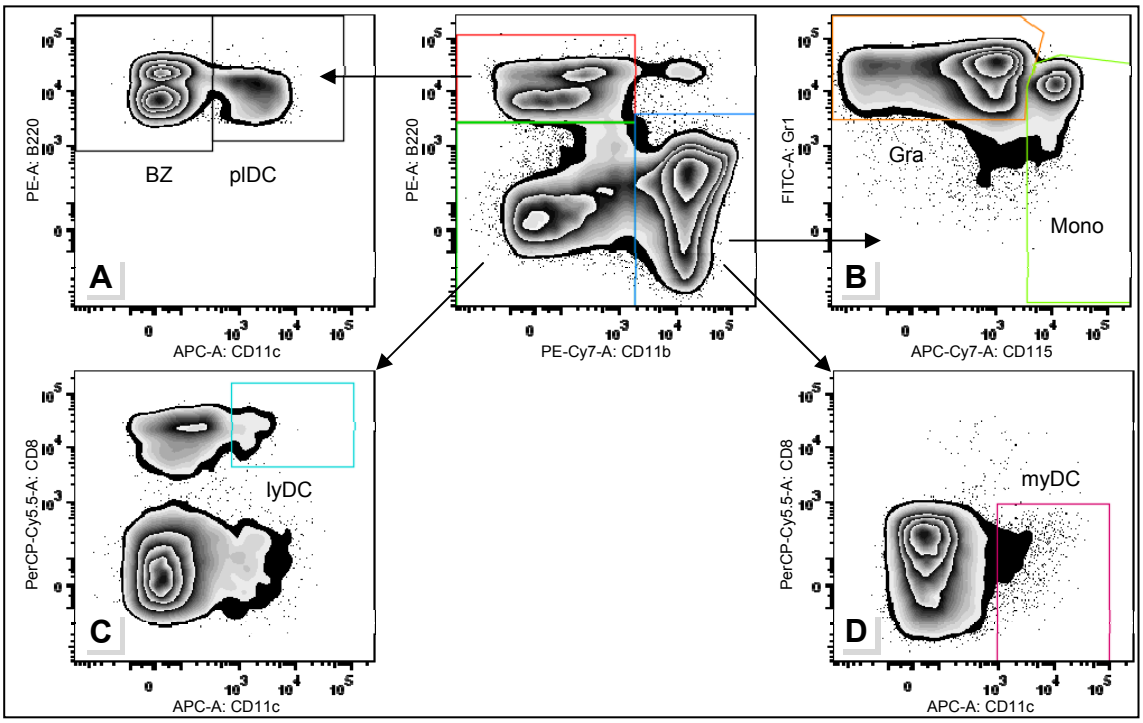

Abb. 13.1. *Gating*-Strategie innerhalb der Färbung I am Beispiel von Knochenmark (siehe Abb. 13.2).

(I) $B220^{+}$ und für alle anderen Marker negativ sind B-Zellen (Abb. 13.1-3 A); $CD11b^{+}$ $Gr1^{++}$ $CD115^{-}$ sind Granulozyten, $CD11b^{+}$ $Gr1^{+/++}$ $CD115^{+}$ sind Monozyten (Abb. 13.1-3 B), $F4/80^{+}$ $CD11c^{low}$ $CD11b^{-}$ $CD115^{-}$ sind Milz-Makrophagen (Abb. 13.2 E); Dendritische Zellen (DCs) sind positiv für CD11c und können anhand ihrer Expression von

CD11b und CD8 weiter unterteilt werden in lymphoide DCs (Abb. 13.1-3 C, $CD11b^-$ $CD8^+$) und myeloide DCs (Abb. 13.1-3 D, $CD11b^+$ $CD8^-$), anhand ihrer Expression von B220 und CD11b außerdem in plasmazytoide DCs (Abb. 13.1-3 A, $CD11b^-$ $B220^+$).

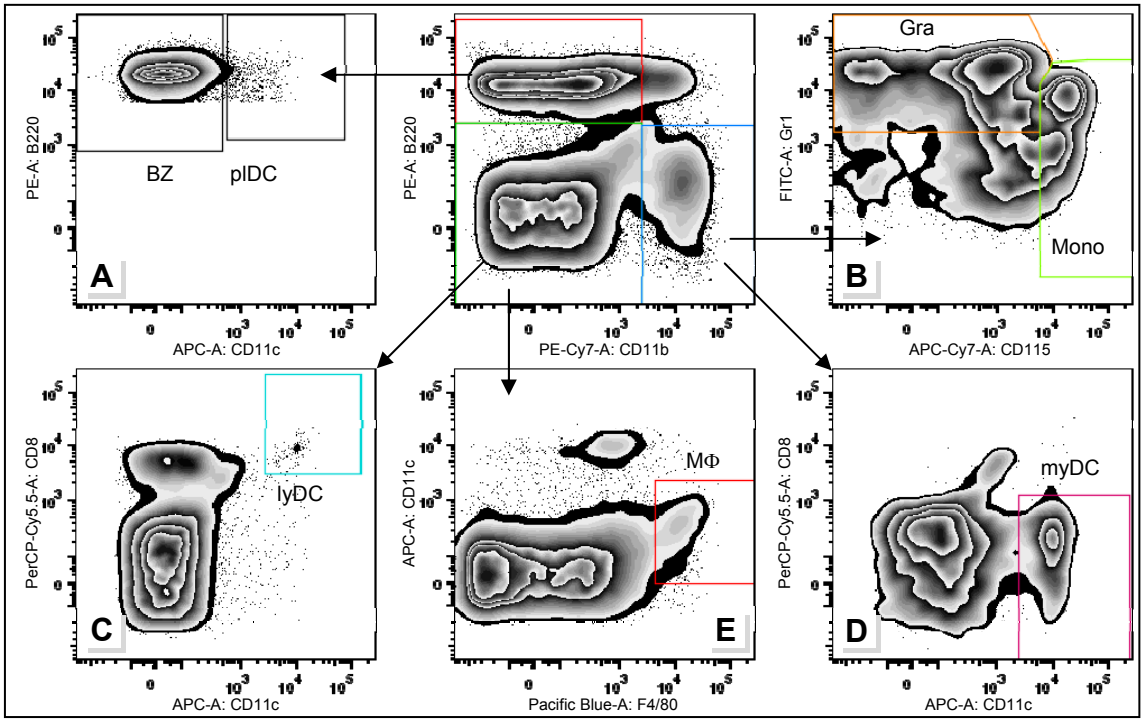

Abb. 13.2. *Gating*-Strategie innerhalb der Färbung I am Beispiel der Milz. BZ, B-Zellen (A); plDC, plasmazytoide Dendritische Zellen (A); Gra, Granulozyten (B); Mono, Monozyten (B); lyDC, lymphoide Dendritische Zellen (C); MΦ, Makrophagen (E); myDC, myeloide Dendritische Zellen (D).

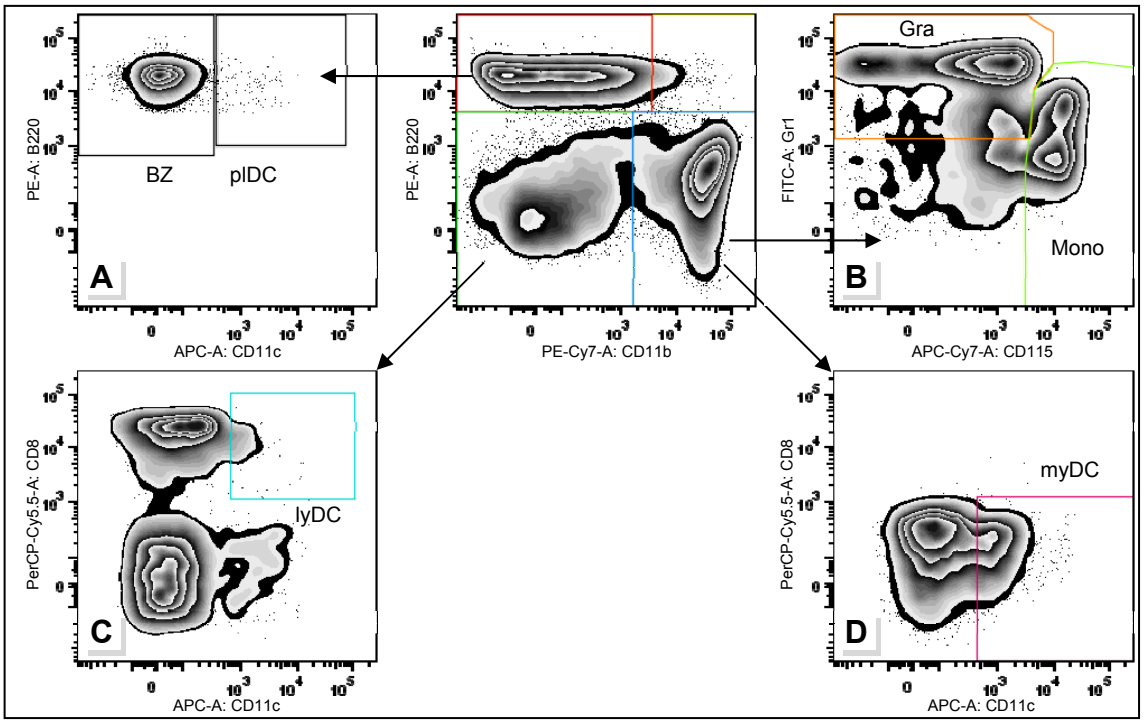

Abb. 13.3. *Gating*-Strategie innerhalb der Färbung I am Beispiel von Blut (siehe Abb. 13.2).

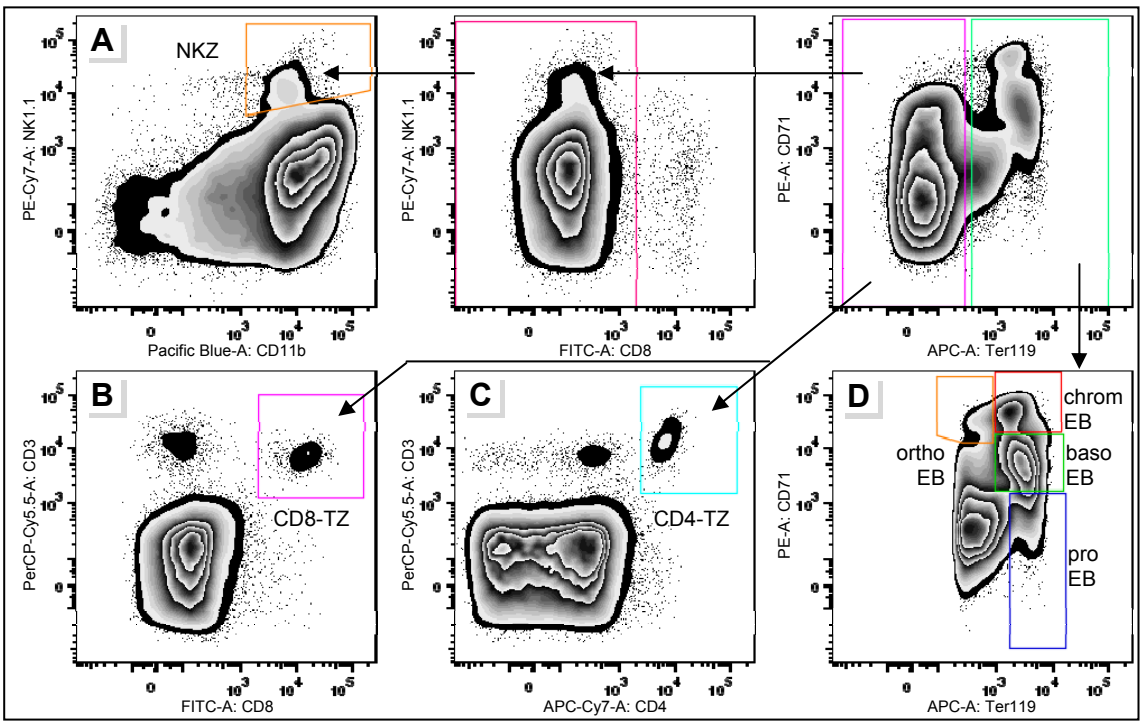

Abb. 14.1. *Gating*-Strategie innerhalb der Färbung II am Beispiel von Knochenmark. NKZ, Natürliche Killer-Zellen (A); TZ, T-Zellen (B-C); ortho EB, orthochromatophile Erythroblasten; chrom EB, chromatophile Erythroblasten; baso EB, basophile Erythroblasten; pro EB, Proerythroblasten (D).

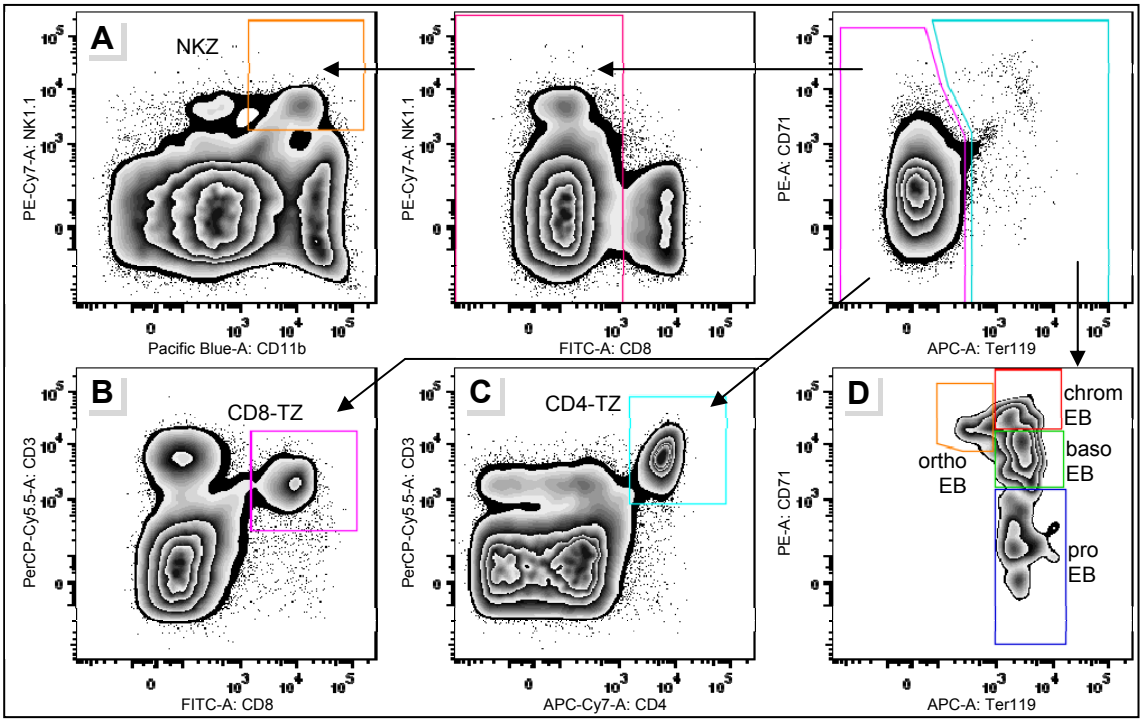

Abb. 14.2. *Gating*-Strategie innerhalb der Färbung II am Beispiel der Milz (siehe Abb. 14.1).

(II) $CD3^+$ sind T-Zellen, die anhand der Expression von CD4 und CD8 weiter untergliedert werden können in sogenannte zytotoxische T-Zellen ($CD8^+$, Abb. 14.1-3 B) und T-Helferzellen ($CD4^+$, Abb. 14.1-3 C); $NK1.1^+$ $CD11b^+$ sind NK-Zellen (Abb. 14.1-

3 A). Verschiedene Erythrozytenvorläuferstufen können über die Expression von CD71 und Ter119 unterschieden werden: $CD71^{++}$ $Ter119^{+}$ sind Proerythroblasten, $CD71^{++}$ $Ter119^{++}$ sind basophile Erythroblasten, $CD71^{+}$ $Ter119^{++}$ sind späte basophile und chromatophile Erythroblasten, $CD71^{+/-}$ und $Ter119^{++}$ sind orthochromatophile Erythroblasten (Abb. 14.1-3 D).

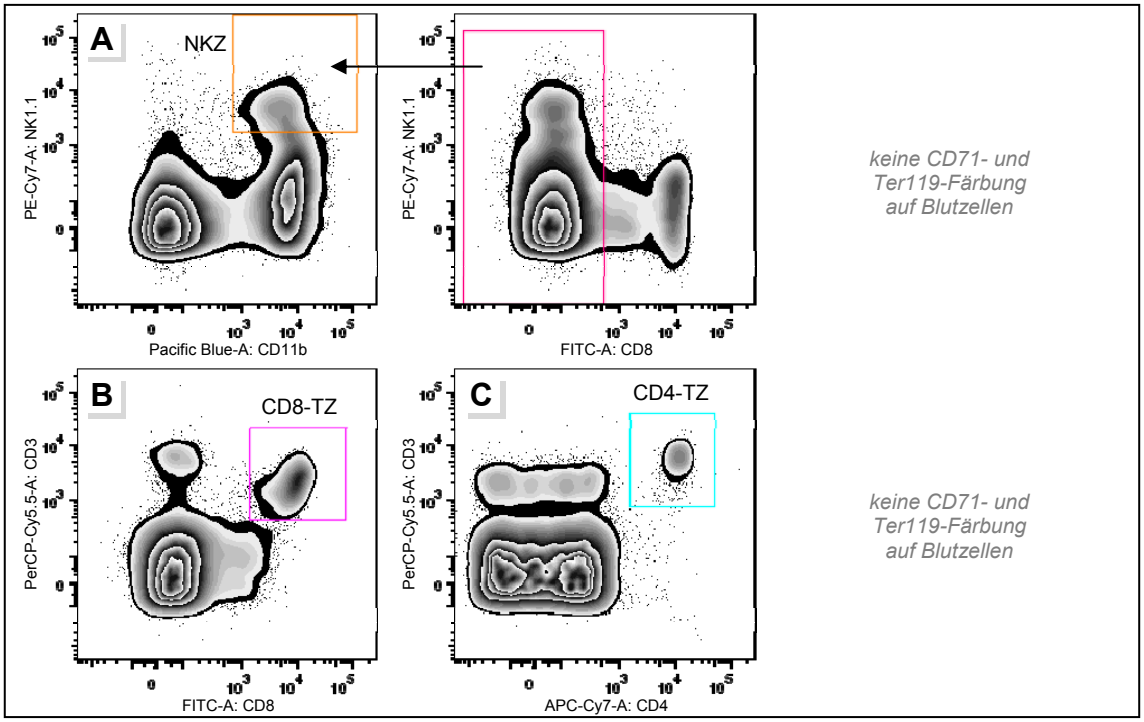

Abb. 14.3. *Gating*-Strategie innerhalb der Färbung II am Beispiel von Blut (siehe Abb. 14.1).

(III) Alle Vorläufer- oder Progenitorzellen sind negativ für die Linienmarker [Lin^{-}]. Die gemeinsame lymphoide Vorläuferzelle (CLP, *common lymphoid progenitor*) ist IL-$7R\alpha^{+}$ $Sca\text{-}1^{+/-}$ $cKit^{+/-}$ (Abb. 15 C). Die gemeinsame myeloide Vorläuferzelle (CMP, *common myeloid progenitor*), die Megakaryozyten/Erythrozyten-Vorläuferzelle (MEP) und die Granulozyten/Makrophagen-Vorläuferzelle (GMP) haben folgende Markerkombination gemeinsam: IL-$7R\alpha^{-}$ $Sca\text{-}1^{-}$ $cKit^{+}$, wobei außerdem MEPs $CD34^{-}$ $Fc\gamma R^{-}$, CMPs $CD34^{+}$ $Fc\gamma R^{+/-}$, und GMPs $CD34^{+}$ $Fc\gamma R^{+}$ sind (Abb. 15 A). Die pluripotente Vorläuferzelle (MPP, *multipotent progenitor*) und die Stammzellen (ST- und LT-HSC, *short-term* und *long-term hematopoietic stem cell*) haben gemeinsam IL-$7R\alpha^{-}$ $Sca\text{-}1^{+}$ $cKit^{+}$, unterscheiden sich aber in ihrer Expression von CD34 und Flt3, wobei MPPs $CD34^{+}$ $Flt3^{+}$ sind, ST-HSCs $CD34^{+}$ $Flt3^{-}$ und LT-HSCs $CD34^{-}$ $Flt3^{-}$ (Abb. 15 B).

(IV) B-Zell-Entwicklung: präpro-B-Zellen sind $B220^{+}$ $CD43^{+}$ $CD19^{-}$ $AA4.1^{+}$ $Ly6C^{-}$ (Abb. 16 D), pro-B-Zellen $B220^{+}$ $CD43^{+}$ $CD19^{+}$ $AA4.1^{+}$ (Abb. 16 C), prä-B-Zellen

$B220^+$ $CD43^-$ $CD19^+$ $AA4.1^+$ IgM^- IgD^- (Abb. 16 B), unreife B-Zellen $B220^+$ $CD43^-$ $CD19^+$ IgM^+ IgD^- und reife B-Zellen $B220^+$ $CD43^-$ $CD19^+$ IgM^+ IgD^+ (Abb. 16 A).

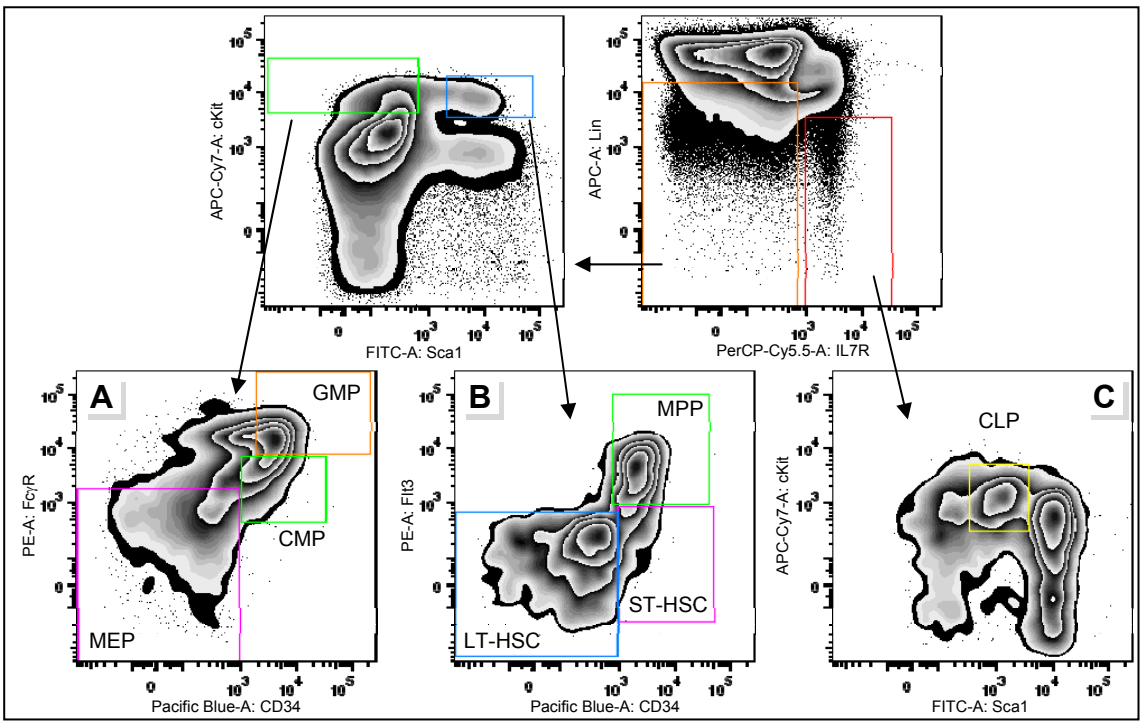

Abb. 15. *Gating*-Strategie der Färbung III am Beispiel von Knochenmark. GMP, *granulocyte/macrophage progenitor*; CMP, *common myeloid prog.*; MEP, *megakaryocyte/erythrocyte prog.* (A); MPP, *multipotent prog.*; ST-/LT-HSC, *short-term*/*long-term hematopoietic stem cell* (B); CLP, *common lymphoid prog.* (C).

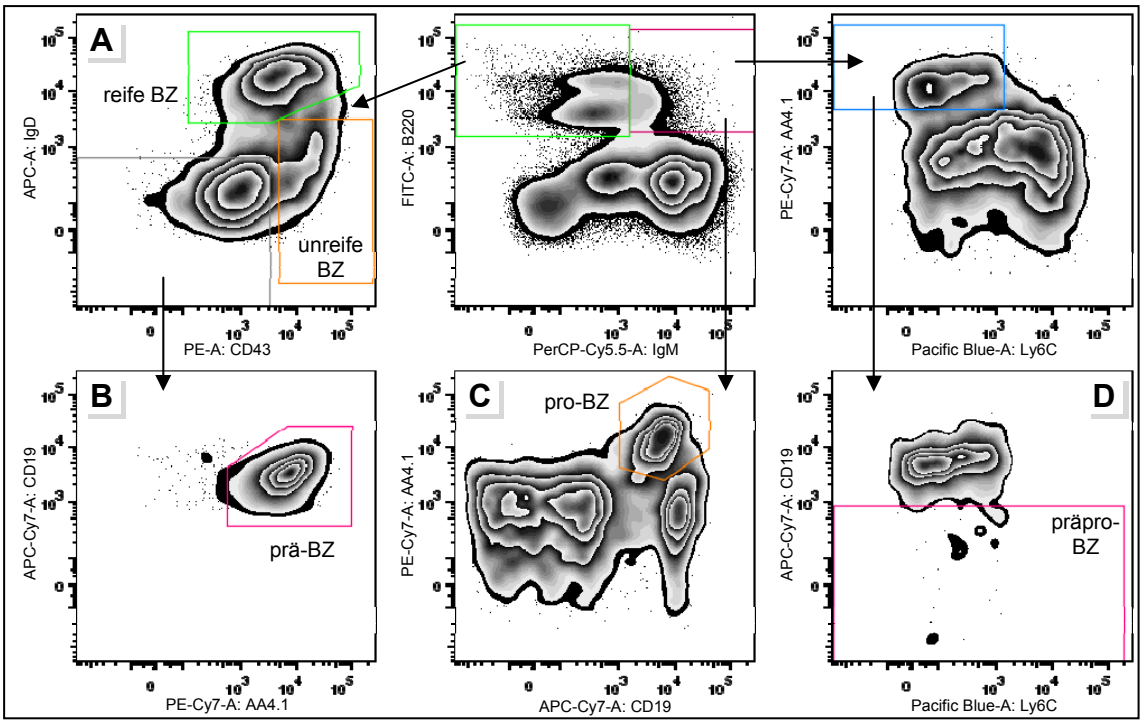

Abb. 16. *Gating*-Strategie innerhalb der Färbung IV im Knochenmark. BZ, B-Zellen; präpro-B-Zellen (D); pro-B-Zellen (C); prä-B-Zellen (B), unreife und reife B-Zellen (A).

(V) Chimerismusfärbung auf Blutzellen nach Transplantationen: $B220^+$ $CD3^-$ $CD11b^-$ sind B-Zellen; $CD3^+$ $B220^-$ $CD11b^-$ sind T-Zellen; $CD11b^+$ $B220^-$ $CD3^-$ sind myeloide Zellen. $CD45.1^-$ $CD45.2^+$ sind vom Spender abstammende Zellen, $CD45.1^+$ $CD45.2^-$ sind vom Kompetitor abstammende Zellen, $CD45.1^+$ $CD45.2^+$ sind Zellen, die vom Empfängertier stammen (Abb. 17).

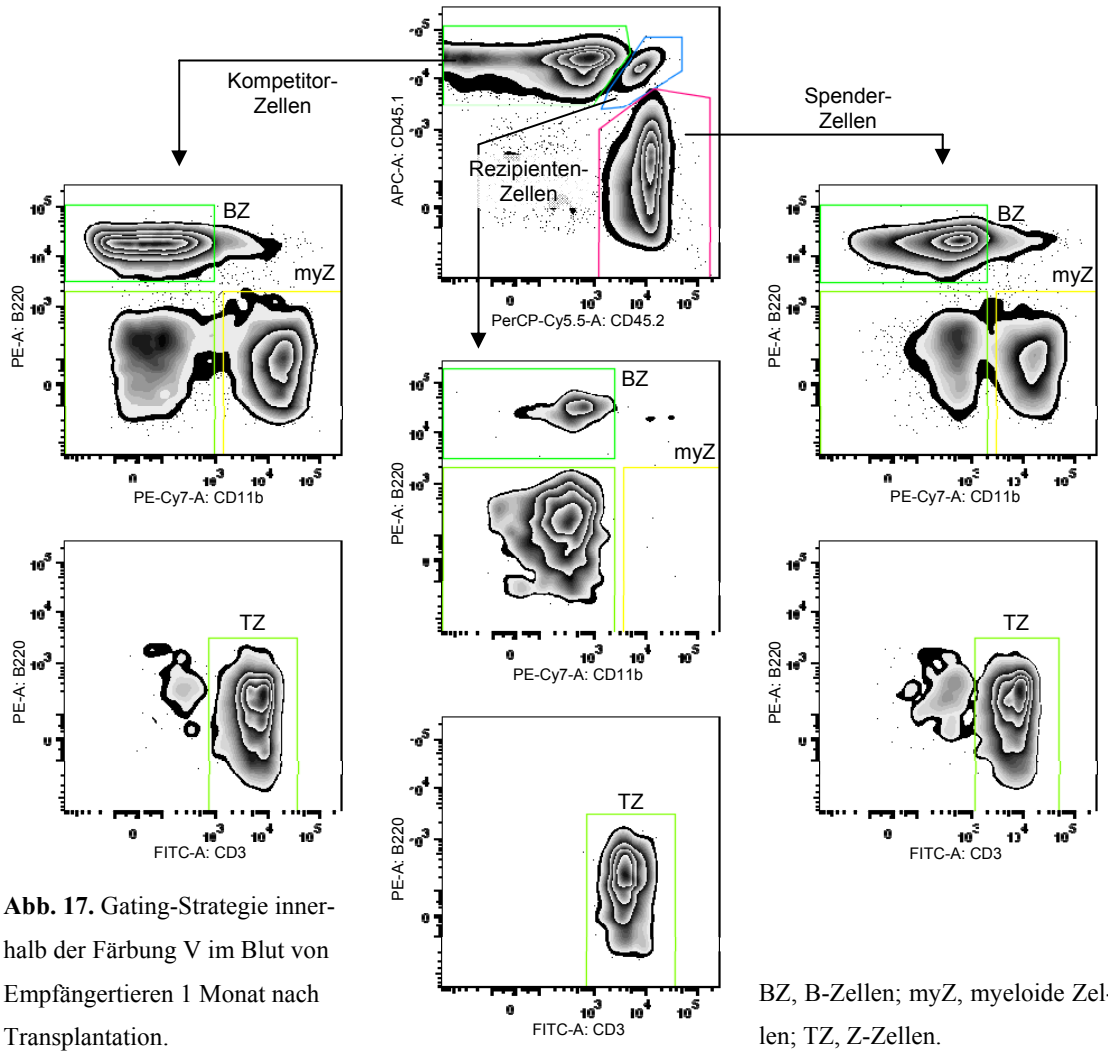

Abb. 17. Gating-Strategie innerhalb der Färbung V im Blut von Empfängertieren 1 Monat nach Transplantation. BZ, B-Zellen; myZ, myeloide Zellen; TZ, Z-Zellen.

Untersuchung intrazellulärer Antigene. Der Färbung mit Antikörpern gegen intrazelluläre Antigene ging eine zehnminütige Fixierung der Zellen mit methanolfreiem PFA (2%, siehe 2.15) und eine mindestens zweistündige Permeabilisierung mit eiskaltem Methanol (90%) voraus. PFA und Methanol wurden vor der Färbung durch zweimaliges Waschen der Zellen mit Färbepuffer entfernt.

Zellzyklus-Profile hämatopoetischer Zellen wurden mit dem Proliferationsmarker Ki67 (10 µl pro Test, BD Biosciences) erstellt, der in allen Zellzyklusphasen außer in G0 exprimiert wird. Nach der Färbung mit dem Antikörper wurde die DNS der Zellen in

einer einstündigen Inkubation mit DAPI (10 µg/ml) gefärbt, um über die DNS-Menge die G1/G0- von der S- und G2-Phase unterscheiden zu können (Abb. 18).

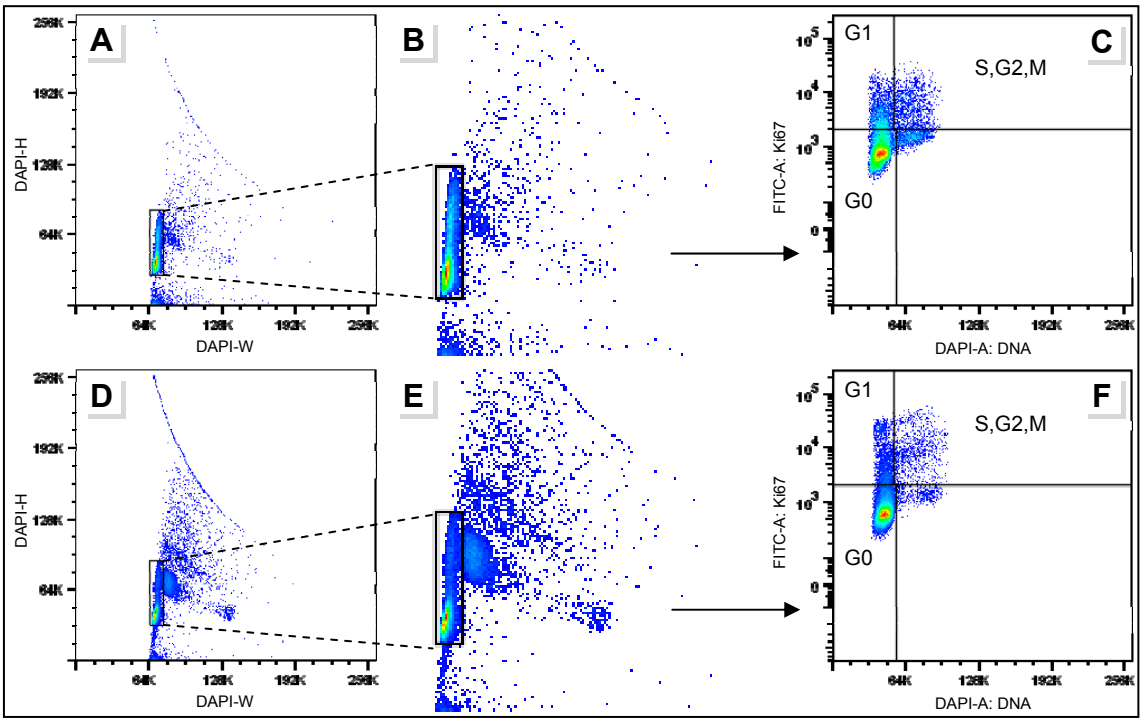

Abb. 18. *Gating*-Strategie bei der Zellzyklusanalyse im Knochenmark (A-C) und in der Milz (D-F). Eingrenzung von Einzelzellen (A, D) in der Vergrößerung (B, E) und Zellzyklusphasen G0, G1, S, G2, M erkennbar anhand der Anfärbung der DNS (DAPI) und Gegenfärbung des Proliferationsmarkers Ki67.

Die relative Telomerlänge in Blut-, Milz- und Knochenmarkszellen wurde ebenfalls durchflusszytometrisch bestimmt (Flow FISH, Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung). Dabei wurde weitgehend das Protokoll von Baerlocher et al., 2006 befolgt. Davon abweichend wurde hier DAPI als DNS-Farbstoff und eine FITC-markierte PNA-Sonde spezifisch für die repetitiven Telomersequenzen benutzt. Außerdem wurde das Protokoll durch Vergleich von Blut-, Milz-, und Knochenmarkszellen sowie von frischen, mit Methanol allein oder mit PFA und Methanol behandelten Blutzellen in einem initialen Experiment zugunsten der länger zu lagernden mit PFA und Methanol (MeOH) behandelten Knochenmarkszellen umgestellt. Die Fluoreszenzintensität ist zwar bei PFA/Methanol-fixierten Zellen geringer als bei nur mit Methanol oder gar nicht vorbehandelten Zellen, jedoch ist der durchflusszytometrisch messbare Telomerlängenunterschied zwischen G3- und Wildtypzellen in nur mit Methanol behandelten Zellen ein anderer als bei frischen Zellen (G3 zu WT : PB frisch 0,67 , PB MeOH 0,75 , PB PFA+MeOH 0,64 , Abb. 19 B).

Zellen aus peripherem Blut (PB), aus der Milz (MZ) und aus dem Knochenmark (KM) zeigen nahezu identische Telomerlängen innerhalb eines Genotyps und auch nahezu identische Verhältnisse der Telomerlängenunterschiede zwischen den Genotypen (G3 zu WT : PB 0,67 , MZ 0,66 , KM 0,67 , Abb. 19 A).

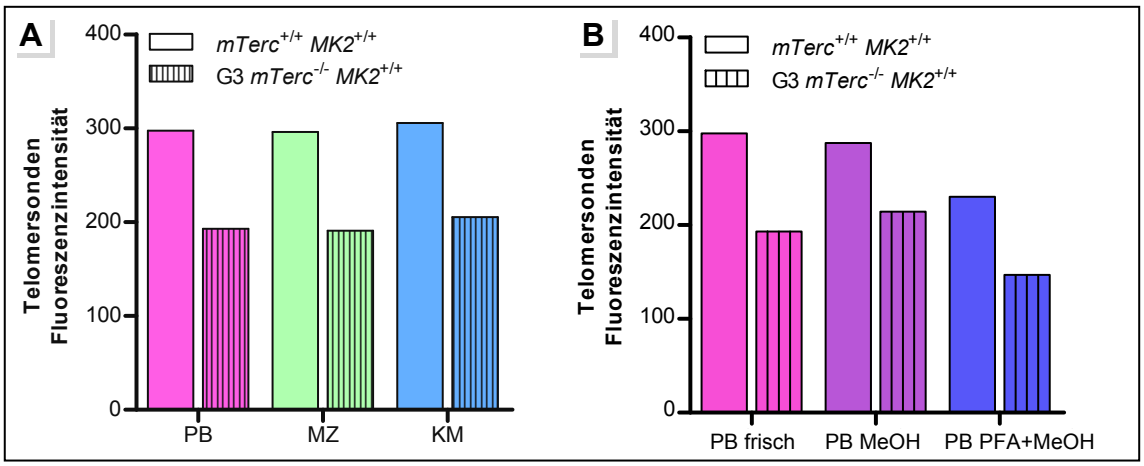

Abb. 19. Optimierung der durchflusszytometrischen Bestimmung der relativen Telomerlänge im hämatopoetischen System von Wildtyp- und Telomerase-Knockout-Mäusen.

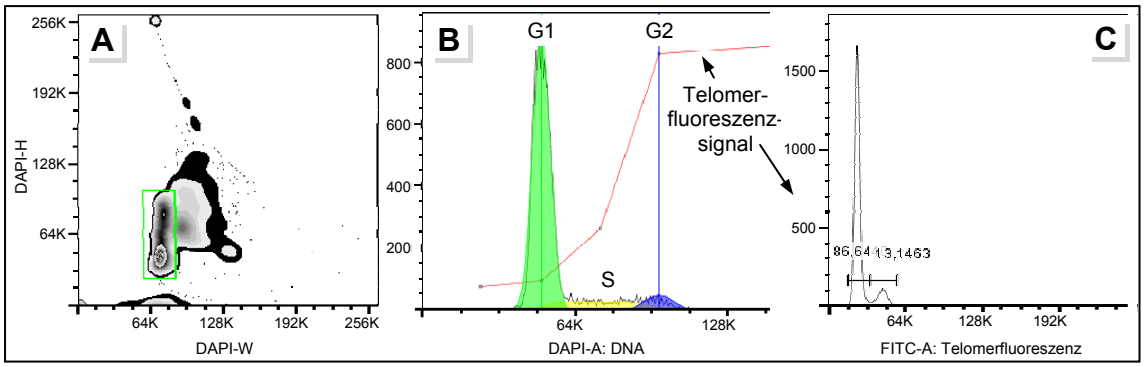

Abb. 20. *Gating*-Strategie bei der Telomerlängenanalyse im hämatopoetischen System. Eingrenzung von Einzelzellen (A) und Zellzyklusphasen (B) mittels FlowJo und Telomersonden-Signal in den Phasen (C).

Mit der Menge der an die Telomere bindenden Sonde steigt auch die durchflusszytometrisch pro Zelle zu messende mittlere Fluoreszenzintensität, weshalb bei kürzeren Telomeren z.B. in Telomerase-Knockout-Zellen oder in der G1- im Vergleich zur G2-Phase weniger Fluoreszenz pro Zelle detektierbar ist (Abb. 20).

Sämtliche Durchflusszytometrie-Daten wurden am Analysegerät LSR II (Becton Dickinson) aufgenommen und mit der FlowJo-Software (Tree Star, Inc.) ausgewertet.

2.11. **ELISA** (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Blutplasma wurde durch Sedimentation der zellulären Blutbestandteile gewonnen, wobei das Blut mit EDTA als Antikoagulantium versetzt worden war. Zytokine im

Blutplasma wurden mit folgenden Kits den Herstelleranweisungen entsprechend analysiert: RayBio® Mouse Cytokine Antibody Array 3 (AAM-CYT-3, RayBiotech, Inc.) zur simultanen Detektion von 62 Zytokinen, Quantikine® Mouse G-CSF Immunoassay (MCS00, R&D Systems, Inc.), Quantikine® Mouse IL-6 Immunoassay (M6000B, R&D Systems, Inc.), Rat/Mouse Growth Hormone ELISA Kit (EZRMGH-45K, Millipore) und m/r IGF-1-ELISA (E25, Mediagnost GmbH).

2.12. Glykogenbestimmung

35 bis 50 mg Gewebe (Leber oder Oberschenkelmuskel) pro Probe wurden auf Eis mit 500 µl einer 30%igen wässrigen Kaliumhydroxid (KOH)-Lösung versetzt, die mit Natriumsulfat (Na_2SO_4) gesättigt war. Anschließend wurden die Gewebsstücke für 20 bis 30 Minuten gekocht, bis eine homogene Suspension entstanden war. Nachdem die Proben wieder abgekühlt waren, wurden sie mit 1,1 bis 1,2 Volumenteilen 95%igem Ethanol versetzt, um das Glykogen zu präzipitieren. Nach dreißigminütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben bei 840x *g* für 20-30 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Glykogenpräzipität wurde in 1 ml Wasser gelöst.
Die Bestimmung der Glykogenkonzentration erfolgte in einer 96-Loch-Platte mit Duplikaten einer Standardreihe aus seriellen 1:2-Verdünnungen einer 5%igen wässrigen Lösung von Glykogen (Genaxxon) und Duplikaten der Proben. Das Volumen pro Loch betrug je 28 µl und bestand aus 5 µl Standard oder Probe und 23 µl Wasser. Dazu wurden innerhalb kurzer Zeit erst 28 µl einer 5%igen wässrigen Lösung von Phenol, danach 140 µl konzentrierte Schwefelsäure in die Mitte des Wells gegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Unter Schütteln wurde die Reaktion weitere 10 bis 20 Minuten bei 25-30°C inkubiert, was hier im Mikroplatten-Lesegerät (Infinite 200, Tecan) geschah, bevor die Absorption in der Platte bei 490 nm gemessen wurde.

2.13. Western Blots

Proteinextrakte aus Leber wurden durch Homogenisierung des Gewebes in mit Proteaseinhibitoren supplementiertem RIPA-Puffer (siehe 2.15) hergestellt. Das Lysat wurde durch Zentrifugation geklärt und die Proteinkonzentration colorimetrisch nach Bradford über eine BSA-Standardkurve bestimmt (Protein Assay, Bio-Rad). Pro Bahn der denaturierenden 10%igen Gele wurden Lysatmengen mit 40 bis 60 µg Protein aufgetrennt (diskontinuierliche SDS-PAGE, Mini-Protein-System, Bio-Rad) und bei 300 mA für 35 Minuten *semidry* auf PVDF-Membranen geblottet (0,45 µm, Immobilion-P, Millipore).

Unspezifischer Antikörperbindung wurde mittels Blockierung in 5% Milchpulver in TBS-Tween vorgebeugt. Die Membranen wurden mit dem jeweiligen Primärantikörper über Nacht bei 4°C, und nach mehrmaligem Waschen mit TBS-Tween mit dem entsprechenden Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach erneutem Waschen der Membranen in TBS-T wurde Peroxidase-Substrat hinzugegeben (Peroxid und Luminol, Immobilion-Western, Millipore) und das chemilumineszente Reaktionsprodukt detektiert (Infinity-Geldokumentationssystem und Chemi-Capt Software, Vilber Lourmat). Die Quantifizierung erfolgte mittels ImageJ-Software (Wayne Rasband, NIH).

Primärantikörper (verdünnt in 5% Milchpulver in TBS-Tween): monoklonaler Maus anti-Human/-Maus beta-Aktin-Antikörper (1:20.000, A1978, Sigma), polyklonaler Ziege anti-Human/-Maus IGFBP-1-Antikörper (1:1.000, sc-6072, Santa Cruz), polyklonaler Kaninchen anti-Human/-Maus Insulin-Rezeptor beta-Antikörper (1:1.000, sc-711, Santa Cruz), polyklonaler Kaninchen anti-Human/-Maus PEP-CK-Antikörper (1:1.000, sc-32879, Santa Cruz).

Sekundärantikörper (verdünnt in 5% Milchpulver in TBS-Tween): HRP-gekoppelter Ziege anti-Kaninchen Antikörper (1:10.000, 65-6120, Invitrogen) und HRP-gekoppelter Kaninchen anti-Ziege Antikörper (1:10.000, 61-1620, Invitrogen).

2.14. Histologische Analysen

Kolon *Whole Mount*-Präparation. Der Dickdarm (Kolon) wurde mit PBS und FA gespült, längs aufgeschnitten und in einer Styropor-Schale aufgespannt. Nach Fixierung in FA über Nacht bei 4°C wurden die Darmstücke mit PBS gewaschen und mit 0.2%igem Methylenblau in PBS gefärbt, bis das Gewebe tiefblau war. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Darmstücke in Petrischalen aufgespannt. Die Auszählung der Kolonkrypten erfolgte an einem Binoccular (Leica) mit Durch- und Auflicht bei einer 10-fachen Vergrößerung.

Dünndarm und Anaphasenbrücken. Dünndärme wurden mit PBS und FA gespült, aufgerollt in Einbettkassetten über Nacht bei 4°C in FA fixiert, bevor sie in Paraffin eingebettet wurden. Mit einem Mikrotom (Microm HM 355S) angefertigte 3 µm dicke Schnitte des Dünndarms wurden mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) gefärbt. Dabei wurden die Schnitte erst in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und rehydratisiert (dreimalig Xylol jeweils für 10 Minuten, Ethanol 100%-90%-80%-70% einmal jeweils für 5 Minuten), zweimal für jeweils 5 Minuten in Wasser gewaschen, für

3,3 Minuten in Hämatoxylin getaucht (Mayers Hämalaun, gebrauchsfertig, Merck), dreimal für 5 Minuten in Wasser gewaschen, für 3 Minuten in Eosin getaucht (0,5% Eosin G, frisch 1:500 mit Eisessig angesäuert, Merck) und nach drei abschließenden Waschschritten in Wasser mit wässrigem Eindeckmittel (Aquatex, Merck) unter einem Deckglas fixiert. Zellkerne erscheinen in der H&E-Färbung blau-violett, Zytoplasma rosa. Anaphasenbrücken wurden relativ zur gesamten Anzahl an Anaphasen in intestinalen Kryptenzellen ausgezählt, wobei zwischen 50 und 100 Anaphasen pro Probe am Mikroskop (DM 5000B, Leica) bei einer 1000fachen Vergrößerung begutachtet wurden.

DNS-Schädigungssignale – p53- und p21-Fluoreszenzfärbungen. 5 µm dicke Schnitte des Dünndarms wurden erst in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und rehydratisiert (siehe oben). Durch die FA-Fixierung in ihrer Struktur oder Zugänglichkeit veränderte Antigene (Epitope) können durch Kochen der Schnitte in Citratpuffer demaskiert werden. Dazu wurden die Schnitte im Dampfdrucktopf für 5 Minuten nach Erreichen des erforderlichen Druckes in ca. 1:100 verdünnter Antigen *Unmasking Solution* (Vector Laboratories) gekocht. Anschließend wurden die wieder abgekühlten Schnitte für 5 Minuten in PBS gewaschen, bevor die Gewebsstücke auf den Objektträgern mit einem Fettstift (Dako) umrandet wurden. Die Inkubation mit Erstantikörper (Kaninchen anti-Maus p53 CM5, polyklonal, VP-P956, Vector Laboratories, 1:800 in PBS oder Maus anti-Maus p21 Klon F-5, sc-6246, Santa Cruz, 1:150 in PBS) erfolgte in einer Feuchtigkeitskammer über Nacht bei 4°C. Am Folgetag wurden die Schnitte erst auf Raumtemperatur gebracht und nach dreimaligem Waschen für je 5 Minuten in PBS wurden die Schnitte mit Cy3-markiertem Sekundärantikörper (Ziege anti-Kaninchen IgG, A10520, Zymed, 1:800 in PBS) beladen und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für je 5 Minuten in PBS wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und schließlich mit DAPI-haltigem Eindeckmedium (Vector Laboratories) unter einem Deckglas fixiert.

Fettfärbung. Auf Trockeneis schockgefrorene und bei -80°C gelagerte Leberstücke wurden mit Fixiergel (Tissue-Tek O.C.T. Compound, Sakura) auf Schneideunterlagen für das Kryomikrotom (Microm HM 560) aufgebracht und zu 8-10 µm dicken Schnitten verarbeitet. Die getrockneten Schnitte wurden für 10 Minuten in kaltem 4%igem FA fixiert und dreimal in Wasser gespült. Nachdem die Schnitte wieder getrocknet waren, wurden sie zwecks Wasserausschluss für 5 Minuten in absolutes Propylenglykol gestellt. Die anschließende Färbung in 0,5%iger Oil Red O-Lösung erfolgte im 60°C warmen Wasserbad für 10 Minuten. Zur Differenzierung der Färbung wurden die

Schnitte für 5 Minuten in 85%igem Propylenglykol gebadet. Nach zweimaligem Waschen in Wasser wurde das Gewebe für 30 Sekunden mit Hämatoxylin gegengefärbt und dann für 3 Minuten in laufendem Leitungswasser gewaschen. Nach einem abschließenden Bad in Wasser wurden die Schnitte mit wässrigem Eindeckmittel (Aquatex, Merck) unter einem Deckglas fixiert. Die Auswertung erfolgte am Mikroskop (DM 5000B, Leica) bei den angegebenen Vergrößerungen; Lipide (neutrale Fette, Triglyzeride) erscheinen in dieser Färbung rot, Zellkerne blau-violett.

2.15. Puffer, Reagenzien, Anwendungen

Wenn nicht anders angemerkt, handelte es sich beim verwendeten Wasser immer um deionisiertes Wasser aus einer Millipore-Filteranlage (0,2 µm). Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS, *phosphate buffered saline*) wurde als 10fache Stammlösung bei Gibco bezogen und mit Millipore-Wasser verdünnt. Chemikalien wurden, sofern nicht extra aufgeführt, von Carl Roth, Merck und Sigma Aldrich bezogen. Hier verwendete Plastikartikel waren ausnahmslos von Sarstedt. Zur Filtration von Zellsuspensionen wurden Nylonfilternetze (30 µm, Hartenstein) oder unter sterilen Bedingungen *Pre-Separation Filters* (30 µm, Miltenyi) verwendet, zur Herstellung einer Zellsuspension aus Milz wurde das Organ über einen *Falcon™ Cell Strainer* (70 µm, BD) gerieben.
Wenn nicht anders beschrieben, wurde EDTA immer in einer Konzentration von 0,5 M und einem pH-Wert von 8 verwendet, um Spritzen vor der Blutentnahme zu spülen oder im Reaktionsgefäß vorzulegen, in das per Kapillare genommenes Blut überführt wurde.
Lebende hämatopoetische Zellen wurden bei 700x *g* und 4°C für 5-10 Minuten in 1,5 ml- und 2 ml-Reaktionsgefäßen zentrifugiert (Eppendorf 5415R und Thermo Heraeus Fresco 17), in 15 ml Röhrchen bei 550x *g* und 4°C für 5-10 Minuten (Beckman Allegra X-15R). DNS und Protein wurden in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen bei 16.000x *g* und 4°C für 5-10 Minuten zentrifugiert.

Gewebslysepuffer für Schwanz- und Leberbiopsien zur DNS-Isolierung, pH 8.2
400,0 mM NaCl
10,0 mM Tris-HCl
2,0 mM EDTA
in Wasser;
frisch dazugeben: 0,1 mg/ml Proteinase K (Roche) und 2% SDS
Lyse der Biopsien in 250-500 µl bei 56°C auf dem Schüttler

TBE (Tris-Borat-EDTA)-Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese, pH 8

89,0	mM	Tris-Base
89,0	mM	Borsäure / Borat (H_3BO_4)
2,0	mM	EDTA

in Wasser

Erythrozytenlysepuffer

150,0	mM	Ammoniumchlorid (NH_4Cl)
10,0	mM	Kaliumhydrogencarbonat ($KHCO_3$)
100,0	µM	EDTA

in Wasser

Trypanblau zur Auszählung lebendiger und toter Zellen

0,4	%	Trypanblau (Merck) in PBS, filtriert

Formaldehyd (FA) ca. 4%

100,0	ml	37-40%ige Formaldehyd-Lösung (J.T.Baker)
4,0	g	Natriumdihydrogenphosphat ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$)
6,5	g	Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)

in 1 L Wasser

Paraformaldehyd (PFA), 4%, Methanol-frei – zur intrazellulären Antikörperfärbung

PBS auf 65°C erhitzen
20 g Paraformaldehyd (PFA) einwiegen
15 Tropfen 1 M Natriumhydroxid (NaOH) zugeben
pH mit 37% Salzsäure (HCl) auf 7,2 einstellen
mit Wasser auf 500 ml auffüllen
Verdünnung auf 2% mit dem PBS der Zellsuspension

Organlysepuffer, Protein-denaturierend (RIPA, *RadioImmuno Precipitation Assay*-Puffer)

50,0	mM	Tris-HCl
150,0	mM	NaCl
1,0	%	Nonidet P-40
0,5	%	Desoxycholat (DOC)
0,1	%	Natriumdodecylsulfat (SDS)

in Wasser; frisch dazugeben:

1,0	mM	Natriumvanadat ($NaVO_3$)
1,0	mM	Dithiothreitol (DTT)
1,0	x	Proteaseinhibitor (*Complete Inhibitor*, Roche)
1,0	mM	Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, gelöst in Ethanol)

Laufpuffer für SDS-PAGE

25,0	mM	Tris-Base
192,0	mM	Glycin
0,1	%	Natriumdodecylsulfat (SDS)

in Wasser

Transferpuffer für Western Blots

40,00	mM	Tris-Base
39,00	mM	Glycin
0,05	%	Natriumdodecylsulfat (SDS)

in Wasser; frisch dazugeben:

20,00	%	Methanol

TBS-Tween, Western Blot-Waschpuffer, pH 7,5

50,0	mM	Tris-Base
150,0	mM	NaCl
0,1	%	Tween 20

Oil Red O-Lösung, 0,5%, zur Anfärbung von Triglyceriden im Gewebe

0,5	g	Oil Red O
100,0	ml	Propylenglykol, 100% (1,2-Propandiol)

Oil Red O-Pulver in Propylenglykol unter Rühren und Erhitzen bis auf 95-100°C lösen, in warmem Zustand filtrieren

2.16. Statistik

Statistische Analysen wurden mit Microsoft Excel und GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.) durchgeführt. Zur Berechnung der P-Werte für die Datenreihen wurde der Studentsche *t*-Test herangezogen. Wenn nicht anders aufgeführt, sind alle Daten als Mittelwerte und Standardfehler angegeben. *** P<0,001, ** P=0,001-0,01, * P=0,01-0,05, n.s. P>0,05. Zur Vereinfachung wurden nicht signifikante Unterschiede meist unbeschriftet gelassen.

3. Ergebnisse

3.1. Darm und DNS-Schädigung

3.1.1. Die Deletion von *MK2* hat keinen Einfluss auf das Überleben von Telomerase-defizienten und -profizienten Mäusen

Die Telomerase-Knockout-Maus ist ein Alterungsmodell, in dem Telomerverkürzung zu einer verminderten Lebenserwartung im Vergleich zu Wildtypmäusen führt (Rudolph et al., 1999). Obwohl Alterung in *MK2*-Knockout-Mäusen (Kotlyarov et al., 1999) bisher nicht untersucht wurde, hat das Fehlen dieser Kinase Einfluss auf viele Phänotypen, die in der Alterung eine Rolle spielen. Um zu prüfen, ob die Deletion von *MK2* einen Einfluss auf das Überleben von Telomerase-defizienten, früh alternden Tieren hat, wurden Geburts- und Todesdaten notiert und Überlebenskurven für alle Genotypen berechnet.

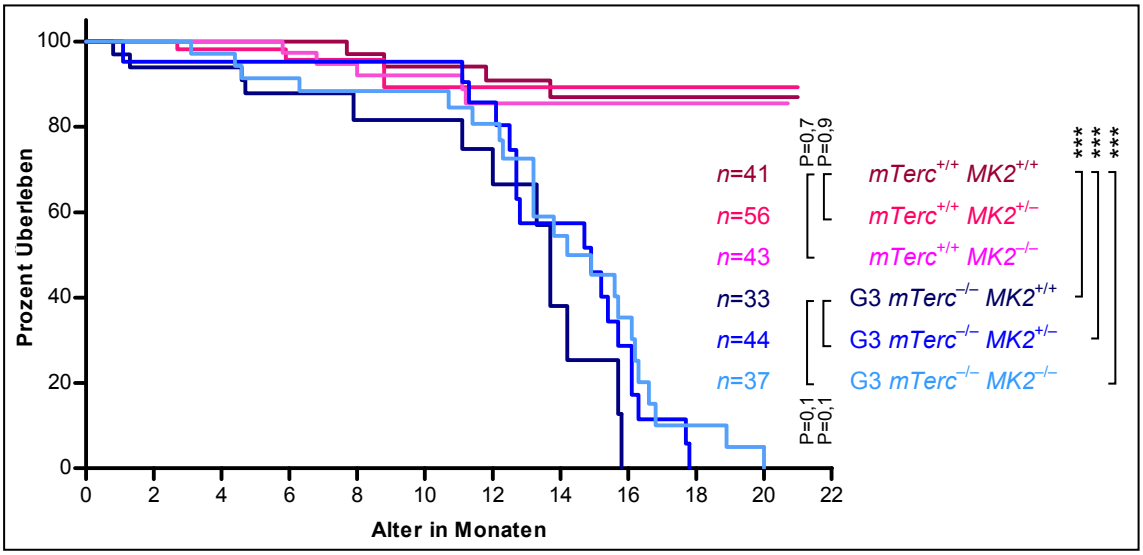

Abb. 21. Die Lebensdauer von *mTerc*$^{-/-}$-Mäusen ist unabhängig von MK2 verkürzt. Überlebenskurve nach Kaplan-Meier für die angegebenen Genotypen, die verstorbene Tiere wie auch Tiere beinhaltet, die auf Grund eines stark beeinträchtigten Allgemeinzustandes getötet werden mussten (über 20% Gewichtsverlust, starke Mobilitätseinschränkung).

Unabhängig von der MK2-Expression überlebten alle Telomerase-Wildtyptiere zu etwa 85% länger als 20 Monate und übertrafen damit die Lebensspanne aller Telomerase-defizienten Genotypen in signifikantem Ausmaß. Innerhalb der Telomerase-Wildtyp-gruppe war die Lebensspanne im Untersuchungszeitraum hinsichtlich des *MK2*-Status nicht signifikant verschieden; da es vorrangiges Ziel dieser Arbeit war, den Einfluss von MK2 auf die Alterung zu untersuchen, war das weitere Überleben der Telomerase-Wildtyptiere hier nicht Bestandteil der Analyse. Obwohl die Kurven für *MK2*-Wildtyp-,

MK2-heterozygote und *MK2*-Knockout-Tiere im Telomerase-defizienten Hintergrund unterschiedliche Endpunkte hatten, waren die Überlebenskurven dieser Tiere zu keinem Zeitpunkt signifikant verschieden. Das durchschnittlich erreichte Alter lag bei 13,7 Monaten für Tiere des Genotyps G3 $mTerc^{-/-}$ $MK2^{+/+}$ und bei 14,9 Monaten sowohl für G3 $mTerc^{-/-}$ $MK2^{+/-}$-Tiere als auch für Doppelknockout-Tiere (G3 $mTerc^{-/-}$ $MK2^{-/-}$, Abb. 21).

3.1.2. Der Verlust der MK2-Expression hat einen negativen Einfluss auf das Körpergewicht von Telomerase-Knockout- und Kontrollmäusen

In der Telomerase-Knockout-Maus geht dem frühen Tod eine starke Gewichtsabnahme voraus, weshalb alle Tiere dieses Genotyps spätestens ab einem Alter von einem halben Jahr regelmäßig gewogen wurden. Aus diesen Daten wurde der Gewichtsverlauf über die Lebenszeit geschlechtsspezifisch in Altersgruppen aufgetragen.

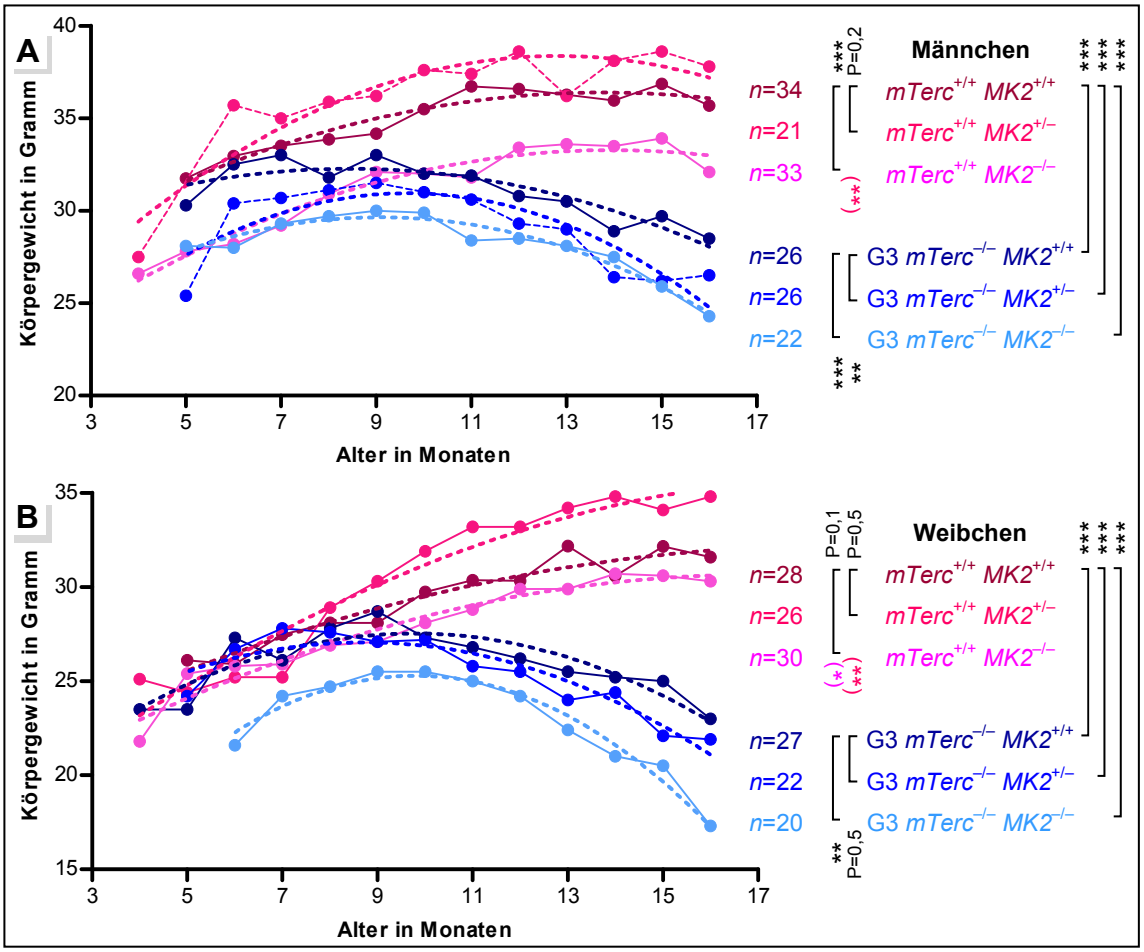

Abb. 22. *MK2*-Defizienz führt zu reduziertem Körpergewicht. Gewichtskurven für A) Männchen und B) Weibchen der angegebenen Genotypen. Gestrichelte Linien sind quadratische Regressionen dieser Kurven. Schwarze Sternchen und P-Werte stehen für Kurvenunterschiede über den ganzen Untersuchungszeitraum; farbige Sternchen in Klammern beziehen sich auf Signifikanzen ab einem Alter von 11 Monaten.

Bei männlichen wie auch bei weiblichen Telomerase-Knockout-Tieren (G3 *mTerc*$^{-/-}$) war das Körpergewicht über die gesamten in Abb. 22 dargestellten 12 Monate signifikant niedriger als das Körpergewicht der vergleichbaren Telomerase- und *MK2*-Wildtyptiere (*mTerc*$^{+/+}$).
Innerhalb des Telomerase-Wildtyphintergrundes (*mTerc*$^{+/+}$) war das Körpergewicht der *MK2*-Knockout-Männchen (♂ *mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{-/-}$) über die gesamten 12 Monate, das der *MK2*-Knockout-Weibchen (♀ *mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{-/-}$) ab einem Alter von 11 Monaten signifikant niedriger als das vergleichbarer *MK2*-Wildtyptiere (*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/+}$); *MK2* im heterozygoten Zustand (*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/-}$) führte – ganz im Gegenteil zum kompletten Verlust von *MK2* – eher zu einem durchschnittlich höheren Körpergewicht als bei Wildtyptieren, wobei dieser Unterschied erst ab einem Alter von 11 Monaten signifikant war (farbige Sternchen in Klammern in Abb. 22).
Wie im Telomerase-Wildtyphintergrund, waren auch im Telomerase-defizienten Hintergrund die *MK2*-Knockout-Tiere (G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{-/-}$) signifikant leichter als vergleichbare *MK2*-Wildtyptiere (G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/+}$), wobei hier *MK2*-heterozygote Tiere (G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/-}$) nur bei den Männchen signifikant weniger Körpergewicht hatten als vergleichbare *MK2*-Kontrolltiere (G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/+}$).

Weitere äußerlich festzustellende Unterschiede wie Verhaltensauffälligkeiten zwischen Wildtyptieren und *MK2*- und/oder Telomerase-defizienten Tieren konnten nicht beobachtet werden. Auch bei der Nekropsie der Tiere konnten keine äußerlichen Unterschiede zwischen den Organen von *MK2*-profizienten und -defizienten Tieren festgestellt werden. Deshalb wurden im Folgenden die Organe und Lebensvorgänge näher untersucht, welche in der Telomerase-defizienten Modellmaus einen bereits bekannten Phänotypen zeigen: Darm, Metabolismus, Zytokinsekretion und hämatopoetisches System.

3.1.3. Beim strukturellen Aufbau des Darms spielt MAPKAP-Kinase 2 keine Rolle

Aufgenommene Nahrung wird im Verdauungstrakt zerkleinert und verdaut bevor die Nährstoffe vom Körper aufgenommen und verwertet werden können. Eine wichtige Aufgabe kommt dabei dem Darm zu. Über die mittels Villi und Mikrovilli um ein Vielfaches vergrößerte Oberfläche können Nährstoffe resorbiert werden. Das im Vergleich zu Wildtypmäusen reduzierte Körpergewicht der Telomerase- und/oder *MK2*-defizienten Mäuse könnte unter anderem die Folge einer gestörten Nahrungsverwertung auf Grund eines strukturell geschädigten Darms sein. Hierbei kann die Zahl und Anordnung

der Darmkrypten als Maß für die Organhomöostase und Funktionalität dienen, da das Darmepithel ständig durch in den Krypten lokalisierte Stammzellaktivität erneuert wird.

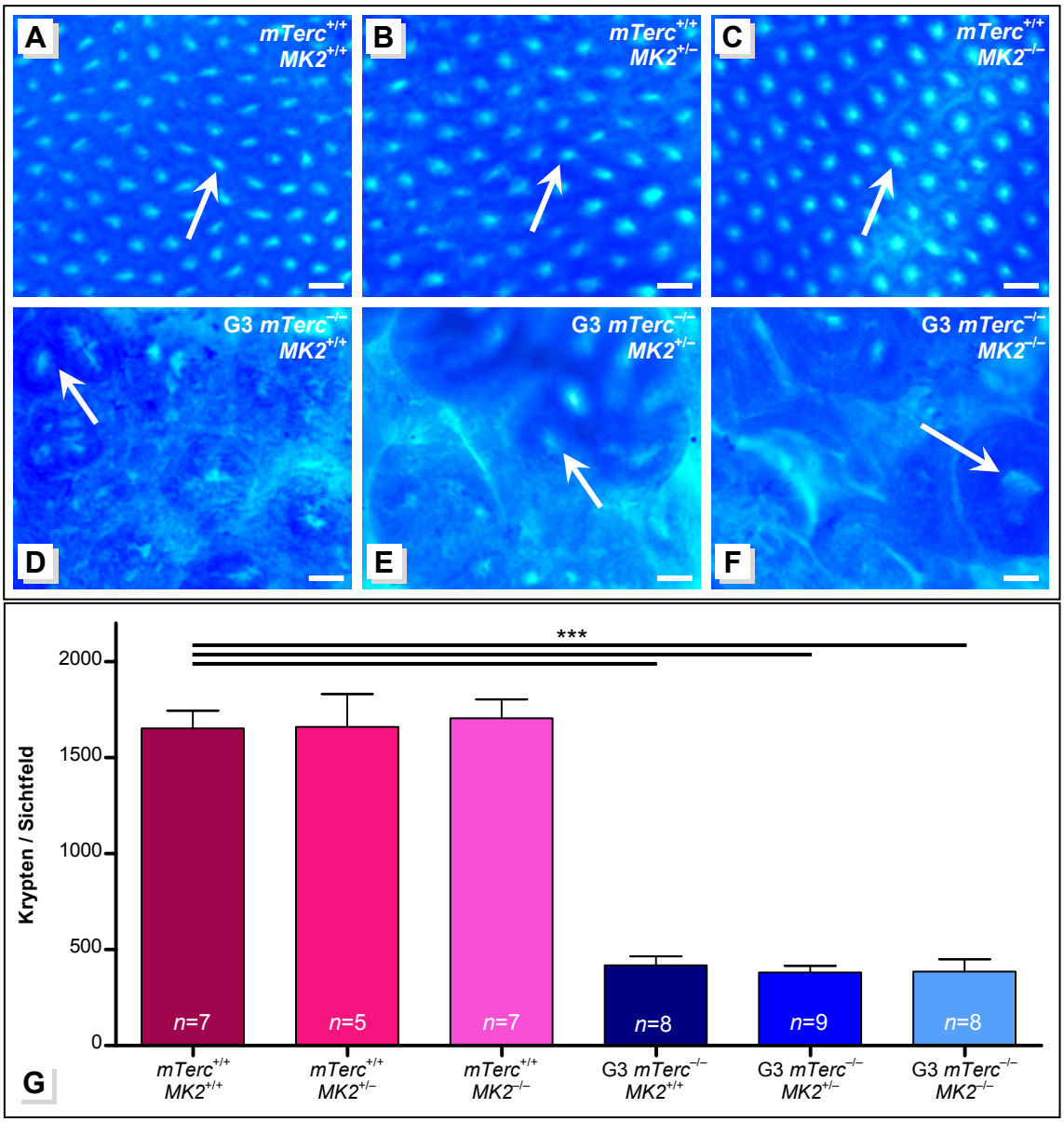

Abb. 23. Der strukturelle Schaden des Telomerase-defizienten Dickdarms ist von der MK2-Expression unabhängig. A-F) Repräsentative Bilder von Methylenblau-gefärbten *Whole Mount*-Präparationen des Dickdarms von Mäusen der angegebenen Genotypen. Gezeigt sind Ausschnitte mit 1/16 der Fläche, auf der Kolonkrypten ausgezählt wurden; Pfeile zeigen auf Krypten. Größenbalken entsprechen 500 µm. G) Auszählung der Dickdarmkrypten. Siehe Tabelle 2, Anhang.

Alle Telomerase-Wildtypmäuse zeigten unabhängig vom *MK2*-Status ($mTerc^{+/+}$ $MK2^{+/+}$, $mTerc^{+/+}$ $MK2^{+/–}$, $mTerc^{+/+}$ $MK2^{–/–}$) eine regelmäßige und dichte Verteilung der Krypten im Kolon (Abb. 23 A-C). Auch die Anzahl der Krypten pro Flächeneinheit war in diesen Tieren sehr ähnlich (Abb. 23 G). Das Bild des Kolons in den 14 bis 16 Monate alten Telomerase-defizienten Gruppen (G3 $mTerc^{–/–}$ $MK2^{+/+}$, G3 $mTerc^{–/–}$ $MK2^{+/–}$, G3

mTerc$^{-/-}$ *MK2*$^{-/-}$) war ebenfalls unabhängig vom *MK2*-Status – die Verteilung der Krypten war hier aber sehr unregelmäßig, die Krypten vergrößert (Abb. 23 D-F) und die Anzahl der Krypten pro Flächeneinheit stark reduziert im Vergleich zu den Därmen von Tieren mit funktioneller Telomerase (Abb. 23 G). Telomerase-defiziente Tiere jüngeren Alters zeigen ebenfalls keine Kryptenatrophie.

Im Dünndarm zeigte sich ein ähnliches Bild wie im Kolon: Villi und Krypten waren bei Mäusen mit funktioneller Telomerase (*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/+}$, *mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/-}$, *mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{-/-}$) regelmäßig und dicht über den Darmquerschnitt verteilt (Abb. 24 A-C), wohingegen in den Dünndärmen Telomerase-defizienter Mäuse (G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/+}$, G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/-}$, G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{-/-}$) im Alter von 14 bis 16 Monaten abschnittsweise weder Krypten noch Villi zu finden und die Krypten stark vergrößert waren (Abb. 24 D-F). Diese Krypten- und Villusatrophie des Dünndarms war wie auch im Dickdarm unabhängig von der Stärke der MK2-Expression.

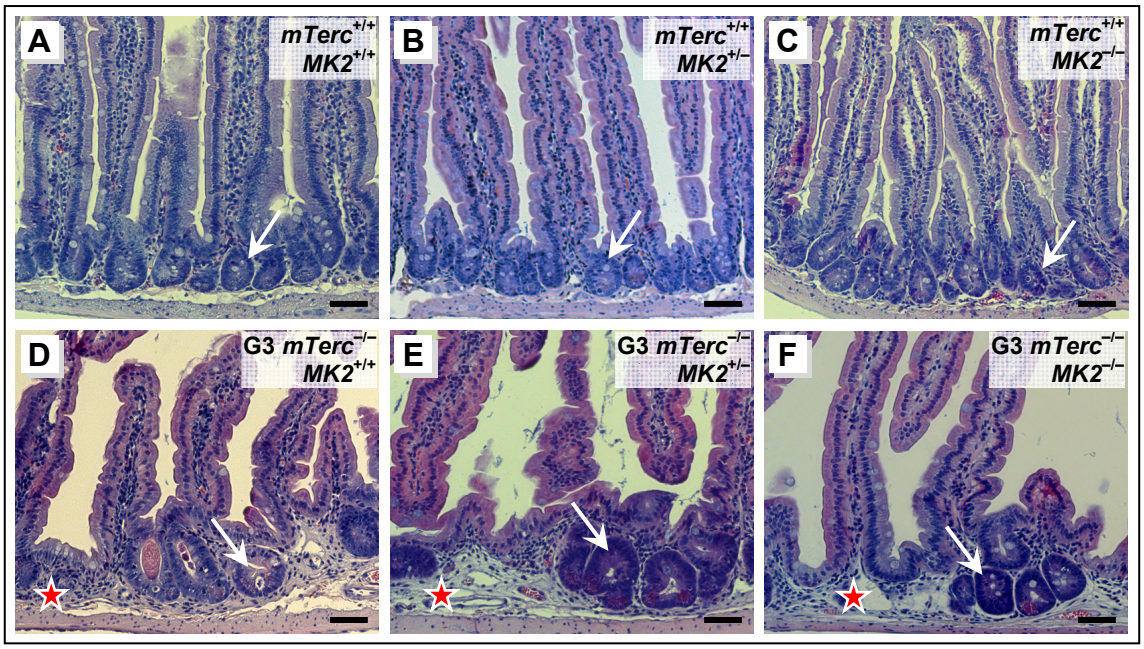

Abb. 24. *MK2*-Defizienz mildert die Strukturschädigung des Dünndarms in *mTerc*$^{-/-}$-Mäusen nicht. Beispielbilder von H&E-gefärbten Dünndärmen von Mäusen der angegebenen Genotypen; Pfeile zeigen auf Krypten, Sterne auf kryptenfreie Zonen. Größenbalken entsprechen 200 µm.

3.1.4. *MK2*-Defizienz verringert die Akkumulation der Schlüsselmoleküle des DNS-Schädigungssignalweges p53 und p21

Die Schädigung der Darmmorphologie in Telomerase-defizienten Tieren wurde durch das Fehlen der MAPKAP-Kinase 2 nicht verändert, konnte also für die geringeren

Körpergewichte der Doppelknockout-Tiere nicht verantwortlich sein, weshalb im Folgenden auf die Funktion der Zellen eingegangen wurde.

Kritisch kurze Telomere, wie sie in Telomerase-defizienten Mäusen in vielen Zellen auftreten, werden von spezialisierten Molekülen als DNS-Schaden erkannt. Die daraufhin aktivierte Signalkaskade beinhaltet die Aktivierung und Akkumulation der Proteine p53 und p21, wobei die p21-Expression durch p53 angeregt wird (siehe Abb. 3). Da MK2 neben Chk1 und Chk2 als Zellzyklus-Kontrollpunktkinase beschrieben worden ist, sollte der Einfluss der *MK2*-Defizienz auf Telomer-verkürzungsinduzierte DNS-Schädigungssignale in Darmzellen untersucht werden.

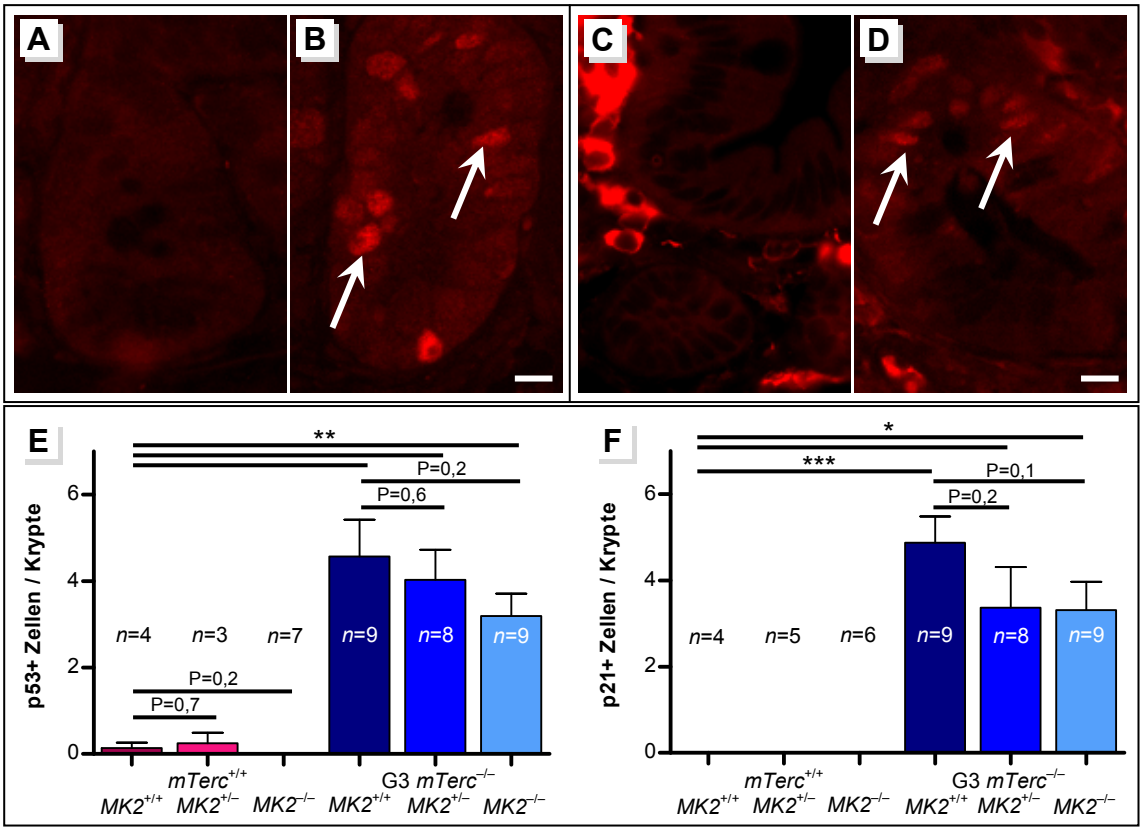

Abb. 25. Die Aktivierung von DNS-Schädigungssignalen im Dünndarm von *mTerc*$^{-/-}$-Mäusen ist bei Fehlen von *MK2* verringert. Repräsentative Bilder A-B) einer p53-Färbung und C-D) einer p21-Färbung. A) p53-negative und B) p53-positive Zellkerne (Pfeile). C) p21-negative und D) p21-positive Zellkerne (Pfeile). Größenbalken entsprechen 20 µm. Auszählung von E) p53-positiven und F) p21-positiven Zellen pro Krypte im Dünndarm. Siehe Tabelle 2, Anhang.

Wie erwartet konnten in Telomerase-defizienten Mäusen mit kritisch kurzen Telomeren (G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/+}$, G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/-}$, G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{-/-}$) sowohl p53- als auch p21-positive Darmkryptenzellen im Gewebe gefunden werden. In vergleichbaren Zellen von Telomerase-Wildtypmäusen (*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/+}$, *mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/-}$, *mTerc*$^{+/+}$

MK2$^{-/-}$) fanden sich dagegen so gut wie keine Zellen, die p53 oder p21 exprimierten (Abb. 25 E-F). Innerhalb der Telomerase-defizienten Gruppe gab es keine signifikanten Unterschiede, es ließ sich jedoch ein Trend dahingehend beobachten, dass sich der Verlust von *MK2* dosisabhängig (G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/-}$ und G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{-/-}$) negativ auf die Aktivierung des DNS-Schädigungssignalweges auswirkte und zu einer verminderten Aktivierung von p53 und p21 beitrug.

3.1.5. Das Fehlen der MAPKAP-Kinase 2 führt zum vermehrten Auftreten chromosomaler Fusionen in Telomerase-profizienten Mäusen

Ob sich der Einfluss von MK2 auf die DNS-Schädigungssignale bis zum Zyklusarrest bzw. bis zur DNS-Reparatur ausdehnt, sollte anhand des Auftretens von Anaphasenbrücken überprüft werden. Nachdem DNS-Strangbrüche und als solche erkannte dysfunktionelle Telomere durch Endenfusion „repariert“ worden sind, kann man diese Fusionen als Anaphasenbrücken im Mikroskop erkennen.

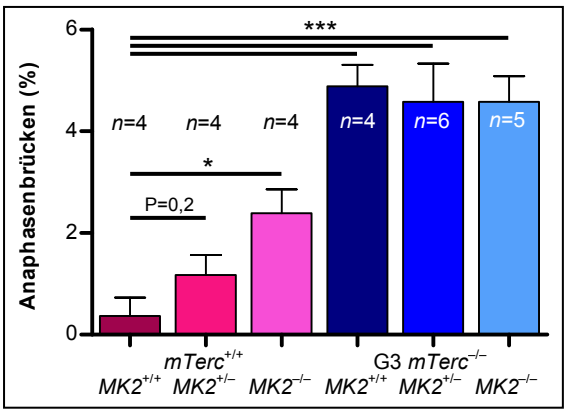

Abb. 26. *MK2*-Deletion führt zu chromosomaler Instabilität. Anaphasenbrücken in Kryptenzellen des Dünndarms als prozentualer Anteil an allen gefundenen Anaphasen. Siehe Tabelle 2, Anhang.

Telomerase-defiziente Kryptenzellen (G3 *mTerc*$^{-/-}$) mit kurzen Telomeren wiesen unabhängig vom MK2-Status ein hohes Maß an chromosomaler Instabilität auf. Die Zahl der Anaphasenbrücken in Telomerase-Knockout-Zellen war im Vergleich zu Wildtypzellen (*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/+}$) signifikant erhöht. In Mäusen mit funktioneller Telomerase aber war ein *MK2*-Dosiseffekt zu erkennen: je weniger MAPKAP-Kinase 2 exprimiert wurde, desto mehr Anaphasenbrücken traten auf – bei völligem Fehlen der Kinase (*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{-/-}$) sogar signifikant mehr als in Wildtypzellen (*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/+}$, Abb. 26). Da das strukturelle Erscheinungsbild des Darms in *MK2*-Knockout-Mäusen trotz vermehrt auftretender Anaphasenbrücken jedoch dem der Wildtypmäuse glich, wurden weiterführende Analysen hinsichtlich chromosomaler Instabilität und Aneuploidie wie CGH und Chromosomen-FISH nicht durchgeführt.

Zusammenfassend hatte MAPKAP-Kinase 2 im Darm von Mäusen mit dysfunktionellen Telomeren keinen Einfluss auf die hier auftretende chromosomale Instabilität und die strukturelle Schädigung. Beim Vorliegen funktioneller Telomere aber führte das Ausschalten dieser Kinase allein schon zu vermehrt auftretenden chromosomalen Fusionen. Obwohl hierbei keine Aktivierung der p53- und p21-vermittelten DNS-Schädigungsreaktion der Zellen festgestellt werden konnte, hatte das Fehlen der MAPKAP-Kinase 2 beim Vorliegen kritisch kurzer Telomere einen mildernden Einfluss auf die Aktivierung dieser Signalkaskade.

3.2. Metabolismus

Auf Grund der signifikant niedrigeren Körpergewichte der *MK2*-defizienten Tiere und aller Gruppen Telomerase-defizienter Mäuse (Abb. 22), wurden in diesen Tieren einige Komponenten und Abläufe des Kohlenhydrat- und Lipidmetabolismus untersucht.

3.2.1. Die Deletion von *MK2* führt zu niedrigen Blutzuckerspiegeln und gesteigerter Glucose-Toleranz vor allem in Telomerase-defizienten Mäusen

Das bei der Mausnekropsie routinemäßig entnommene (EDTA-)Blut wurde mittels Glucometer auf den Blutzuckergehalt untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass *MK2*-Knockout-Tiere ($mTerc^{+/+}$ $MK2^{-/-}$) bedeutend weniger Glucose im Blut hatten als Wildtyptiere. Telomerase-Knockout-Tiere (G3 $mTerc^{-/-}$ $MK2^{+/+}$) zeigten eine noch stärkere, signifikante Reduktion in den Blutzuckerspiegeln, wobei wiederum *MK2*-Knockout-Tiere (G3 $mTerc^{-/-}$ $MK2^{-/-}$) die niedrigsten Werte hatten (Abb. 27 A).

Das Blut der oben beschriebenen Tiere wurde morgens zwischen 9 und 11 Uhr entnommen und untersucht, nachdem die Tiere im Labor wach und aktiv waren. Im Blut von Tieren, die sich in der Tierhaltung befanden und zwischen 14 und 15 Uhr schliefen, zeigte sich ein ähnlicher Phänotyp, wenn auch bedeutend schwächer ausgeprägt: Telomerase-defiziente Tiere hatten zwar nicht signifikant, aber doch sichtbar reduzierte Blutzuckerwerte im Vergleich zu Telomerase-Wildtyptieren, wobei Tiere ohne *MK2* ($mTerc^{+/+}$ $MK2^{-/-}$, G3 $mTerc^{-/-}$ $MK2^{-/-}$) niedrigere Werte hatten als Tiere mit *MK2* ($mTerc^{+/+}$ $MK2^{+/+}$, G3 $mTerc^{-/-}$ $MK2^{+/+}$, Abb. 27 B).

In Glucose-Toleranztests mit Mäusen der verschiedenen Genotypen wurde festgestellt, dass Telomerase-Knockout-Mäuse (G3 $mTerc^{-/-}$ $MK2^{+/+}$) eine verbesserte Glucose-Toleranz im Vergleich zu Wildtypmäusen ($mTerc^{+/+}$ $MK2^{+/+}$) zeigten, wobei dieser Unterschied nicht signifikant war (Abb. 28). Bei fehlender MK2-Expression im Wildtyphin-

tergrund (*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{-/-}$) war die Glucose-Toleranz ebenfalls leicht erhöht, im Telomerase-defizienten Hintergrund (G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{-/-}$) so sehr, dass die Blutzuckerwerte 30 Minuten nach Glucose-Injektion kaum auf die Hälfte der Wildtypwerte angestiegen waren und sich dadurch signifikant von diesen unterschieden (Abb. 28).

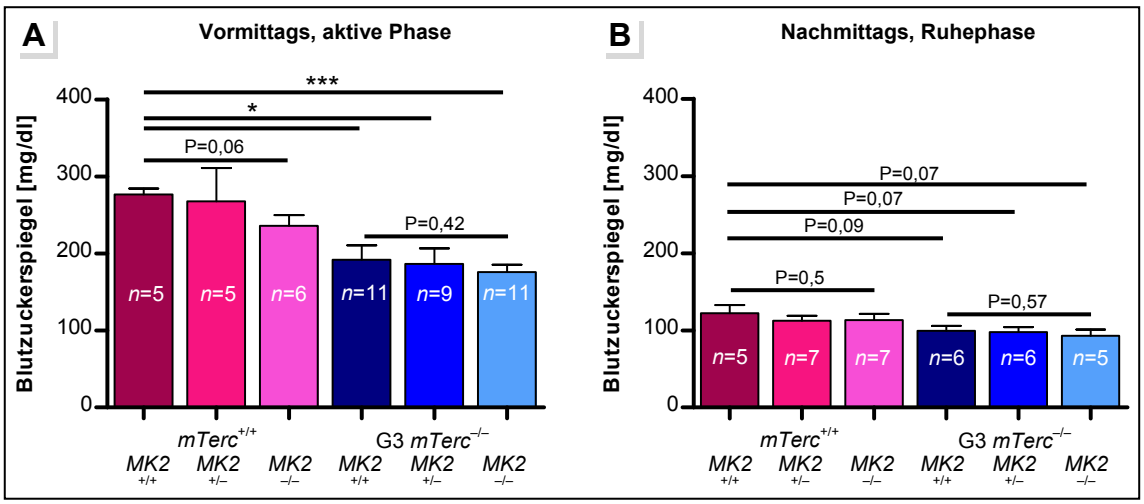

Abb. 27. *MK2*-Defizienz senkt den Blutzuckerspiegel. Blutzucker von Mäusen der angegebenen Genotypen A) in der aktiven Phase (Untersuchungsalter der Tiere 14-16 Monate), B) in der Ruhephase (Untersuchungsalter der Tiere 12-14 Monate). Siehe Tabelle 3, Anhang.

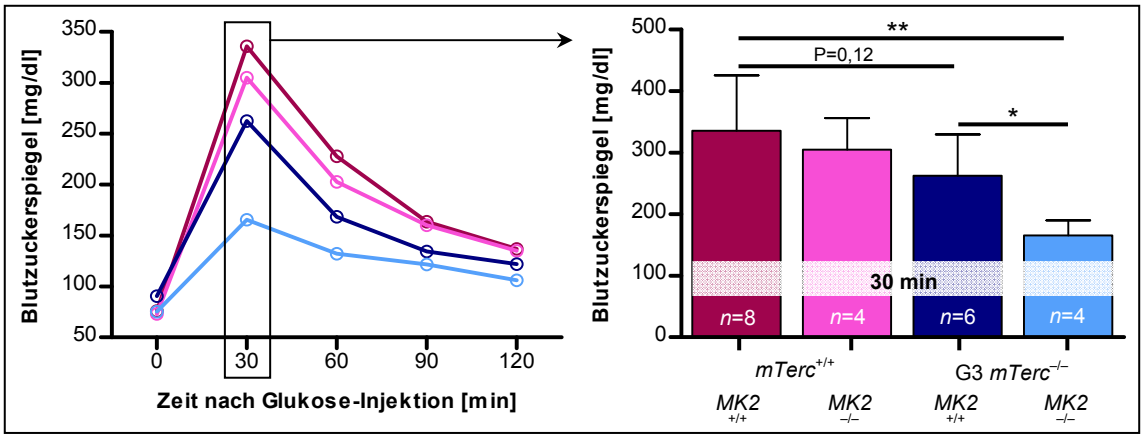

Abb. 28. *MK2*$^{-/-}$-Mäuse zeigen eine verbesserte Glucose-Toleranz. Links: zeitliche Änderung des Blutzuckerspiegels nach i.p. Glucose-Injektion beim Toleranztest. Rechts: Blutzuckerspiegel 30 Minuten nach Glucose-Injektion. Die untersuchten Tiere waren zwischen 12 und 15 Monate alt. Siehe Tabelle 3, Anhang.

3.2.2. *MK2*-Defizienz hat keinen Einfluss auf die Energiespeicherung in der Leber

Zucker werden in der Leber und im Muskel in Form von Glykogen gespeichert. Bei Bedarf wird das Glykogen der Leber wieder gespalten und dem Gesamtorganismus über das Blut zur Verfügung gestellt – Muskelglykogen wird nur vom Muskel genutzt. Beide hier untersuchten Telomerase-defizienten Gruppen hatten im Alter von etwa 14 Monaten unabhängig vom Status der MK2-Expression (G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/+}$ / *MK2*$^{-/-}$) im

Vergleich zur Wildtypkontrolle reduzierte Glykogenmengen in der Leber gespeichert (Abb. 29 A). Die Glykogenkonzentration im Muskel der Telomerase-Knockout-Tiere (G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/+}$) war ebenfalls leicht reduziert. *MK2*-defiziente Mäuse dagegen zeigten im Muskel eine erhöhte Glykogenkonzentration, sowohl bei Telomerase-Profizienz als auch bei -Defizienz (*mTerc*$^{+/+}$ / G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{-/-}$, Abb. 29 B).

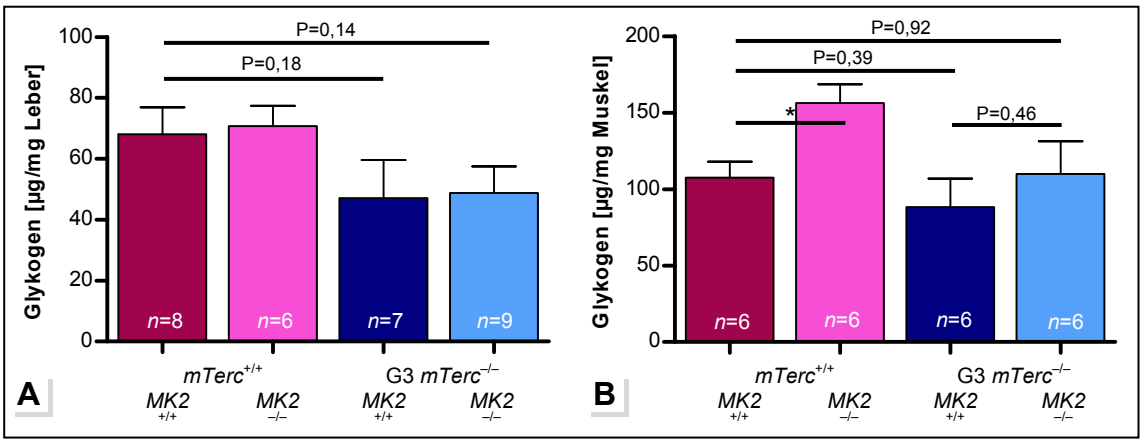

Abb. 29. *MK2*-defiziente Tiere neigen zur vermehrten Glykogenspeicherung. Glykogen A) in Leber und B) im Muskel von Mäusen der angegebenen Genotypen. Die für diese Analyse herangezogenen Tiere waren zwischen 13,5 und 14,5 Monate alt. Siehe Tabelle 4, Anhang.

Nahrungsfette und Kohlenhydrate können auch in Form von Fett (Triglyceriden) in Vakuolen der Adipozyten und Hepatozyten gespeichert werden, wie das bei Wildtyp- und *MK2*-Knockout-Lebern mittels Oil-Red-O-Färbung gezeigt werden konnte (Abb. 30 A-B). Telomerase-defiziente Tiere hatten weniger bis keine Fettvakuolen in ihren Hepatozyten und zwar unabhängig vom Status der MK2-Expression (Abb. 30 C-F).

3.2.3. Eine Glucose-reiche Diät verlängert das Leben Telomerase-defizienter Mäuse

Auf Grund des geschädigten Darms (Abb. 23 und 24) könnte der Hungerzustand Telomerase-defizienter Mäuse eine Folge mangelnder Kohlenhydratverdauung und damit verminderter Nährstoffresorption sein und durch Fütterung mit Glucose-reichem Futter (GF) gemildert werden. Die Lebensdauer Telomerase-defizienter Mäuse mit und ohne MK2-Expression konnte durch die Fütterung dieser Diät ab einem Alter von 13,5 Monaten signifikant verlängert werden. Lag das durchschnittlich erreichte Alter der G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/+}$ -Tiere auf Normalfutter bei 13,7 Monaten, lebten diese Tiere auf Glucose-reichem Futter durchschnittlich 17,2 Monate lang (Abb. 31 A). Telomerase-defiziente *MK2*-heterozygote oder -defiziente Tiere lebten bei Normalfütterung durchschnittlich 14,9 , mit Glucose-reicher Diät 15,5 bzw. 16,2 Monate lang (Abb. 31 B-C).

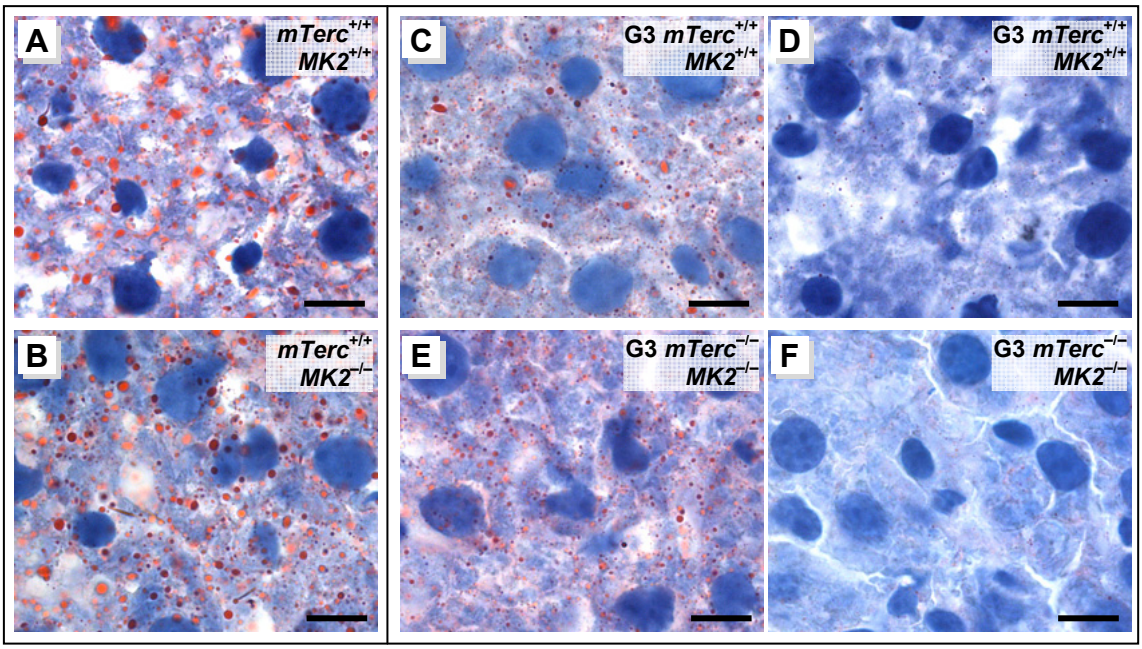

Abb. 30. *MK2*-Defizienz verbessert die Fettspeicherung in *mTerc*$^{-/-}$-Tieren nicht. Repräsentative Bilder von Oil-Red-O-gefärbten Gefrierschnitten der Leber von Mäusen der angegebenen Genotypen. Größenbalken entsprechen 10 µm. Rote Punkte sind Fettvakuolen, Hintergrundblaufärbung Hämatoxylin.

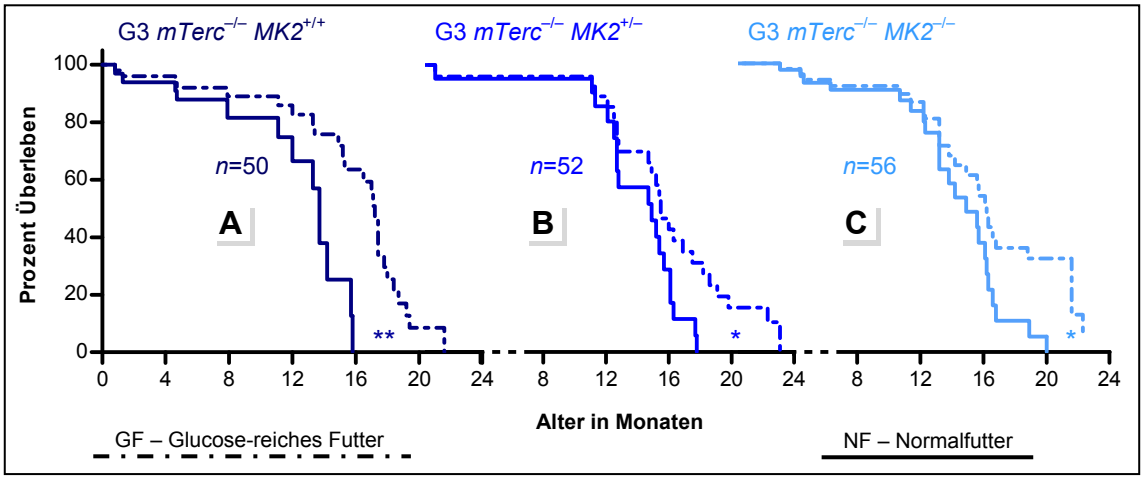

Abb. 31. Die Lebensdauer von *mTerc*$^{-/-}$-Mäusen wird mit einer Diät aus Glucose-reichem Futter unabhängig von MK2 verlängert. Überlebenskurve nach Kaplan-Meier für die angegebenen Genotypen auf Normalfutter (siehe Abb. 21) oder auf Glucose-reichem Futter.

3.2.4. Auch auf Glucose-reicher Diät haben *MK2*$^{-/-}$-Tiere niedrigen Blutzucker

Die Blutzuckerwerte aller Tiere, die mit einer Glucose-reichen Diät gefüttert wurden, waren signifikant erhöht im Vergleich zu den Blutzuckerwerten bei Fütterung mit Normalfutter (Abb. 27 A). Dabei waren die Werte der Telomerase-defizienten Tiere (G3 *mTerc*$^{-/-}$) auch hier signifikant niedriger als die der Telomerase-Wildtyptiere (*mTerc*$^{+/+}$). Der Einfluss von MK2 war der gleiche wie bei Normalfutter, aber bei Glucose-reichem Futter noch ausgeprägter: bei reduzierter und fehlender MK2-Expression (*MK2*$^{+/-}$ und

MK2$^{-/-}$) waren die Blutzuckerspiegel im Vergleich zu den jeweiligen MK2-exprimierenden Gruppen (*MK2*$^{+/+}$) teils sogar signifikant niedriger (Abb. 32).

Während eine reduzierte *MK2*-Dosis bei Fütterung mit Normalfutter keinen Einfluss auf die Glykogenspeicherung in der Leber hatte (Abb. 29), zeigten *MK2*-defiziente Tiere (*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{-/-}$ und G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{-/-}$) auf Glucose-reichem Futter leicht verminderte Glykogenkonzentrationen im Vergleich mit der jeweiligen Kontrollgruppe (*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/+}$ und G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/+}$). Telomerase-defiziente Tiere (G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/+}$) hatten nach Fütterung von Glucose-reichem Futter im Vergleich zu Wildtyptieren (*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/+}$) verhältnismäßig sogar noch weniger Glykogen in der Leber als bei Normalfütterung (GF: 1 zu 0,5 bzw. NF: 1 zu 0,7; Abb. 33).

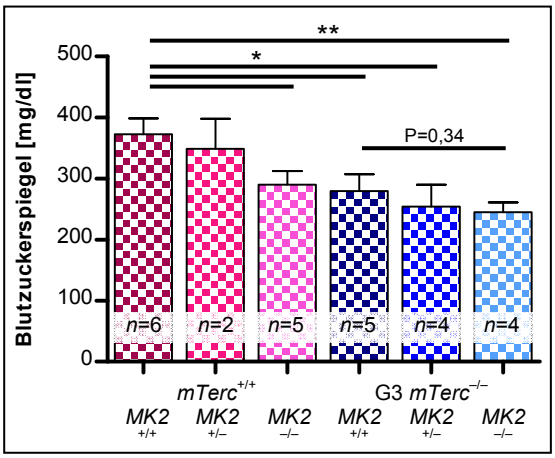

Abb. 32. *MK2*-Defizienz senkt den Blutzuckerspiegel auch bei Glucose-reicher Diät. Glucose im Blut von Mäusen der angegebenen Genotypen auf Glucose-reicher Diät (in der aktiven Phase). Siehe Tabelle 3, Anhang.

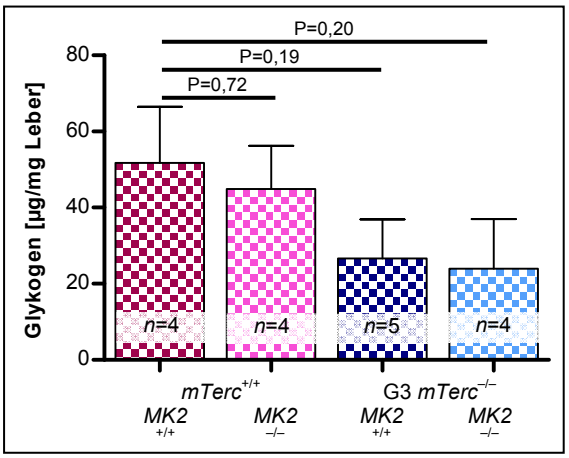

Abb. 33. Auf Glucose-reicher Diät neigen *MK2*$^{-/-}$ Tiere zur verminderten Glykogenspeicherung. Glykogen in der Leber von Mäusen der angegebenen Genotypen auf Glucose-reicher Diät. Siehe Tabelle 4, Anhang.

3.2.5. *MK2*-Defizienz schwächt die Expression des Insulin-Rezeptors nur leicht

In Antwort auf Nahrungszufuhr wird vom Körper vermehrt Insulin ausgeschüttet, das an Insulin-Rezeptoren bindet und unter anderem die Glucoseaufnahme aus dem Blut ins Gewebe ermöglicht. Da Telomerase- und/oder *MK2*-Knockout-Tiere im Vergleich zum Wildtypen eine mehr oder weniger erhöhte Glucose-Toleranz, d.h. eine vermehrte Klärung von Glucose aus dem Blut zeigten (Abb. 28), wurde die Insulin-Rezeptorexpression in der Leber untersucht.

Unter Fütterung mit Normalfutter hatten *MK2*-defiziente Tiere (*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{-/-}$ und G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{-/-}$) etwas geringere Mengen Insulin-Rezeptor in ihren Leberzellen verglichen mit den jeweiligen Kontrolltieren mit MK2-Expression (*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/+}$

und G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/+}$). Telomerase-Defizienz allein hatte keinen Einfluss auf die Expressionsstärke des Insulin-Rezeptors. Bei Fütterung mit Glucose-reichem Futter war die Expression des Insulin-Rezeptors in der Leber aller Genotypen leicht reduziert im Vergleich zu Normalfutterbedingungen (Abb. 34 A-B).

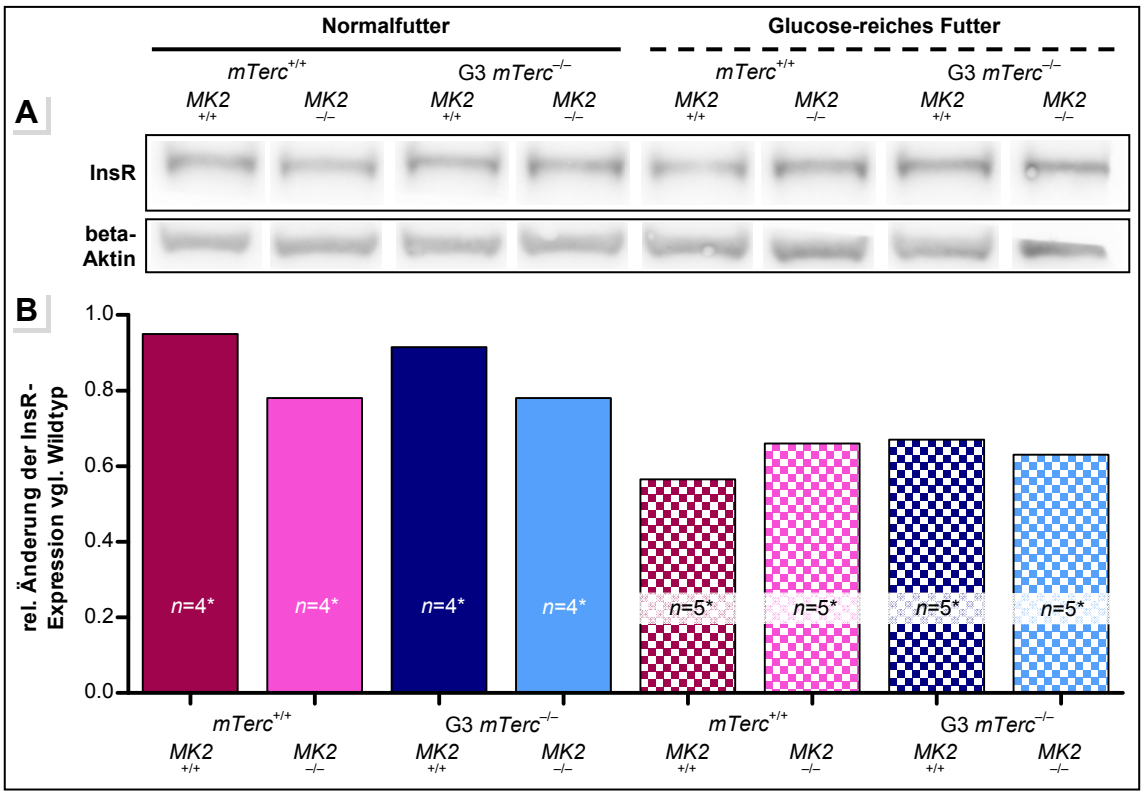

Abb. 34. *MK2*-defiziente Mäuse exprimieren weniger Insulin-Rezeptor in der Leber. Western Blot auf Leberproteinlysaten von Mäusen der angegebenen Genotypen in Pools* von jeweils 4 bis 5 Organen pro Bahn und Genotyp. A) Chemilumineszenzdetektion für Insulin-Rezeptor (InsR) und Referenzprotein beta-Aktin. B) Auswertung und Normalisierung der Chemilumineszenzintensität der einzelnen Proteinbanden gegen Aktin, relative Änderung im Vergleich zum Wildtyp, dessen Wert gleich eins gesetzt wurde (Auswertung aus zwei Western Blots).

3.2.6. *MK2*-Defizienz unterdrückt auch die Expression von PEP-CK

Die über die Gluconeogenese aus körpereigenen Fetten und Aminosäuren (Proteo- und Lipolyse) gewonnene Glucose dient neben der Glucose aus der Glykogenolyse der Sicherstellung der Energiezufuhr bei mangelnder Nahrungsaufnahme. Da im Vergleich zum Wildtypen in allen anderen Genotypen der Blutzuckerspiegel niedrig war, wurde die Expression eines Schlüsselenzyms der Gluconeogenese, der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEP-CK) untersucht.

Telomerase-defiziente Mäuse mit intaktem *MK2* (G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/+}$) zeigten im Vergleich zum Wildtypen (*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/+}$) eine leicht erhöhte Expression der PEP-CK in

der Leber, wobei diese bei Glucose-Überangebot in beiden Genotypen zurückging. Das Fehlen von *MK2* führte in Telomerase-defizienten und -profizienten Mäusen (*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{-/-}$, G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{-/-}$) zu einer um ein Drittel reduzierten PEP-CK-Expression, die aber bei Glucose-reicher Diät nicht weiter zurückging (Abb. 35 A-B).

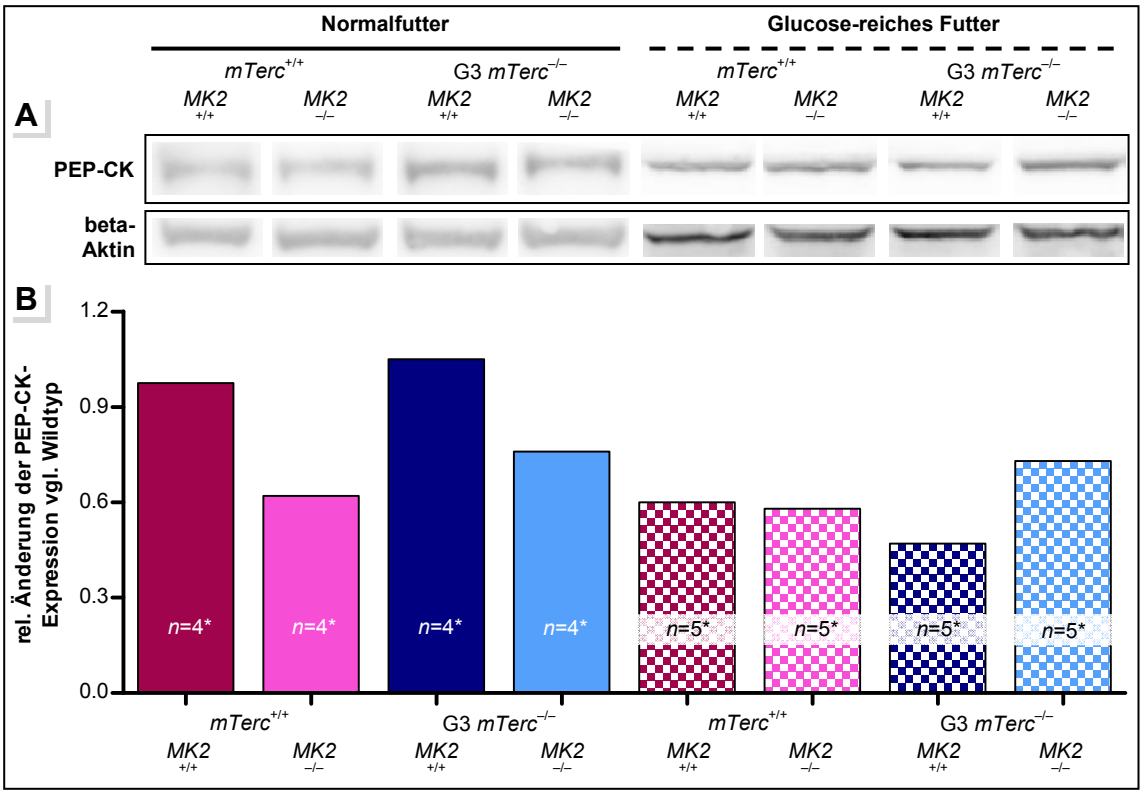

Abb. 35. *MK2*-Deletion führt zur verminderten Expression der gluconeogenetischen PEP-CK. Western Blot auf Leberproteinlysaten von Mäusen der angegebenen Genotypen in Pools* von jeweils 4 bis 5 Organen pro Bahn und Genotyp. A) Chemilumineszenzdetektion der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEP-CK) und beta-Aktin. B) Auswertung und Normalisierung der Chemilumineszenzintensität einzelner Proteinbanden gegen Aktin, relative Änderung im Vergleich zum Wildtyp, dessen Wert eins gesetzt wurde.

3.2.7. Fehlende MAPKAP-Kinase 2 verstärkt die Überexpression von Wachstumshormon in Telomerase-defizienten Mäusen, hat aber auf IGF-1 keinen Einfluss

Hunger und Stress, wie Telomerase-defiziente Tiere sie erfahren, stimulieren die Sekretion von Wachstumshormon (GH, *Growth Hormone*) durch die Hypophyse. GH wiederum stimuliert die Sekretion von IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor 1*) in der Leber. Da beide Faktoren neben dem Insulin ebenfalls großen Einfluss auf metabolische Prozesse haben, wurden sie mittels ELISA im Blutplasma der Mäuse untersucht.

Im Blutplasma Telomerase-defizienter Mäuse (G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/+}$), deren Diät aus Normalfutter bestand, fand sich etwa 10 mal mehr Wachstumshormon (GH) als im Plasma von Wildtypmäusen (*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/+}$). In ähnlichem Maße, wie *MK2*-Hetero-

zygotie bzw. -Knockout die GH-Level im Blutplasma von Telomerase-Wildtypmäusen erhöhten (*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/-}$ 2,5 mal und *mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{-/-}$ fast 4 mal mehr GH als *mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/+}$), waren bei abnehmender MK2-Expression die GH-Level auch im Blutplasma Telomerase-defizienter Mäuse weiter erhöht (G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/-}$ 11,5 mal und G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{-/-}$ 13 mal mehr GH als *mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/+}$, Abb. 36 A).

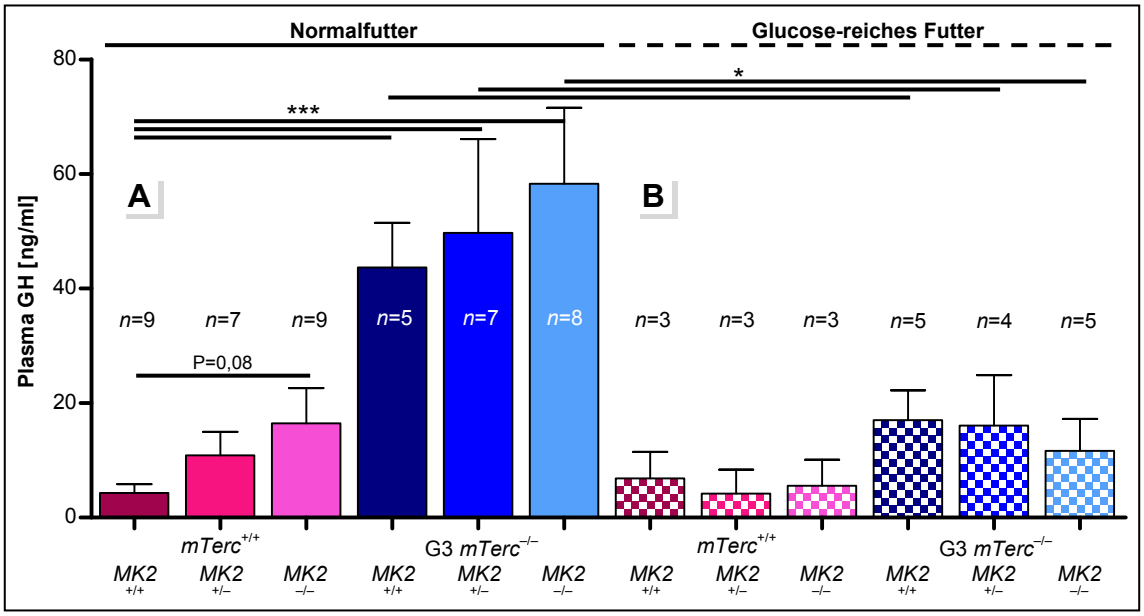

Abb. 36. Der *MK2*-Knockout potenziert die Überexpression des Wachstumshormons in *mTerc*$^{-/-}$-Mäusen. GH (*Growth Hormone*, Wachtumshormon) im Blutplasma von Mäusen der angegebenen Genotypen detektiert mittels ELISA. Siehe Tabelle 5, Anhang.

Die Diät aus Glucose-reicher Nahrung verringerte die Konzentration des Wachstumshormons im Blutplasma von Mäusen aller Genotypen außer im Wildtypen (*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/+}$), dessen Hormonkonzentration genauso niedrig blieb wie auf Normalfutter. In *MK2*-heterozygoten und *MK2*-homozygot-deletierten Mäusen (*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/-}$, *mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{-/-}$) waren die GH-Konzentrationen hier auf Wildtypniveau, im Blutplasma aller drei Gruppen Telomerase-defizienter Mäuse nur noch 1,7 bis 2,5 mal höher als im Wildtypplasma (G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/+}$ / *MK2*$^{+/-}$ / *MK2*$^{-/-}$, Abb. 36 B).

In allen Telomerase-defizienten Gruppen waren die IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1*)-Level im Blutplasma im Vergleich zu Telomerase-Wildtypmäusen signifikant reduziert. *MK2*-Heterozygotie führte in beiden Gruppen zu einer leichten Reduktion der Werte, komplettes Fehlen von *MK2* hatte allerdings keinen einheitlichen Einfluss auf IGF-1 im Blutplasma (Abb. 37 A). Fütterung der Glucose-reichen Diät führte zu einer nennenswerten Reduktion der IGF-1-Werte nur in Wildtypen (*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/+}$) und in

den Telomerase-Doppelknockout-Mäusen (G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{-/-}$), im Blutplasma der Mäuse anderer Genotypen hatte diese Diät keinen Einfluss auf IGF-1 (Abb. 37 B).

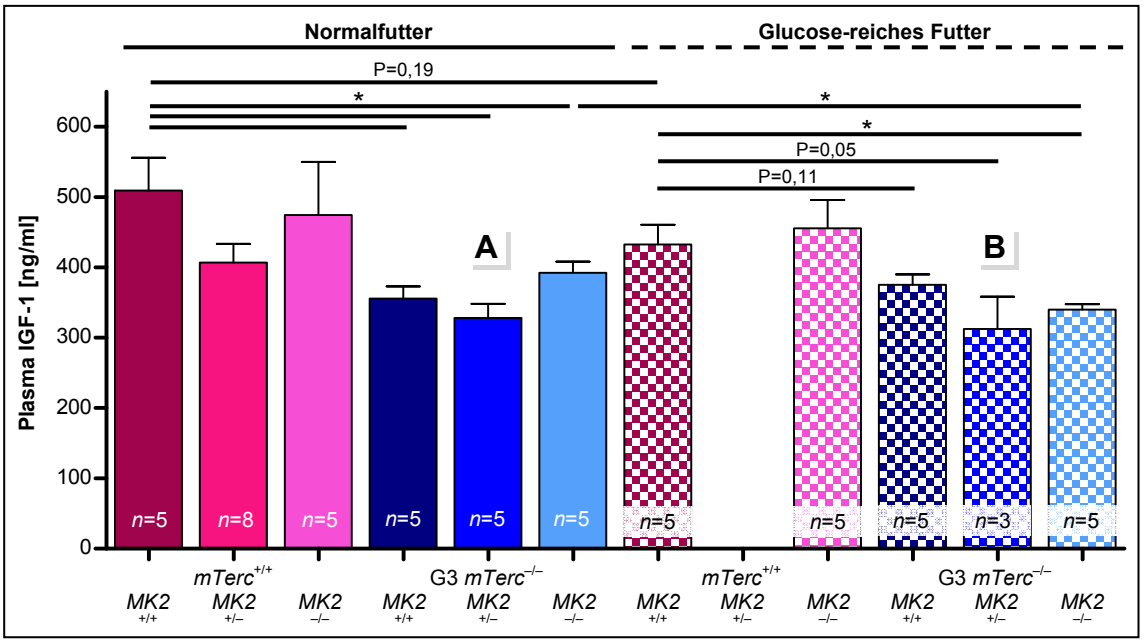

Abb. 37. Die MAPKAP-Kinase 2 hat keinen Einfluss auf den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor. IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1*) im Blutplasma von Mäusen der angegebenen Genotypen detektiert mittels ELISA. Siehe Tabelle 5, Anhang.

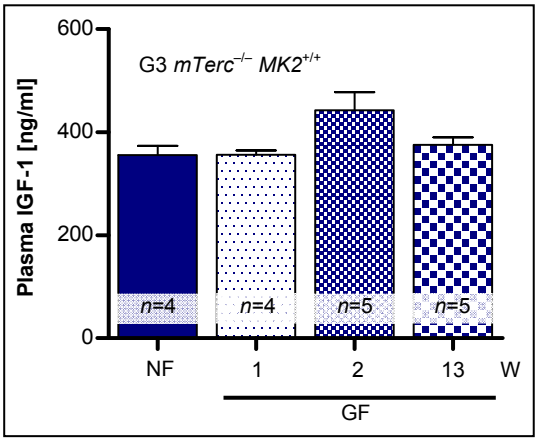

Abb. 38. Eine Glucose-reiche Diät kann den Hungerzustand nur kurzzeitig mildern. IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1*) im Blutplasma von Mäusen bestimmte Zeit nach der Diätumstellung von Normalfutter (NF) auf Glucose-reiches Futter (GF) detektiert mittels ELISA. W, Wochen.

Die Mäuse, deren IGF-1-Plasmaspiegel in Abbildung 37 dargestellt sind, waren bereits seit ca. 13 Wochen auf Glucose-Futter und zeigten hierbei keine Änderung im Vergleich zur Fütterung mit Normalfutter. In reinen Telomerase-Knockout-Tieren (G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/+}$) wurden die IGF-1-Plasmaspiegel in kürzeren Zeitabständen nach der Diätumstellung verfolgt und festgestellt, dass die IGF-1-Werte tatsächlich 2 Wochen nach dem Beginn der Fütterung mit Glucose-reichem Futter stiegen (und später wieder fielen, Abb. 38), was daraufhin deutet, dass der Hungerzustand zumindest für einige Zeit durch die Futterumstellung gemildert werden konnte.

3.2.8. Der Verlust von *MK2* verstärkt die IGFBP-1-Expression

IGFBP-1 (*Insulin-like Growth Factor Binding Protein-1*) bindet zirkulierendes IGF-1. Es wirkt als endogener Inhibitor von IGF-1, verlängert aber auch die Halbwertszeit des IGFs. *MK2*-Defizienz ($mTerc^{+/+}$ $MK2^{-/-}$) erhöhte die IGFBP-1-Expression auf das etwa 1,5-fache verglichen mit der Wildtypkontrolle ($mTerc^{+/+}$ $MK2^{+/+}$), Telomerase-Defizienz auf das knapp Vierfache und der kombinierte *MK2*- und Telomerase-Knockout sogar auf das Fünffache (Abb. 39 A-B).

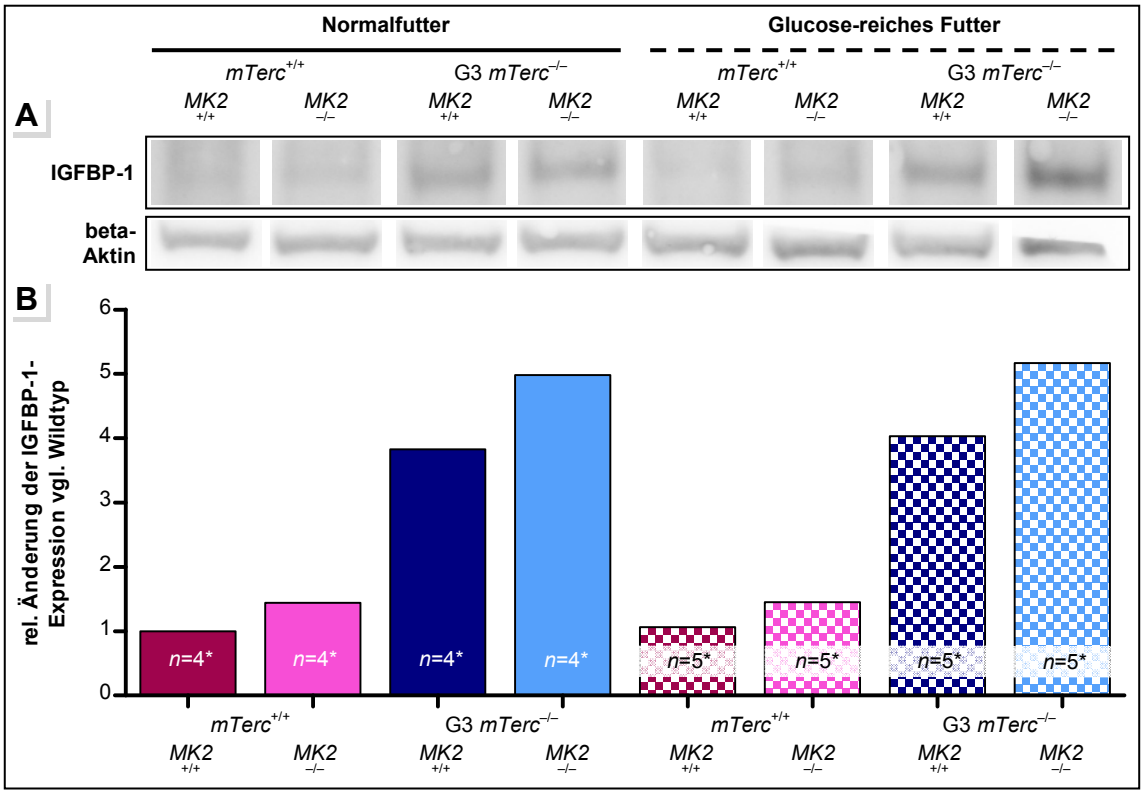

Abb. 39. Western Blot auf Leberproteinlysaten von Mäusen der angegebenen Genotypen in Pools* von jeweils 4 bis 5 Organen pro Bahn und Genotyp. A) Chemilumineszenzdetektion für IGFBP-1 (*Insulin-like Growth Factor Binding Protein-1*) und Referenzprotein beta-Aktin. B) Auswertung und Normalisierung der Chemilumineszenzintensität der einzelnen Proteinbanden gegen Aktin, relative Änderung im Vergleich zum Wildtyp, dessen Wert gleich eins gesetzt wurde.

Obwohl IGFBP-1 in der Lage ist, den Pool aus freiem IGF-1 zu reduzieren, wurde das hier so nicht nachgewiesen, denn das Plasma-IGF-1 wurde in Proben gemessen, in denen die Abdissoziation der IGFBPs herbeigeführt wurde – der hier gemessene Faktor war also absolutes IGF-1, nicht nur freies (Abb. 37). Telomerase-defiziente Tiere hatten also nicht nur weniger absolutes IGF-1, sondern durch das gehäufte IGFBP-1-Vorkommen auch weniger aktives IGF-1.

Mäuse ohne MAPKAP-Kinase 2 zeigten reduzierte Blutzuckerspiegel und eine erhöhte Glucose-Toleranz und verstärkten hierbei den Phänotyp der Telomerase-Defizienz in den Doppelknockout-Tieren. Auf die verringerte Energiespeicherung im Telomerase-defizienten Leber- und Fettgewebe hatte das Fehlen der Kinase aber keinen Einfluss. Die Fütterung einer Diät, die Glucose statt Mehrfachzucker bot, verlängerte die Lebensspanne aller Telomerase-Knockout-Tiere unabhängig von MK2. Die Expression des Insulin-Rezeptors und auch des gluconeogenetischen Enzyms PEP-CK war in Telomerase-defizienten Lebern nicht verändert, in MK2-deletierten Lebern jedoch reduziert. Obwohl die Wachstumshormonkonzentration im Blutplasma Telomerase-defizienter Mäuse um ein Vielfaches erhöht war, stieg IGF-1 nicht an, sondern war sogar reduziert, das inhibierende Bindeprotein IGFBP-1 wiederum vermehrt vorhanden. Der Verlust von MK2 potenzierte den Phänotyp der Mäuse mit kritisch kurzen Telomeren, indem Wachstumshormon und IGFBP-1 in Doppelknockout-Tieren in noch höheren Konzentrationen im Blutplasma vorlagen.

3.3. Hämatopoetisches System

Die Immunfunktion im Alter ist verändert: die hauptsächlich von den Lymphozyten vermittelte sog. adaptive Immunfunktion ist beeinträchtigt, das Risiko an myeloproliferativen Störungen wie Leukämien zu erkranken steigt und die sogenannten angeborenen (entzündungsvermittelnden) Immunmechanismen sind fehlreguliert. Bereits die Funktion der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen, aus denen sämtliche Immunzellen hervorgehen, ist im Alter beeinträchtigt (Abb. 5). Die verminderte Stammzellfunktion und die zur Myelopoese hin verschobene Hämatopoese im Telomerase-defizienten Alterungsmodell konnte bereits durch das Ausschalten von Komponenten des DNS-Schädigungssignalweges verbessert bzw. normalisiert werden (Choudhury et al., 2007; Schätzlein et al., 2007). Da auch die MAPKAP-Kinase 2 im diesem Zusammenhang beschrieben worden ist, wurde der *MK2*-Knockout im Telomerase-defizienten und -profizienten Hintergrund hinsichtlich der Hämatopoese untersucht.

3.3.1. *MK2*-Defizienz vermindert die Zellularität in Knochenmark und Milz

Im Knochenmark der Hinterläufe konnte ein Anstieg der Leukozytenzahl in Telomerase-Knockout-Mäusen (G3 $mTerc^{-/-}$ $MK2^{+/+}$) im Vergleich zu Wildtyptieren ($mTerc^{+/+}$ $MK2^{+/+}$) festgestellt werden (Abb. 40 A). Wurde MAPKAP-Kinase 2 im Kontext des Telomerase-Knockouts nur heterozygot oder gar nicht exprimiert (G3 $mTerc^{-/-}$ $MK2^{+/-}$,

G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{-/-}$), waren die Leukozytenzahlen im Knochenmark nicht mehr signifikant verschieden zur Kontrollgruppe. Ein ähnlicher, aber viel schwächerer Trend ließ sich auch innerhalb der Kontrollgruppe beobachten, wo die Verminderung und das Fehlen der MK2-Expression (*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/-}$, *mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{-/-}$) ebenfalls zu einem Sinken der Leukozytenzahl im Knochenmark führte.

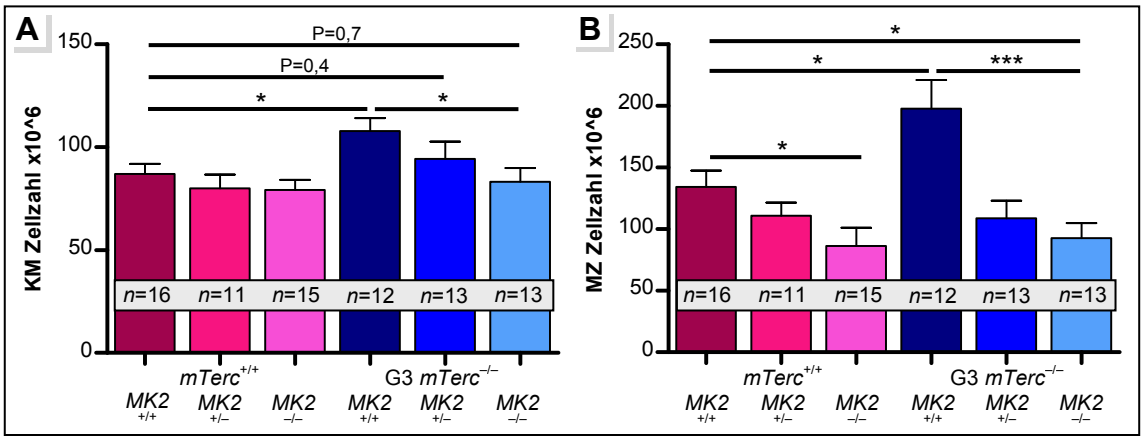

Abb. 40. Fehlende MK2 verringert die Zellularität von Milz und Knochenmark. Bestimmung der Zellzahl nach Erythrozytenlyse im Beinknochenmark (KM, A) und in der Milz (MZ, B) der angegebenen Genotypen. Siehe Tabelle 6 im Anhang.

Auch die Milz der Telomerase-Knockout-Mäuse (G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/+}$) hatte signifikant mehr Leukozyten als Wildtypmilzen (*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/+}$, Abb. 40 B). Sowohl im Telomerase-Wildtyp- als auch im Telomerase-Knockout-Hintergrund führte eine verminderte oder fehlende MK2-Expression (*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/-}$, *mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{-/-}$) zur Absenkung der Leukozytenzahl auf Werte weit unterhalb des Wildtypniveaus.

Da mit abnehmendem Körpergewicht (KG), wie es bei den *MK2*- und Telomerase-defizienten Tieren gemessen wurde (Abb. 22), zumindest auch bei letzteren die Körpergröße abnahm, wurden die in Knochenmark und Milz bestimmten Zellzahlen auf die Körpergewichte bezogen. *MK2*-Knockout-Mäuse (*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{-/-}$) hatten signifikant weniger Körpergewicht, doch die Zahl der weißen Knochenmarkszellen pro Gramm Körpergewicht ist leicht erhöht im Vergleich zu Wildtypmäusen. *MK2*-heterozygote Mäuse (*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/-}$) hatten erhöhtes Körpergewicht, verglichen mit Wildtypmäusen war jedoch die Zahl weißer Knochenmarkszellen pro Gramm Körpergewicht etwas geringer (Abb. 41 A). Obwohl alle Telomerase-defizienten Tiere (G3 *mTerc*$^{-/-}$) signifikant weniger Körpergewicht hatten als Wildtyptiere, konnte bei der Nekropsie der Versuchstiere keine Verminderung der Knochengröße festgestellt werden, jedoch war das Knochenmark auffällig blass. Da die Zellzählung nach der Auflösung der Ery-

throzyten stattfand, die im Telomerase-defizienten Knochenmark augenscheinlich weniger waren, konnte man hier verhältnismäßig mehr weiße Zellen erwarten (Abb. 41 A). MK2 spielte auch im Telomerase-Knockout-Hintergrund (G3 *mTerc*$^{-/-}$) kaum eine Rolle bei der Anzahl weißer Zellen im Knochenmark pro Gramm Körpergewicht, denn die Werte waren im Vergleich zum Wildtypknochenmark gleichermaßen fast auf das Doppelte erhöht.

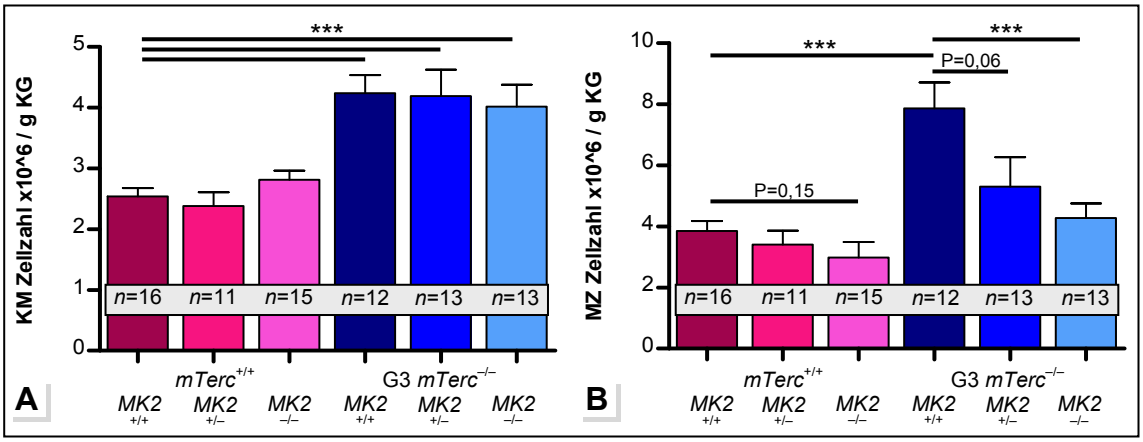

Abb. 41. *MK2*$^{-/-}$-Mäuse zeigen Hyposplenie. Zellzahl nach Erythrozytenlyse im Beinknochenmark (KM, A) und in der Milz (MZ, B) der angegebenen Genotypen bezogen auf das Körpergewicht (KG) des jeweiligen Tiers. Siehe Tabelle 6, Anhang.

Die Zahl weißer Zellen in der Milz änderte sich hinsichtlich des *MK2*-Status im Telomerase-Wildtyphintergrund (*mTerc*$^{+/+}$) nicht signifikant, es war jedoch eine Tendenz dahingehend zu beobachten, dass mit abnehmender MK2-Expression auch die Zellzahl pro Gramm Körpergewicht abnahm (Abb. 41 B). Telomerase-Knockout-Mäuse (G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/+}$) hatten extrem große Milzen, deren Zahl weißer Zellen pro Gramm Körpergewicht doppelt so hoch war wie bei Wildtypmilzen. Reduzierte MK2-Expression führte zu einer Verkleinerung der Milz, sodass die Zahl der weißen Milzzellen pro Gramm Körpergewicht in den Telomerase- und *MK2*-Doppelknockout-Mäusen (G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{-/-}$) der der Wildtypkontrolle ähnelte (Abb. 41 B).

3.3.2. Die Deletion von *MK2* hat nur wenig Einfluss auf das Blutbild

Neben der Aufgabe des Blutes Nährstoffe, Botenstoffe und Wärme im Körper zu transportieren, zirkulieren hier auch die im Knochenmark entstandenen hämatopoetischen Zellen, die im Fall der Leukozyten für die Immunfunktion verantwortlich sind, als Erythrozyten den Transport der Atemgase übernehmen und als Thrombozyten bei der Blutgerinnung von entscheidender Bedeutung sind.

Im Blut zeigte sich in allen Telomerase-Knockout-Tieren (G3 *mTerc*$^{-/-}$) eine Zunahme der Leukozyten (Abb. 42.1 A) wie auch der Thrombozyten (Abb. 42.1 B), wobei das Fehlen von *MK2* dosisabhängig noch zu einer Verstärkung dieses Phänotyps führte. Dabei war die Schwankungsbreite der Thrombozytengröße (PDW, *platelet distribution width*) in diesen Tieren im Vergleich zu den Telomerase-Wildtyptieren (*mTerc*$^{+/+}$) erhöht, die durchschnittliche Größe der Blutplättchen (MPV, *mean platelet volume*) jedoch nur in den Doppelknockout-Tieren (G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{-/-}$) signifikant niedriger als in den Kontrolltieren (Abb. 42.1 C-D).

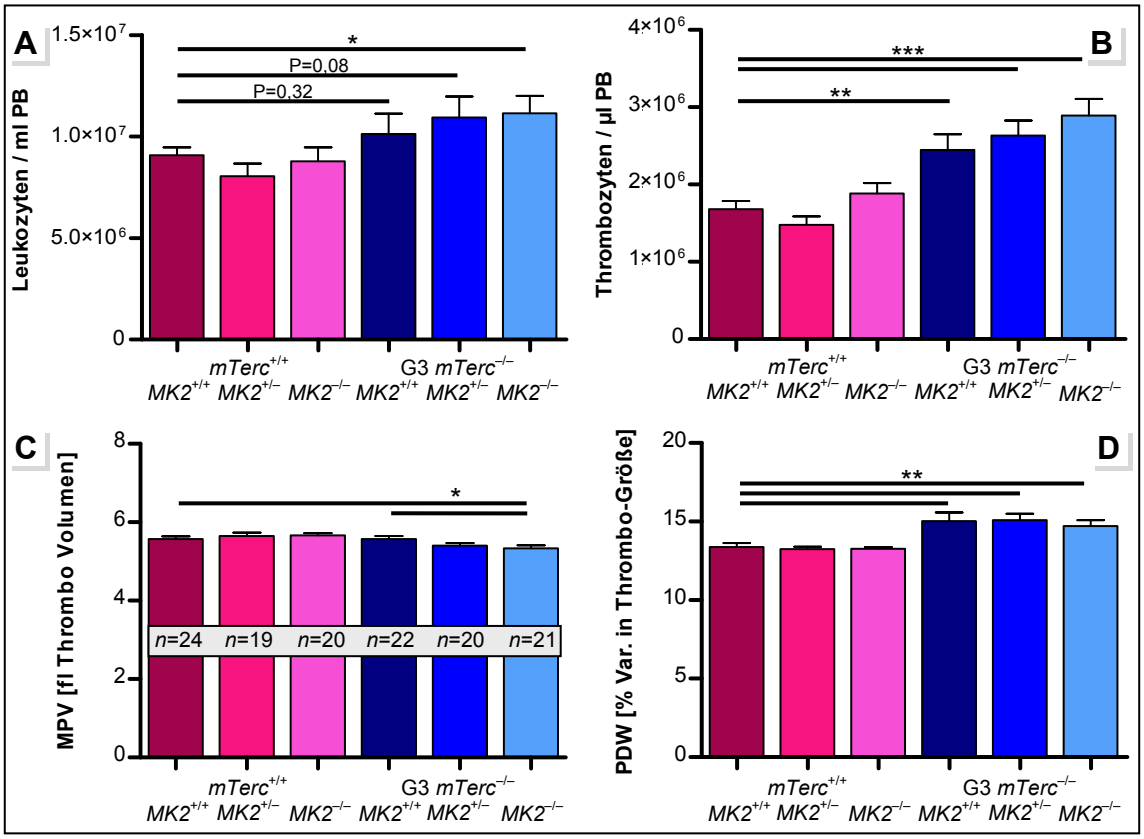

Abb. 42.1. *MK2*-Defizienz verstärkt die Leukozytose und Thrombozytose der *mTerc*$^{-/-}$-Mäuse. Blutbild: A) Leukozytenzahl, B), C) und D) Thrombozytenwerte (MPV – *mean platelet volume*, PDW – *platelet distribution width*). Siehe Tabelle 7 im Anhang.

Die Anzahl der Erythrozyten, wie auch der Hämoglobingehalt (HGB) des Blutes war in allen Telomerase-defizienten Tieren (G3 *mTerc*$^{-/-}$) signifikant niedriger als im Blut der Kontrollgruppe (*mTerc*$^{+/+}$, Abb. 42.2 E-F). Hierbei war an der Konzentration des Hämoglobins in den einzelnen Erythrozyten (MCHC, *mean corpuscular haemoglobin concentration*) kein Unterschied zwischen Telomerase-defizienten und Kontrolltieren festzustellen (Abb. 42.2 H). Lediglich das Volumen der Erythrozyten (MCV, *mean corpuscular volume*) war in Telomerase-Knockout-Tieren leicht erhöht und in *MK2*$^{-/-}$-

Mäusen reduziert (Abb. 42.2 G). Die Erythrozytenwerte verhielten sich in Telomerase-Wildtyp und -Knockout-Tieren unabhängig vom Status der MK2-Expression.

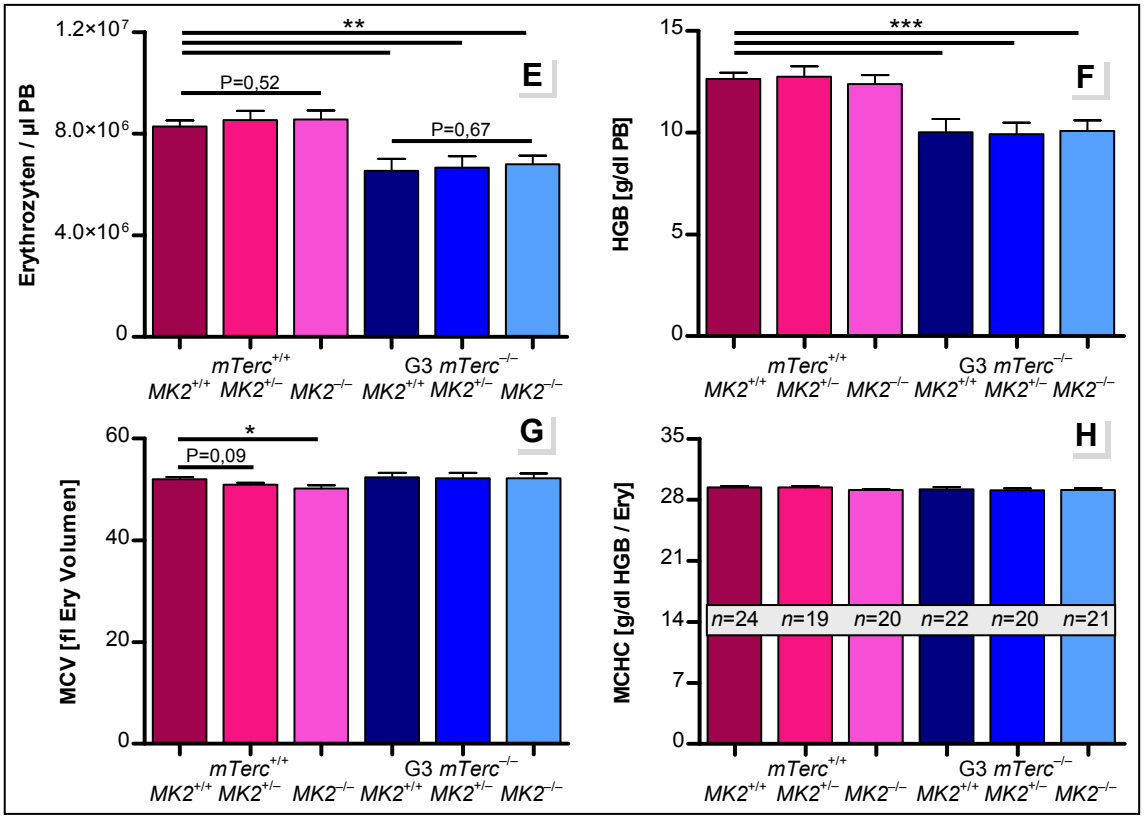

Abb. 42.2. MK2 hat keinen Einfluss auf die Anämie in *mTerc*$^{-/-}$-Mäusen. Blutbild, Fortsetzung: E), F), G), und H) Erythrozytenwerte (HGB – Hämoglobinkonzentration, MCV – *mean corpuscular volume*, MCHC – *mean corpuscular haemoglobin concentration*). Das Blutbild wurde mittels des *scil Vet abc*-Gerätes auf frisch entnommenem Blut erstellt. Siehe Tabelle 7 im Anhang.

3.3.3. Das Fehlen von *MK2* hat einen negativen Einfluss auf die Zahl reifer B-Zellen

B-Zellen, deren Name ursprünglich vom Bildungsort *Bursa Fabricii* bei Vögeln bzw. dem Knochenmark (*bone marrow*) bei Säugetieren stammt, erkennen Antigene über den B-Zell-Rezeptor und produzieren im Rahmen der humoralen Immunantwort Antikörper gegen extrazelluläre Pathogene. Reife, naive B-Zellen verlassen das Knochenmark und zirkulieren im Blut und in lymphatischen Organen. Nach Antigenbindung wandern sie in Keimzentren der Lymphknoten oder der Milz, wo der B-Zell-Rezeptor bzw. die Antikörper eine Affinitätsreifung durchlaufen, die B-Zelle proliferiert, zur Plasmazelle differenziert und hochspezifische Antikörper sezerniert (Janeway et al., 2005).

Im Knochenmark Telomerase-defizienter Mäuse (G3 *mTerc*$^{-/-}$) war erwartungsgemäß sowohl die Frequenz als auch die Anzahl der B-Zellen signifikant reduziert im Vergleich zu Wildtypmäusen (*mTerc*$^{+/+}$, Abb. 43 A-B, Abb. 44 A-B; Ju et al., 2007). Ein Einfluss von MK2 war lediglich im Knochenmark der Doppelknockout-Tiere zu sehen

(G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{-/-}$), wo zwar die B-Zell-Frequenz nur tendenziell (Abb. 44 A), die Anzahl der B-Zellen im Vergleich zum Telomerase-Knockout (G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/+}$) aber weiter signifikant reduziert war (Abb. 44 B).

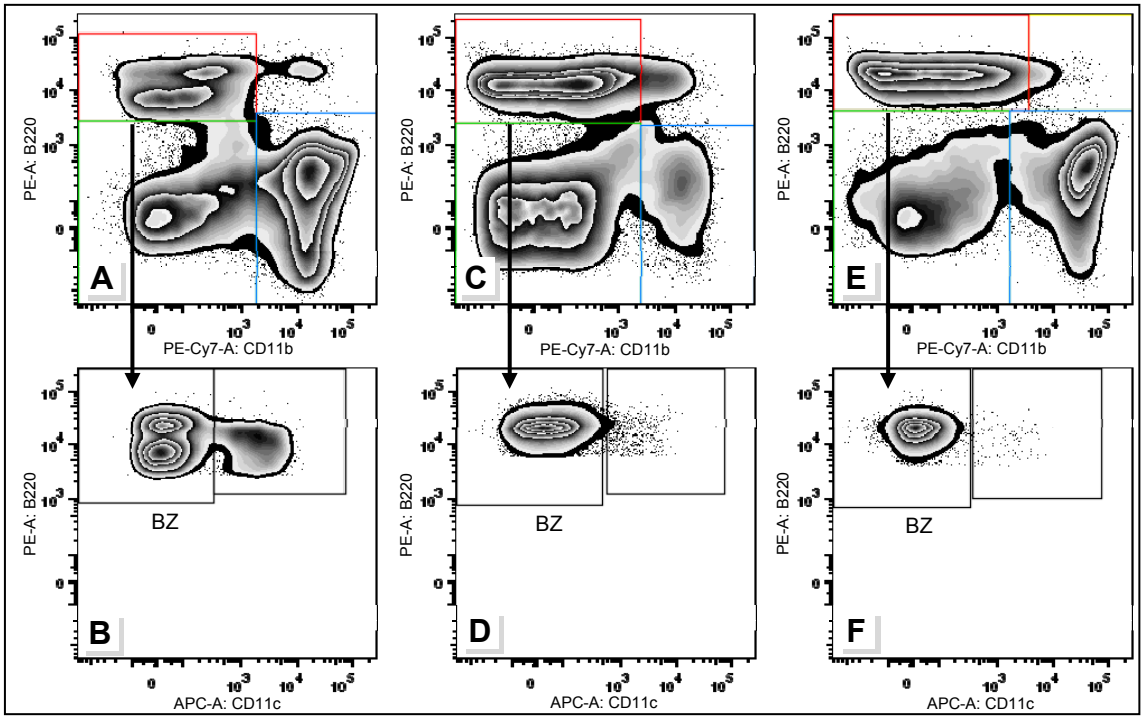

Abb. 43. *Gating* bei der durchflusszytometrischen Bestimmung von B-Zellen (BZ, B220^{+} CD11b^{-} CD11c^{-} CD8^{-}) im Knochenmark (A-B), in der Milz (C-D) und im Blut (E-F). Siehe auch Abb. 13.1-3.

Im Wildtyphintergrund (*mTerc*$^{+/+}$) war bei verminderter oder fehlender MK2-Expression sowohl die B-Zell-Frequenz (Abb. 44 A) als auch die B-Zellanzahl (Abb. 44 B) nur wenig geringer als bei normaler MK2-Expression. Das deutet darauf hin, dass MK2 nur einen kleinen, nicht signifikanten Einfluss auf die Bildung der B-Zellen im Knochenmark hatte (siehe Abb. 62), da sich der prozentuale Anteil weder im Telomerase-Wildtyp- noch im Telomerase-Knockout-Hintergrund in Abhängigkeit zur MK2-Expression signifikant änderte (Abb. 44 A). Die verringerte Anzahl B-Zellen war hier eher auf die geringere Gesamtzellzahl des Knochenmarks zurückzuführen (Abb. 40 A).

Wie schon im Knochenmark fanden sich auch in der Milz und im Blut aller Gruppen Telomerase-defizienter Tiere (G3 *mTerc*$^{-/-}$) signifikant weniger B-Zellen in Frequenz und Anzahl als in Wildtypmäusen (*mTerc*$^{+/+}$, Abb. 43 C-F, Abb. 44 C-F). Allerdings war in Milz und Blut der Telomerase-Wildtyptiere bereits die B-Zell-Frequenz von der MK2-Expression abhängig (Abb. 44 C-F). Der prozentuale Anteil B-Zellen an der Milz und am Blut war umso niedriger, je weniger MK2 in diesen Mäusen exprimiert wurde.

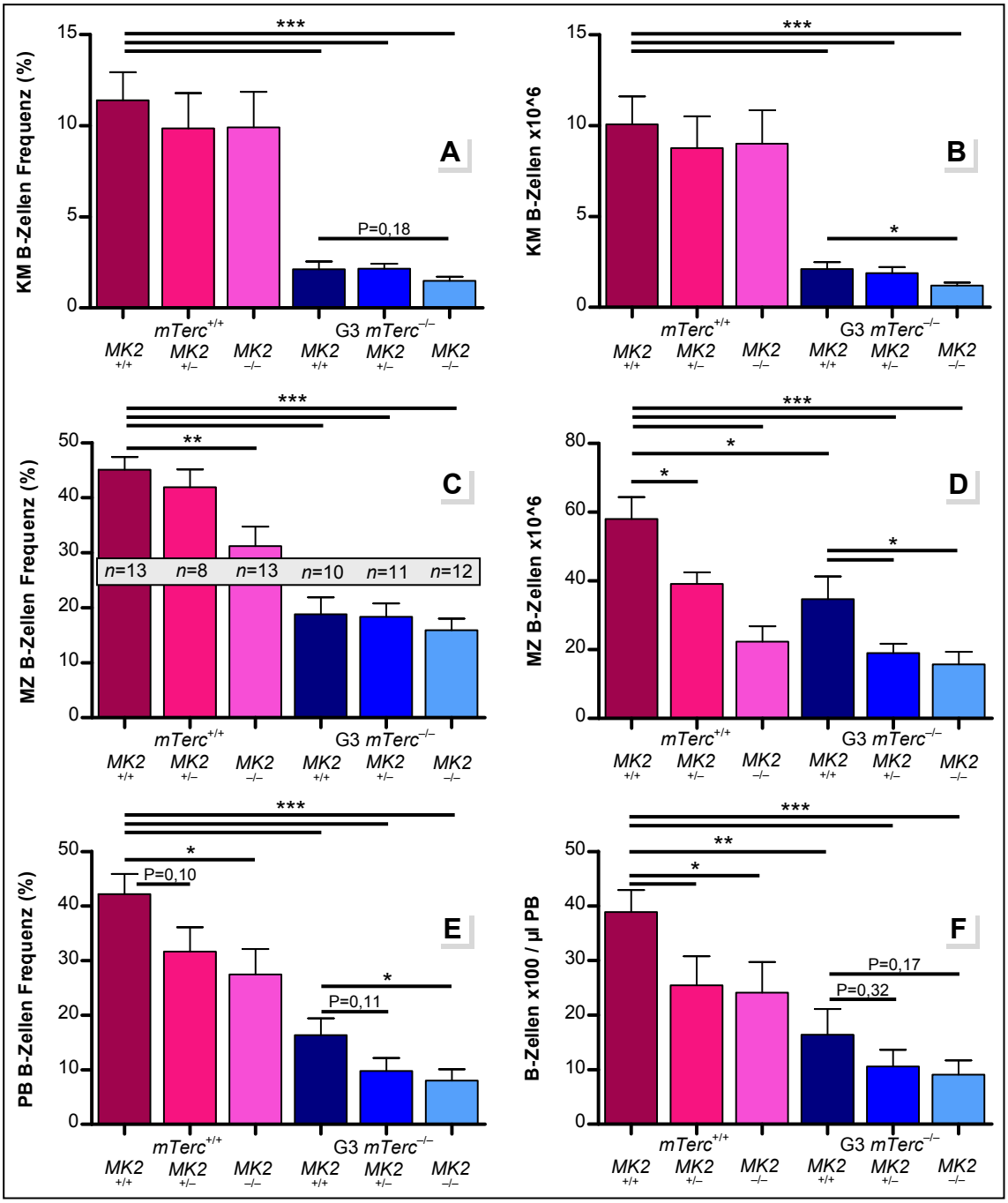

Abb. 44. B-Zellen sind in *MK2*-defizienten Mäusen reduziert. Histogrammauswertung der durchfluss-zytometrischen Bestimmung des Anteils von B-Zellen an Beinknochenmark (KM, A-B), Milz (MZ, C-D) und peripherem Blut (PB, E-F) der angegebenen Genotypen. Zur Berechnung der Zellzahlen (B, D, F) wurden die Gesamtzellzahlen für das jeweilige Organ bzw. die Leukozytenzahl pro Blutvolumen herangezogen. Siehe auch Tabellen 8, 11, 14 im Anhang.

Im Blut war die relative B-Zellzahl in Doppelknockout-Tieren (G3 $mTerc^{-/-}$ $MK2^{-/-}$) signifikant niedriger als in Telomerase-defizienten Tieren mit MK2-Expression (G3 $mTerc^{-/-}$ $MK2^{+/+}$, Abb. 44 E-F), wobei das in der Milz lediglich tendenziell zu sehen war (Abb. 44 C-D). Da in der Milz auch die Gesamtzellzahl in Abhängigkeit von der MK2-Expression sank (Abb. 40 B), potenzierte sich hier der Effekt der *MK2*-Defizienz

auf die B-Zellen noch in deren absoluter Anzahl sowohl im Telomerase-Wildtyp- als auch im Telomerase-Knockout-Hintergrund (Abb. 44 D): je weniger MK2 in den Tieren exprimiert wurde, desto geringer war die absolute Anzahl B-Zellen in der Milz. Im Blut ist der *MK2*-Dosiseffekt bei der absoluten B-Zellzahl nicht so ausgeprägt, da die Anzahl der Leukozyten pro Blutvolumen nicht signifikant von MK2 abhängig war (Abb. 42 A). Im Blut war die absolute B-Zellzahl (Abb. 44 F) im Telomerase-Wildtyphintergrund signifikant, im Telomerase-defizienten Hintergrund tendenziell niedriger als in den jeweiligen $MK2^{+/+}$-Tieren, sobald *MK2* nur heterozygot oder gar nicht vorhanden war.

3.3.4. *MK2*-Defizienz führt zu erhöhten CD4- und CD8-T-Zellzahlen

Der Name T-Zellen stammt vom Ort ihrer Reifung, dem Thymus. T-Zellen erkennen über T-Zell-Rezeptor (TZR/CD3-Komplex) und Co-Rezeptor (CD4 oder CD8) Antigene in Form von Peptiden, die im Kontext von MHC-Molekülen auf der Oberfläche Antigen-präsentierender Zellen dargestellt werden. Reife, naive T-Zellen verlassen den Thymus und zirkulieren in Blut und lymphatischen Organen. Nach Antigenbindung werden je nach T-Zellsubtyp verschiedene Mechanismen ausgelöst: $CD8^+$-T-Zellen, auch zytotoxische T-Zellen genannt, töten die Zielzelle durch Ausschüttung von Apoptose-induzierenden Effektormolekülen wie den Granzymen und Perforin; $CD4^+$-T-Zellen aktivieren Antigen-präsentierende B-Zellen (T_H2) und infizierte Makrophagen (T_H1); diese und alle weiteren T-Zellsubtypen tragen außerdem durch die Sekretion von Zytokinen zur Immunabwehr bei (Janeway et al., 2005).

Im Gegensatz zur B-Zellfrequenz, die bei *MK2*-Defizienz abnahm, hatte die fehlende MK2-Expression auf die Zahl der T-Zellen einen positiven Einfluss. Die Frequenz der CD4-T-Zellen in *MK2*-Knockout-Tieren ($mTerc^{+/+}$ $MK2^{-/-}$) war im Knochenmark, in der Milz und im Blut deutlich höher als in Wildtypmäusen ($mTerc^{+/+}$ $MK2^{+/+}$, Abb. 45 A, C, E, Abb. 47 A, C, E,). Gleiches galt für die Frequenz von CD8-T-Zellen in Knochenmark und Milz (Abb. 46 A, C, Abb. 47 B, D) – im Blut ist dieser Effekt weniger deutlich (Abb. 46 E, Abb. 47 F). Im Telomerase-Knockout-Hintergrund waren bei fehlender MK2-Expression (G3 $mTerc^{-/-}$ $MK2^{-/-}$) in Knochenmark und Milz ebenfalls mehr CD4- und CD8-T-Zellen zu finden (Abb. 45 A-D, Abb. 46 A-D). Im Blut gab es hier keine signifikanten Unterschiede.

Nur bei CD4-T-Zellen im Knochenmark *MK2*-defizienter Mäuse ($mTerc^{+/+}$ $MK2^{-/-}$) blieb der Effekt der erhöhten Frequenz bei den absoluten Zellzahlen erhalten (Abb. 45 B).

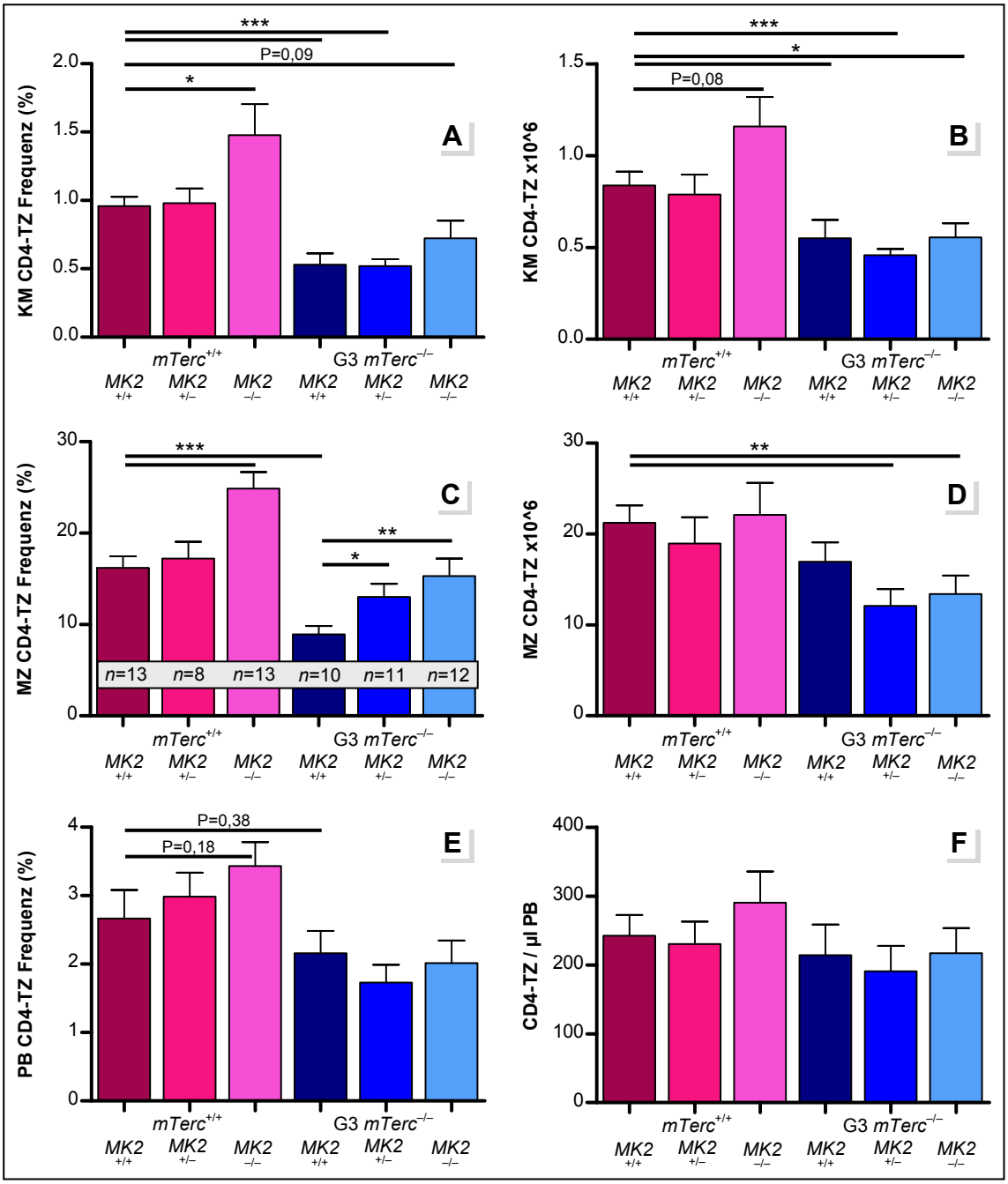

Abb. 45. *MK2*$^{-/-}$-Mäuse haben vermehrt CD4-T-Zellen. Histogrammauswertung der durchflusszytometrischen Bestimmung des Anteils von CD4-positiven T-Zellen (CD4-TZ, CD3$^+$ CD4$^+$ CD8$^-$) an Beinknochenmark (KM, A-B), Milz (MZ, C-D) und peripherem Blut (PB, E-F) der angegebenen Genotypen. Zur Berechnung der Zellzahlen (B, D, F) aus den prozentualen Anteilen wurden die Gesamtzellzahlen für das jeweilige Organ bzw. die Leukozytenzahl pro Blutvolumen herangezogen. Siehe Tabellen 8, 11, 14, Anhang.

Da aber das Fehlen von *MK2* die Gesamtzellzahlen in Knochenmark und Milz beeinflusste (Abb. 40), waren die CD4-T-Zellen in der Milz und die CD8-T-Zellen in Knochenmark und Milz in *MK2*-defizienten Mäusen (*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{-/-}$) in der Zahl ähnlich den Wildtypen. Innerhalb der Telomerase-Knockout-Gruppe ließen sich hier keine signifikanten Unterschiede in den T-Zellzahlen hinsichtlich der MK2-Expression fest-

stellen (Abb. 45 D und Abb. 46 D). Im Blut konnten bei beiden T-Zellsubtypen keine signifikanten Unterschiede in den absoluten Zellzahlen gemessen werden, wobei zumindest die Zahl der CD4-T-Zellen auch hier tendenziell mit *MK2*-Reduktion stieg.

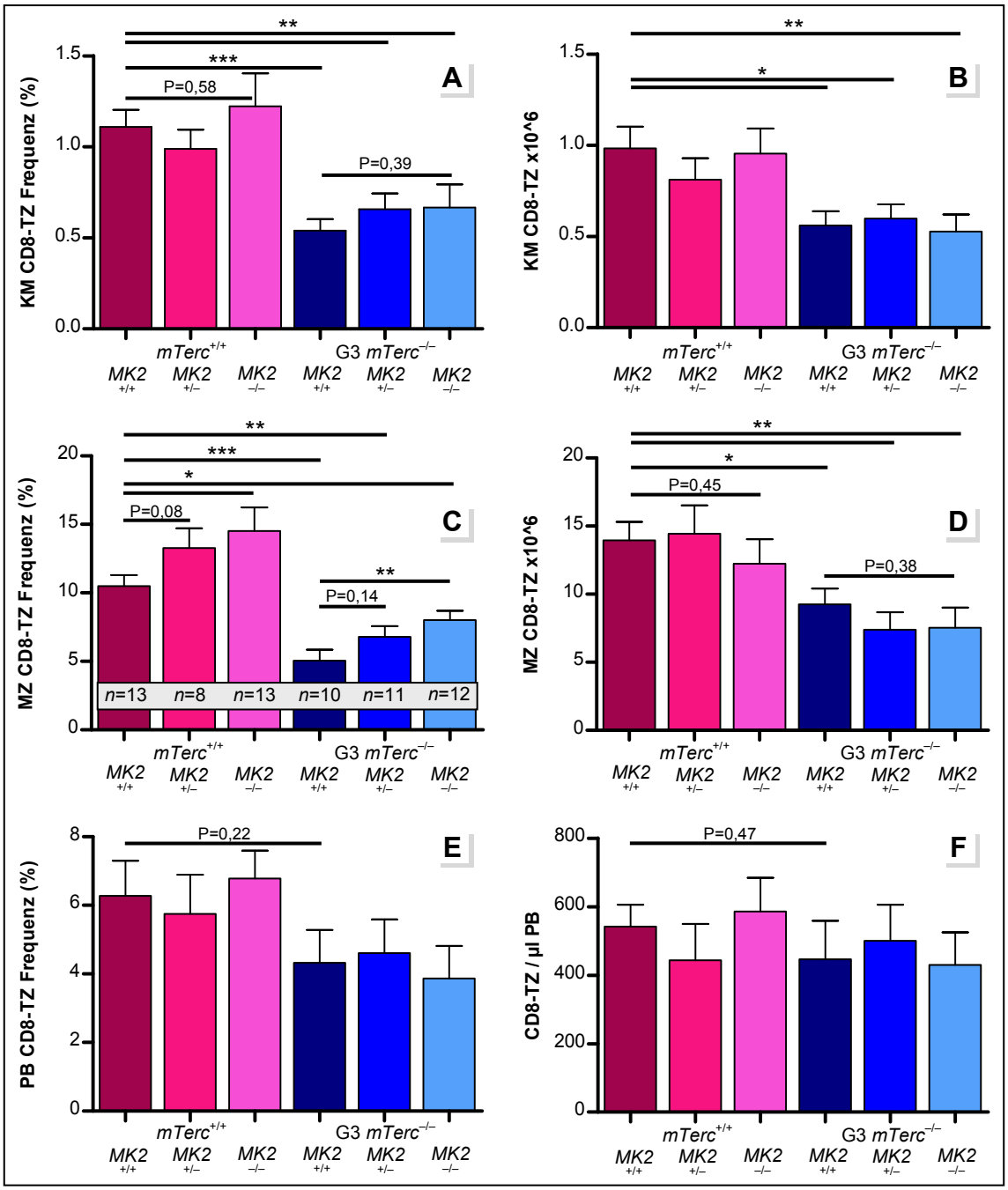

Abb. 46. *MK2*$^{-/-}$-Mäuse haben auch vermehrt CD8-T-Zellen. Histogrammauswertung der durchflusszytometrischen Bestimmung des Anteils von CD8-positiven T-Zellen (CD8-TZ, $CD3^+ CD4^- CD8^+$) an Beinknochenmark (KM, A-B), Milz (MZ, C-D) und peripherem Blut (PB, E-F) der angegebenen Genotypen. Zur Berechnung der Zellzahlen (B, D, F) wurden die Gesamtzellzahlen für das jeweilige Organ bzw. die Leukozytenzahl pro Blutvolumen herangezogen. Siehe Tabellen 8, 11, 14, Anhang.

Bis auf die absoluten Zellzahlen im Blut waren beide T-Zell-Subtypen sowohl in Frequenz als auch in absoluter Anzahl in Knochenmark, Milz und Blut aller Telomerase-Knockout-Gruppen (G3 *mTerc*$^{-/-}$) bedeutend geringer als in den Telomerase-Wildtypgruppen (*mTerc*$^{+/+}$, Abb. 45 und 46 vgl. blaue und rote Balken).

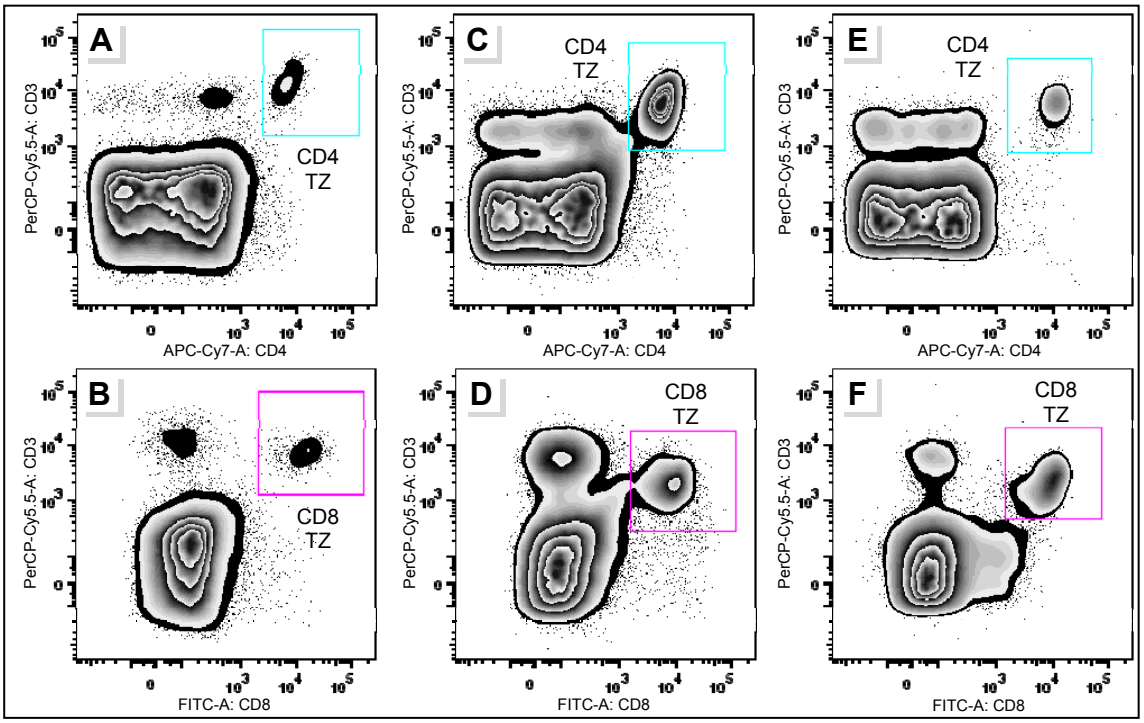

Abb. 47. *Gating* bei der durchflusszytometrischen Bestimmung von T-Zellen (TZ) im Knochenmark (A-B), in der Milz (C-D) und im Blut (E-F). Siehe auch Abb. 14.1-3.

3.3.5. *MK2*-Deletion hat einen negativen Einfluss auf NK-Zellen im Knochenmark

Ebenfalls zu den Lymphozyten gehören die Natürlichen Killer (NK)-Zellen. Wie B- und T-Zellen zirkulieren auch sie im Blut. Im Unterschied zu den beiden anderen Lymphozytentypen besitzen sie aber keine antigenspezifischen Rezeptoren, sondern erkennen veränderte und abwesende MHC I-Moleküle auf (Virus-infizierten) Zellen und werden deshalb zum angeborenen Immunsystem gezählt. Aktivierte NK-Zellen, wie zytotoxische T-Zellen, induzieren durch die Sekretion von Effektormolekülen Apoptose in den Zielzellen (Janeway et al., 2005).

In Knochenmark und Blut hatten alle Telomerase-defizienten Genotypen (G3 *mTerc*$^{-/-}$) weniger NK-Zellen in der Frequenz als Wildtypmäuse (*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/+}$), in der Milz hatte weder MK2 noch Telomerase einen Einfluss (Abb. 48 A, C, E, Abb. 49 B). Im Knochenmark konnte bei der NK-Zellfrequenz außerdem ein dosisabhängiger negativer Einfluss der *MK2*-Defizienz innerhalb der Telomerase-Wildtypgruppe festgestellt werden, welcher sich auch in der absoluten Zellzahl fortsetzte (Abb. 48 B, Abb. 49 A).

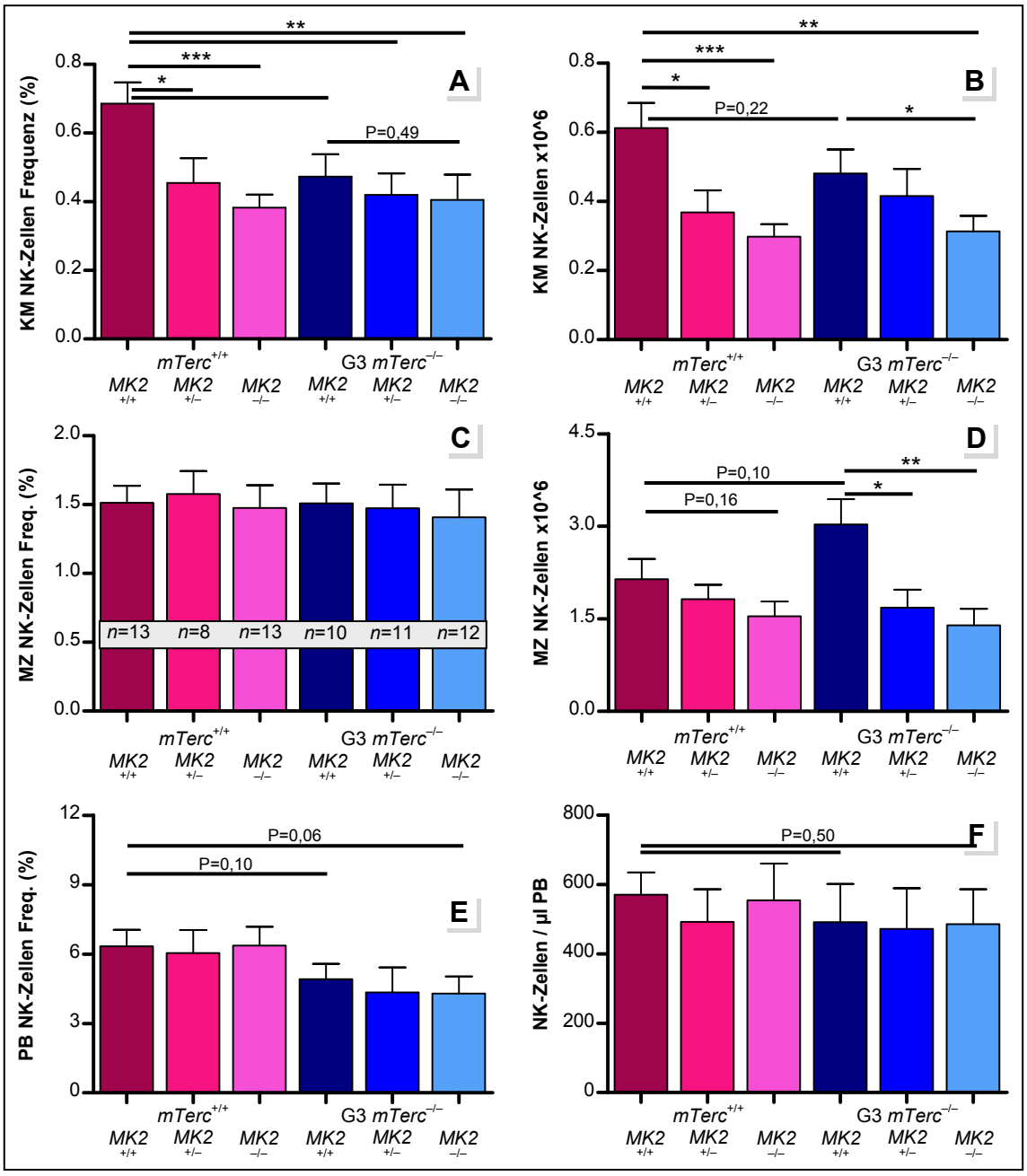

Abb. 48. ***MK2*-Defizienz reduziert NK-Zellen im Knochenmark.** Histogrammauswertung der durchflusszytometrischen Bestimmung des Anteils von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen, $NK1.1^+$ $CD11b^+$ $CD8^-$) an Beinknochenmark (KM, A und B), Milz (MZ, C und D) und peripherem Blut (PB, E und F) der angegebenen Genotypen. Zur Berechnung der Zellzahlen (B, D, F) aus den prozentualen Anteilen wurden die Gesamtzellzahlen für das jeweilige Organ bzw. die Leukozytenzahl pro Blutvolumen herangezogen. Siehe Tabellen 8, 11, 14 im Anhang.

In der Milz führten die absoluten Gesamtzellzahlen zu einer signifikant erhöhten Zahl der NK-Zellen in Telomerase-Knockout-Mäusen (G3 $mTerc^{-/-}$ $MK2^{+/+}$) und zu einer *MK2*-dosisabhängigen Verminderung der NK-Zellzahlen im Telomerase-Wildtyp- wie auch im Telomerase-Knockout-Hintergrund (Abb. 48 D). Die absoluten Leukozyten-

zahlen pro Blutvolumen waren dafür verantwortlich, dass hier die Unterschiede in den NK-Zellzahlen kleiner wurden als bei der NK-Zellfrequenz (Abb. 48 E-F, Abb. 49 C).

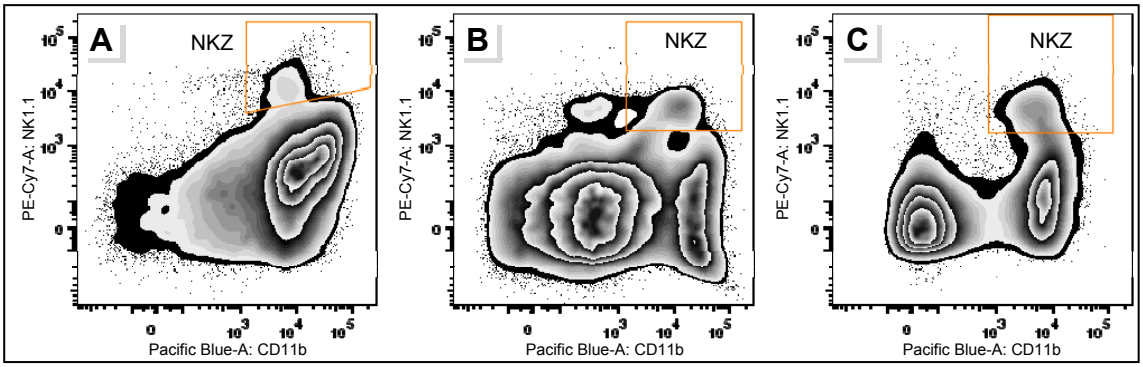

Abb. 49. *Gating* bei der durchflusszytometrischen Bestimmung von NK-Zellen (NKZ) im Knochenmark (A), in der Milz (B) und im Blut (C). Siehe auch Abb. 14.1-3.

3.3.6. *MK2*-Knockout-Mäuse haben anteilig mehr Granulozyten, aber weniger Monozyten und Makrophagen

Das Phagozytensystem besteht aus den mononukleären Phagozyten der Blutmonozyten und Gewebsmakrophagen und der zirkulierenden polymorphnukleären neutrophilen Granulozyten. Diese Phagozyten sind als Bestandteil des angeborenen Immunsystems für die (schnelle) Beseitigung seneszenter und apoptotischer wie auch mit Pathogenen infizierter Zellen verantwortlich. Sie unterscheiden Pathogene und verändertes „Selbst“ über diverse Oberflächenmoleküle (invariante Rezeptoren wie z.B. *Pattern Recognition*-Rezeptoren und Phosphatidylserin-Rezeptor), nehmen diese durch Phagozytose auf und verdauen sie in intrazellulären Vesikeln. In Reaktion auf den Abbau apoptotischer Zellen werden von den Phagozyten u.a. anti-inflammatorische Zytokine sezerniert, während die Prozessierung von Pathogenen zur Ausschüttung von pro-inflammatorischen Mediatoren, Rekrutierung weiterer Immunzellen und über die Oberflächenpräsentation zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems führt (Hume et al., 2002; Janeway et al., 2005; Taylor et al., 2005; Hume, 2006; Geissmann et al., 2010).

Die Frequenz und auch die absolute Anzahl der Granulozyten in Knochenmark, Milz und Blut war in allen Telomerase-Knockout-Tieren (G3 $mTerc^{-/-}$) signifikant erhöht im Vergleich zur Wildtypkontrolle ($mTerc^{+/+}$ $MK2^{+/+}$). In allen drei Organen zeigte sich innerhalb der Telomerase-defizienten Gruppe eine leichte, aber nicht signifikante *MK2*-Dosisabhängigkeit dadurch, dass die Granulozyten-Frequenz stieg, je weniger MK2 exprimiert wurde (Abb. 50 A, C, E; Abb. 51). In Milz und Blut konnte eine ähnliche Abhängigkeit auch innerhalb der Wildtypgruppe beobachtet werden (Abb. 50 C, E).

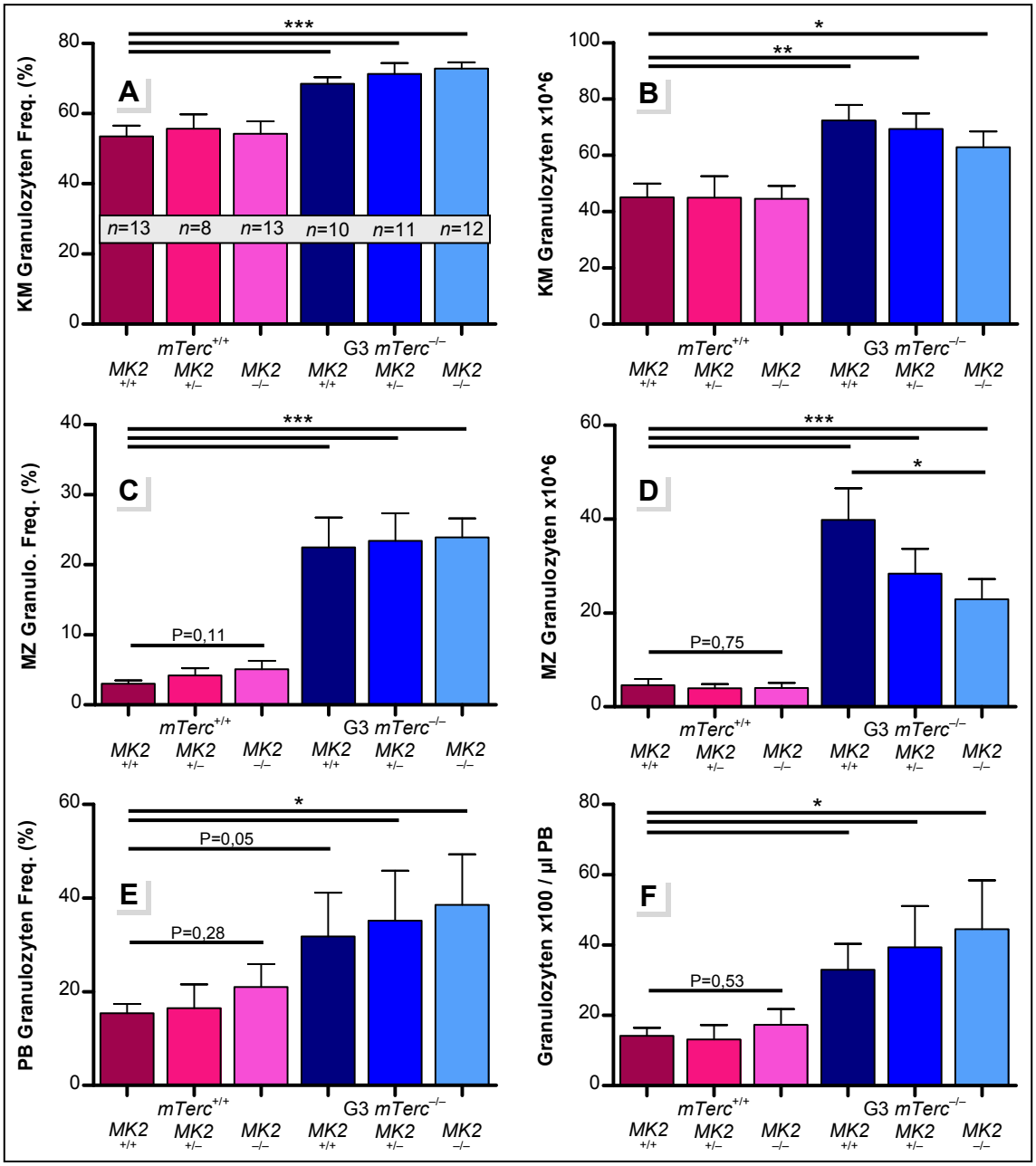

Abb. 50. *MK2*-defiziente Mäuse zeigen einen leichten Anstieg der Granulozyten. Histogrammauswertung der durchflusszytometrischen Bestimmung des Anteils von Granulozyten ($CD11b^{+}$ $CD115^{-}$ $Gr1^{++}$) an Beinknochenmark (KM, A-B), Milz (MZ, C-D) und peripherem Blut (PB, E-F) der angegebenen Genotypen. Zur Berechnung der Zellzahlen (B, D, F) wurden die Gesamtzellzahlen für das jeweilige Organ bzw. die Leukozytenzahl pro Blutvolumen herangezogen. Siehe Tabellen 9, 12, 15 im Anhang.

Auf Grund der MK2-abhängigen Gesamtzellzahlen in Knochenmark und ganz besonders in der Milz (Abb. 40), waren hier die absoluten Zahlen im Telomerase-defizienten Hintergrund (G3 $mTerc^{-/-}$) umgekehrt von *MK2* abhängig: bei verminderter und fehlender MK2-Expression fiel die absolute Zahl der Granulozyten im Vergleich zu Tieren mit MK2-Expression (Abb. 50 B, D, blaue Balken). Im Blut stiegen Zahlen und Frequenzen der Granulozyten bei abnehmender Menge MAPKAP-Kinase 2 (Abb. 50 E-F).

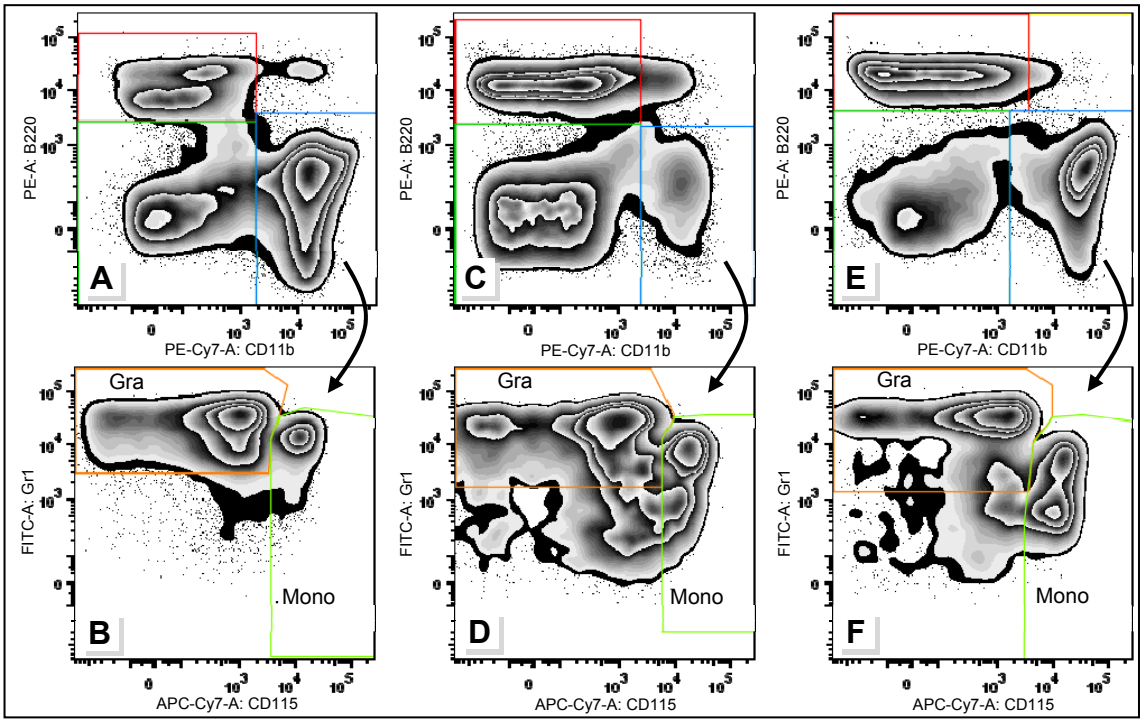

Abb. 51. *Gating*-Strategie der durchflusszytometrischen Bestimmung von Granulozyten (Gra) und Monozyten (Mono) im Knochenmark (A-B), in der Milz (C-D) und im Blut (E-F). Siehe auch Abb. 13.1-3.

Die relativen und absoluten Zahlen der Blut-Monozyten (Abb. 51) verhielten sich ähnlich denen der Blut-Granulozyten: in Telomerase-defizienten Tieren fanden sich vergleichsweise viele Monozyten, deren Zahl mit fallender MK2-Expression weiter stieg (Abb. 52 E-F), wobei diese Unterschiede erst bei der absoluten Zellzahl signifikant verschieden zur Wildtypkontrolle waren (Abb. 52 F).

Anders als bei den Granulozyten konnte in keinem der drei Organe in Telomerase-Wildtyptieren ($mTerc^{+/+}$) eine Abhängigkeit in der Monozyten-Frequenz von der MK2-Expression beobachtet werden (Abb. 52 A, C, E, rote Balken). In den Telomerase-Knockout-Gruppen konnte dagegen in Knochenmark und Milz eine MK2-Abhängigkeit festgestellt werden: Telomerase-Knockout-Tiere (G3 $mTerc^{-/-}$ $MK2^{+/+}$) zeigten (in der Milz signifikant) erhöhte Monozyten-Frequenzen im Vergleich zu den Wildtypkontrollen, bei verminderter und fehlender MK2-Expression aber waren die relativen Monozyten-Zahlen in der Milz niedriger, im Knochenmark sogar vergleichbar mit den Wildtypwerten (Abb. 52 A, C, blaue Balken).

Unterschiede, die in Milz und Knochenmark bei der Monozyten-Frequenz schon erkennbar waren, wurden bei den absoluten Zahlen signifikant: vermehrtes Monozyten-Vorkommen in Telomerase-Knockout-Tieren mit MK2 und die Verringerung der Monozyten auf Werte ähnlich des Wildtyps bei fehlender MAPKAP-Kinase 2 (Abb. 52 B,

D). Im Blut war mit fallender MK2-Expression ein leichter Anstieg der relativen und absoluten Monozyten-Zahlen in Telomerase-Knockout-Tieren erkennbar (Abb. 52 E-F).

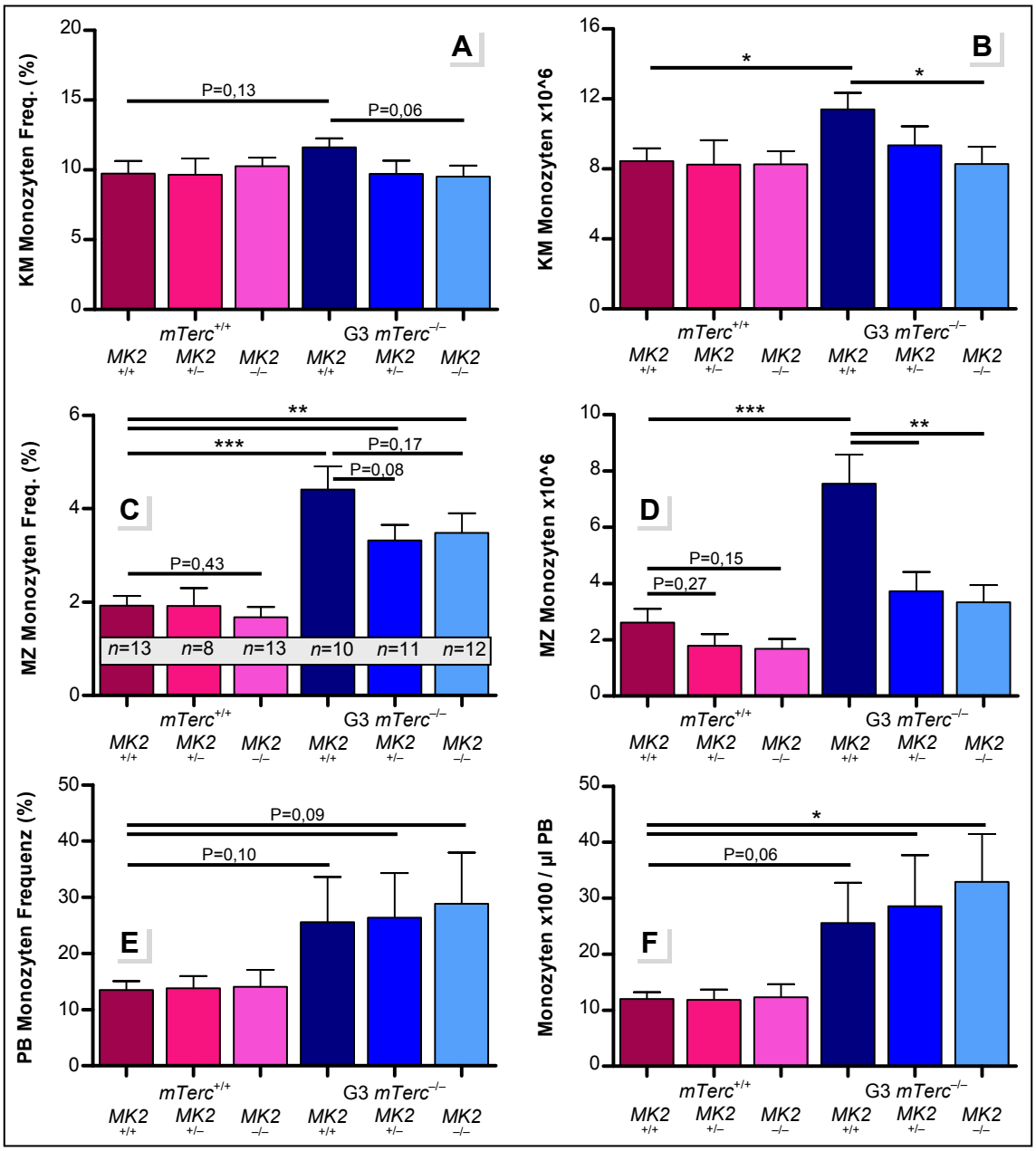

Abb. 52. Die Kombination aus *mTerc*- und *MK2*-Knockout vermindert die Frequenz der Monozyten in Knochenmark und Milz. Histogrammauswertung der durchflusszytometrischen Bestimmung von Monozyten ($CD11b^+$ $CD115^+$ $Gr1^{+/++}$) an Beinknochenmark (KM, A-B), Milz (MZ, C-D) und peripherem Blut (PB, E-F) der angegebenen Genotypen. Zur Berechnung der Zellzahlen (B, D, F) aus den prozentualen Anteilen wurden die Gesamtzellzahlen für das jeweilige Organ bzw. die Leukozytenzahl pro Blutvolumen herangezogen. Siehe Tabellen 9, 12, 15 im Anhang.

Im Knochenmark entstehende und im Blut zirkulierende Monozyten wandern schließlich ins Gewebe aus und differenzieren dort hauptsächlich zu Makrophagen. Obwohl die Frequenz der im Blut zirkulierenden Monozyten in Telomerase-defizienten Tieren

(G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/+}$) erhöht war, hatten diese Tiere verringerte Makrophagen-Frequenzen in der Milz verglichen mit Telomerase-profizienten Mäusen (*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/+}$). Bei verminderter oder fehlender Expression der MAPKAP-Kinase 2 (*MK2*$^{+/-}$ und *MK2*$^{-/-}$) verringerte sich sowohl Frequenz als auch Anzahl der Makrophagen in der Milz unabhängig von der Funktion der Telomerase (Abb. 53 und 54).

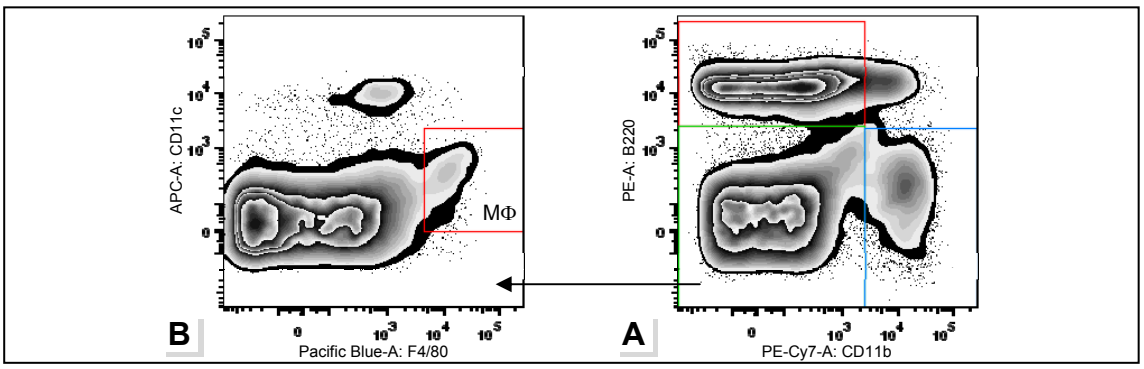

Abb. 53. *Gating*-Strategie der Durchflusszytometrie von Milz-Makrophagen (MΦ). Siehe Abb. 13.2.

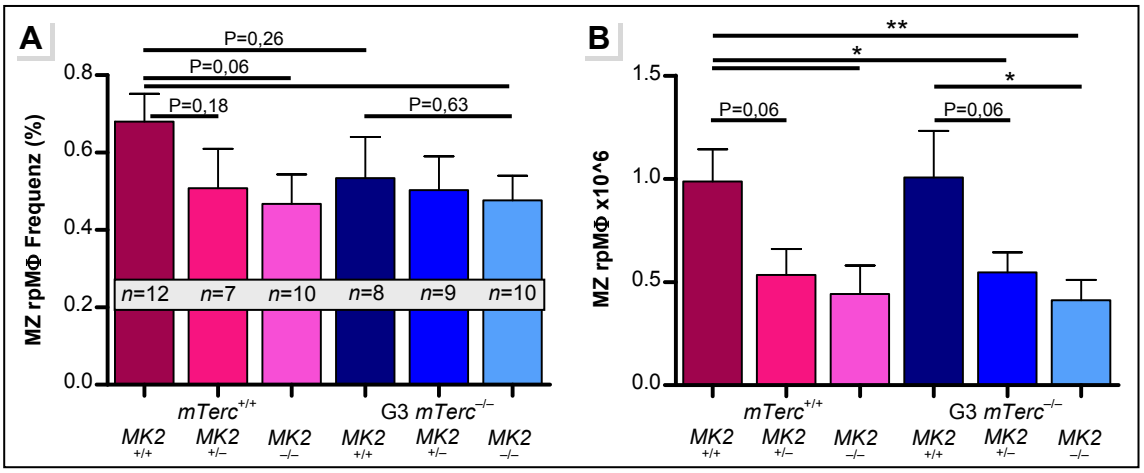

Abb. 54. Die Makrophagen der Milz sind bei *mTerc*- und dosisabhängig auch bei *MK2*-Defizienz vermindert. Histogrammauswertung der durchflusszytometrischen Bestimmung des Anteils von Makrophagen der roten Pulpa (rpMΦ, B220^{-} CD11b^{-} CD11c^{low} F4/80^{+}) in der Milz (MZ, A-B) der angegebenen Genotypen. Zur Berechnung der Zellzahlen (B) aus den prozentualen Anteilen wurden die Gesamtzellzahlen für die Milz herangezogen. Siehe Tabelle 12 im Anhang.

3.3.7. Fehlende MK2-Expression hat einen negativen Einfluss auf die Zahl der Dendritischen Zellen in Knochenmark, Milz und Blut

Wie Monozyten/Makrophagen und Neutrophile verfügen auch Dendritische Zellen über ein großes Repertoire an invarianten Rezeptoren zur Erkennung von Pathogenen. Gewebsresidente Dendritische Zellen (DCs) nehmen Pathogene am Ort der Infektion durch Phagozytose auf und verdauen sie. Dadurch werden diese Zellen aktiviert, was zu ihrer Einwanderung in lymphatische Organe führt, wo sie die Antigene im MHC-Kontext auf

ihrer Oberfläche präsentieren. Außerdem exprimieren aktivierte DCs co-stimulatorische Moleküle, die zur effizienten Stimulation naiver T-Zellen beitragen. Damit sind Dendritische Zellen (neben B-Zellen und Makrophagen) die wichtigsten Antigen-präsentierenden Zellen des Körpers, die neben der Initiierung der adaptiven Immunantwort auch zur Entwicklung des immunologischen Gedächtnisses und der Toleranz beitragen. Anders als die eben beschriebene konventionelle DC-Funktion (sogenannte myeloide und lymphoide DCs), sind sogenannte plasmazytoide DCs darauf spezialisiert, mit der Ausschüttung von Interferonen auf virale Infektionen zu reagieren. (Janeway et al., 2005; Merad und Manz, 2009; Geissmann et al., 2010).

Die Frequenz wie auch die absolute Anzahl der lymphoiden Dendritischen Zellen (lyDC) im Knochenmark von *MK2*-Knockout-Tieren war um ungefähr die Hälfte geringer als in Wildtypmäusen, war aber auch im Knochenmark von Tieren mit verminderter MK2-Expression schon reduziert (Abb. 55 D, Abb. 56 A-B). Im Telomerase-Knockout-Knochenmark war die Zahl lymphoider Dendritischer Zellen ähnlich gering wie in *MK2*-Knockout-Tieren, Doppelknockout-Tiere zeigten im Vergleich dazu eine weitere signifikante Reduktion in Frequenz und Anzahl dieses Zelltyps. Die Frequenzen und Anzahlen myeloider Dendritischer Zellen (myDC) im Knochenmark der beschrieben Genotypen zeigten eine ähnliche Verteilung (Abb. 55 A, Abb. 57 A-B).

In der Milz war die Frequenz lymphoider und myeloider Dendritischer Zellen in Telomerase-defizienten Tieren (G3 $mTerc^{-/-}$ $MK2^{+/+}$) nicht signifikant verschieden zu den Wildtyptieren ($mTerc^{+/+}$ $MK2^{-/-}$). Die Kombination beider Knockouts jedoch führte bereits bei verminderter MK2-Expression zu einer sichtbaren Reduktion, bei völligem Fehlen von MAPKAPK-2 zu einer signifikanten Verminderung der relativen Zahl lymphoider und myeloider Dendritischer Zellen in der Milz (Abb. 55 H, E, Abb. 56 C und 57 C). Auf Grund der unterschiedlichen Zellzahlen in den Genotypen war die absolute Zahl lymphoider und myeloider dendritischer Zellen der Milz in Telomerase-defizienten Tieren (G3 $mTerc^{-/-}$) sichtbar erhöht, in $MK2^{+/-}$- und $MK2^{-/-}$-Tieren sowohl im Telomerase-Wildtyp- als auch im Telomerase-Knockout-Hintergrund niedriger als im Wildtypen (Abb. 56 D und 57 D).

Frequenz und Anzahl lymphoider Dendritischer Zellen im Blut (Abb. 55 L) unterschieden sich nicht (signifikant) zwischen Telomerase-Knockout-Tieren (G3 $mTerc^{-/-}$ $MK2^{+/+}$) und der Wildtypgruppe ($mTerc^{+/+}$). Erst die Kombination aus verminderter oder fehlender MK2-Expression mit Telomerase-Defizienz führte zu einer Reduktion in relativer und absoluter Zahl dieser Zellen (Abb. 56 E-F).

Myeloide Dendritische Zellen im Blut (Abb. 55 I) waren bereits im Telomerase-Wildtyphintergrund in Frequenz und Anzahl durch eingeschränkte oder fehlende MK2-Expression vermindert. Blut von Telomerase-Knockout-Tieren zeigte eine noch geringere Zahl myeloider Dendritischer Zellen, die wiederum *MK2*-dosisabhängig weiter verringert war (Abb. 57 E-F).

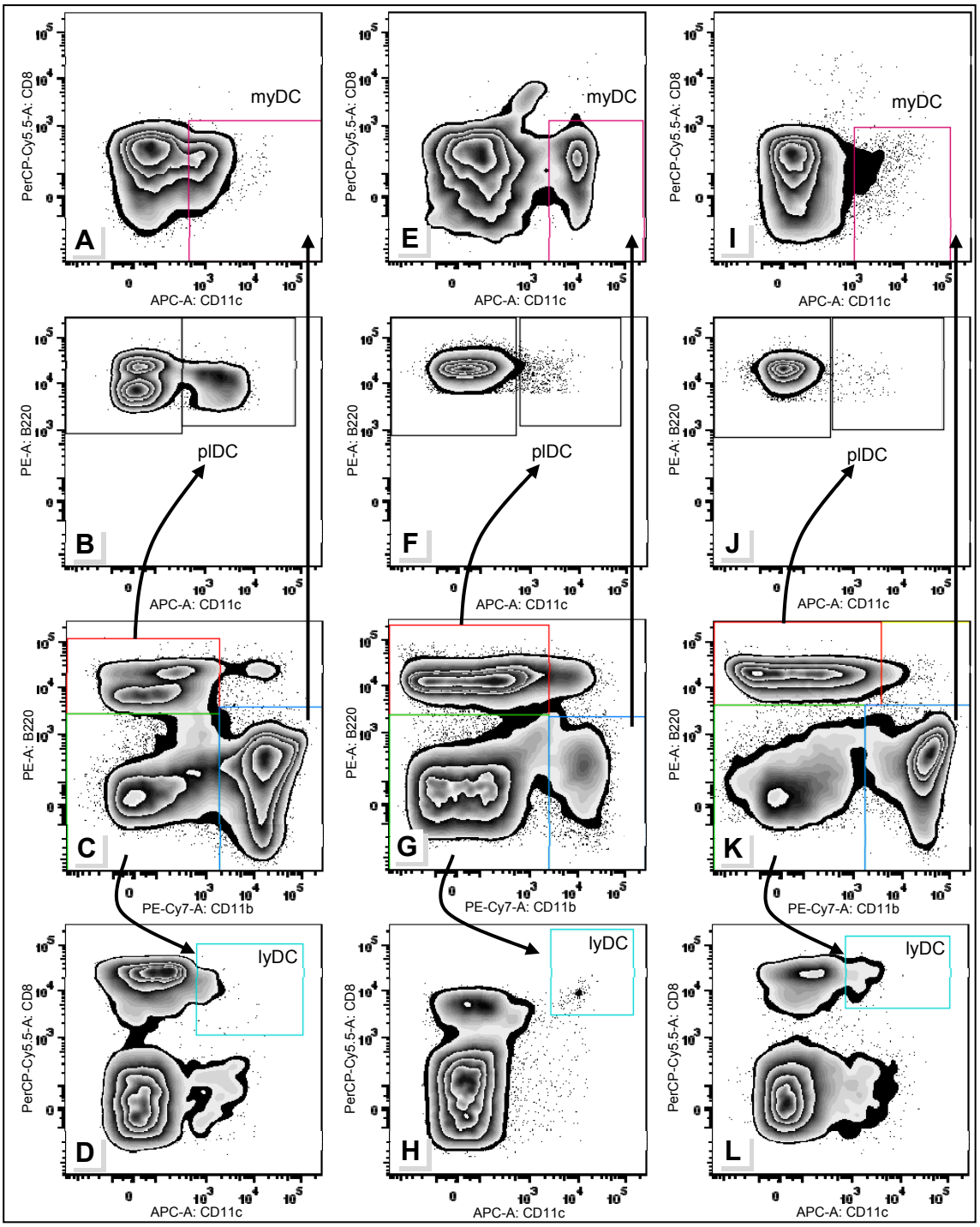

Abb. 55. *Gating* bei der durchflusszytometrischen Bestimmung von lymphoiden, myeloiden und plasmazytoiden Dendritischen Zellen (lyDC, myDC und plDC) im Knochenmark (A-D), in der Milz (E-H) und im Blut (I-L). Siehe auch Abb. 13.1-3.

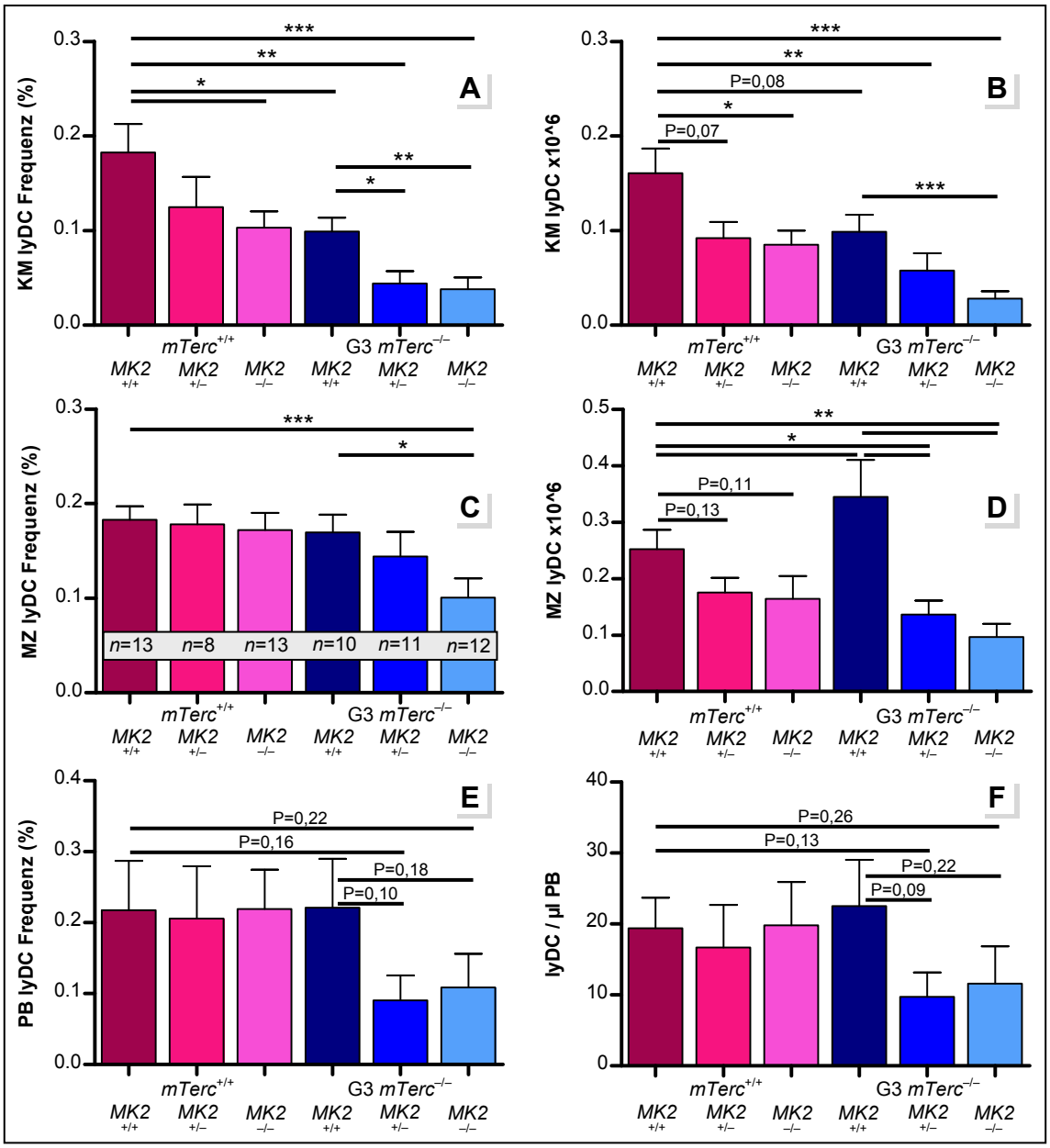

Abb. 56. Vor allem bei kombinierter *mTerc*- und *MK2*-Defizienz sind lyDCs reduziert. Histogrammauswertung der durchflusszytometrischen Bestimmung des Anteils von lymphoiden Dendritischen Zellen (lyDC, $CD11c^+$ $CD11b^-$ $CD8^+$) an Beinknochenmark (KM, A-B), Milz (MZ, C-D) und peripherem Blut (PB, E-F) der angegebenen Genotypen. Zur Berechnung der Zellzahlen (B, D, F) aus den prozentualen Anteilen wurden die Gesamtzellzahlen für das jeweilige Organ bzw. die Leukozytenzahl pro Blutvolumen herangezogen. Siehe Tabellen 8, 11, 14 im Anhang.

Die Frequenz plasmazytoider Dendritischer Zellen (plDC, Abb. 55 B, F, J) war zwar im Knochenmark Telomerase-defizienter Mäuse (G3 $mTerc^{-/-}$ $MK2^{+/+}$) im Vergleich zum Wildtyp um die Hälfte reduziert, in der Milz und im Blut jedoch leicht erhöht. Sowohl in Telomerase-defizienten als auch in Telomerase-profizienten Mäusen verringerte sich die Frequenz dieser Zellen in allen drei Organen, je weniger MAPKAP-Kinase 2 expri-

miert wurde, sodass im Blut der Doppelknockout-Tiere die plDC-Frequenz nur halb so hoch, im Knochenmark nur ein Drittel so hoch wie im Wildtyp war (Abb. 58 A, C, E).

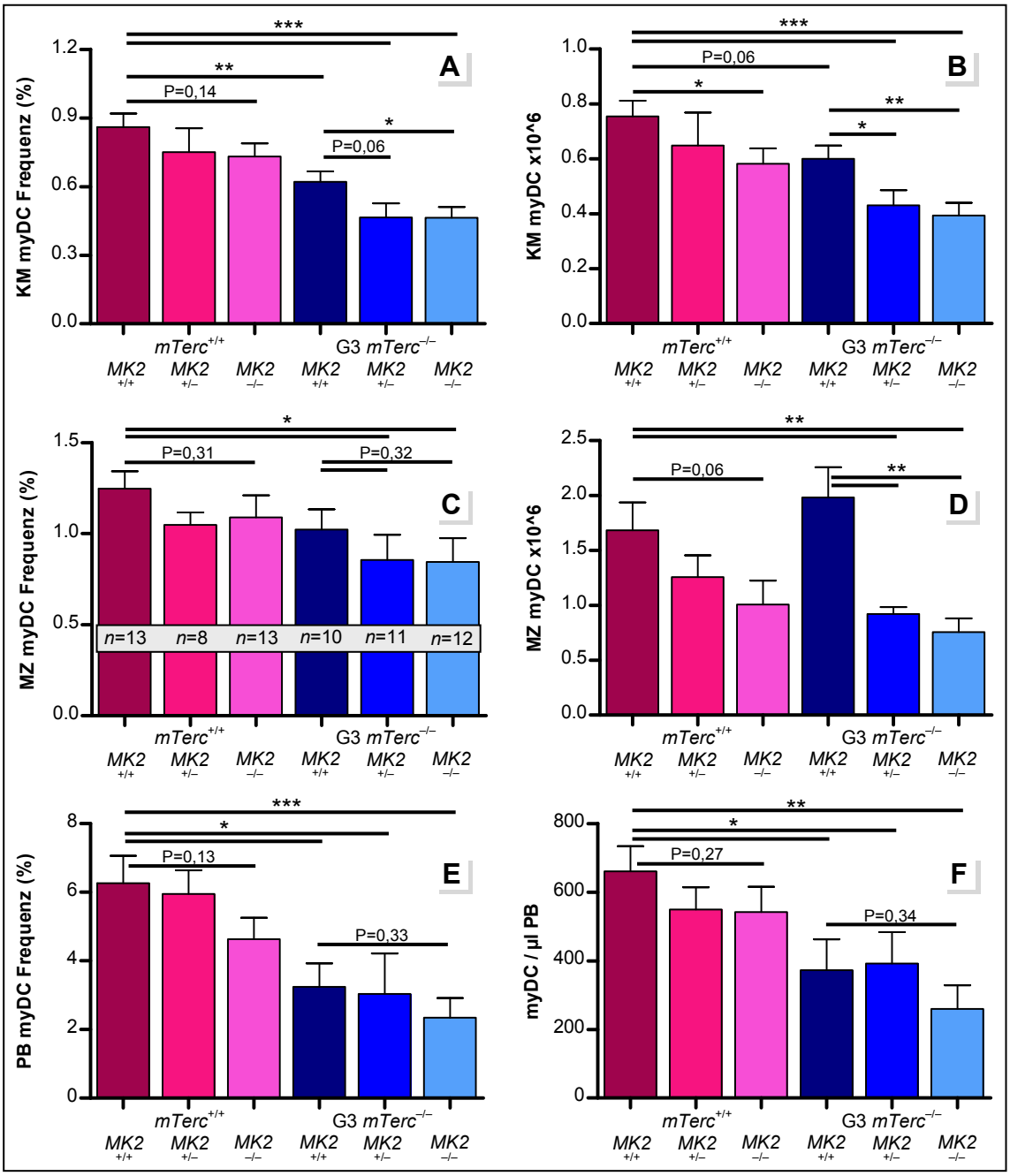

Abb. 57. Die Deletion von *MK2* führt zur Verminderung von myDCs. Histogrammauswertung der durchflusszytometrischen Bestimmung von myeloiden Dendritischen Zellen (myDC, $CD11c^+$ $CD11b^+$ $CD8^-$) an Beinknochenmark (KM, A-B), Milz (MZ, C-D) und peripherem Blut (PB, E-F) der angegebenen Genotypen. Zur Berechnung der Zellzahlen (B, D, F) wurden die Gesamtzellzahlen für das jeweilige Organ bzw. die Leukozytenzahl pro Blutvolumen herangezogen. Siehe Tabellen 9, 12, 15 im Anhang.

Obwohl die Gesamtzellzahl des Knochenmarks von G3 *mTerc*$^{-/-}$-Tieren erhöht war, genügte das nicht, um die Anzahl plasmazytoider Dendritischer Zellen hier auf Wild-

typniveau zu heben (Abb. 58 B). Im Blut wurde die extrem reduzierte plDC-Frequenz der Doppelknockout-Tiere in den absoluten Zahlen gemildert, die leicht erhöhte plDC-Frequenz in Telomerase-Knockout-Tieren jedoch verstärkt (Abb. 58 F). Durch die extremen Schwankungen der Milzgrößen zwischen den Genotypen waren die absoluten Zahlen der plasmazytoiden Dendritischen Zellen in Telomerase-defizienten Tieren doppelt so hoch, bei kombinierter verminderter und fehlender MK2-Expression nur drei Viertel bzw. halb so hoch wie in Wildtypen (Abb. 58 D).

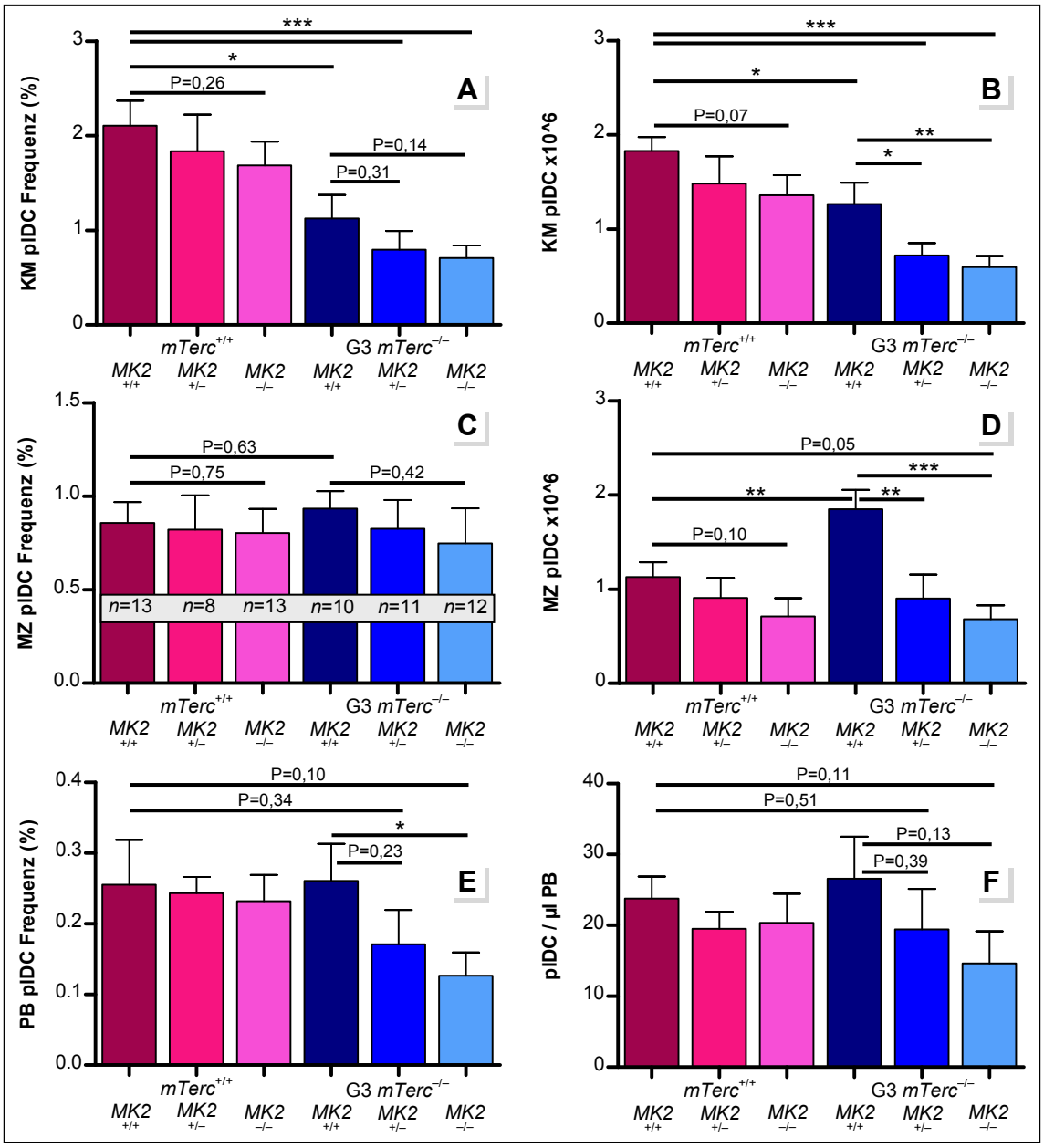

Abb. 58. Auch plDCs sind bei Deletion von *MK2* vermindert. Histogrammauswertung der durchflusszytometrischen Bestimmung von plasmazytoiden Dendritischen Zellen (plDC, $CD11c^+$ $CD11b^-$ $B220^+$) an Beinknochenmark (KM, A-B), Milz (MZ, C-D) und peripherem Blut (PB, E-F) der angegebenen Genotypen. Zur Berechnung der Zellzahlen (B, D, F) wurden die Gesamtzellzahlen für das jeweilige Organ bzw. die Leukozytenzahl pro Blutvolumen herangezogen. Siehe Tabellen 8, 11, 14 im Anhang.

Bei der Gesamtzellzahl in Knochenmark und Milz spielten Telomerase und MAPKAP-Kinase 2 gegenteilige Rollen: während in Knochenmark und Milz Telomerase-defizienter Tiere die Zahl der Leukozyten erhöht war, verminderte die reduzierte und fehlende MK2-Expression die Zellzahl in diesen Organen. Alle Telomerase-Knockout-Tiere hatten eine (normozytische) Anämie. Die leichte Leukozytose sowie die milde Thrombozytose im Blut Telomerase-defizienter Mäuse wurde durch das Fehlen von MK2 verstärkt. Der Telomerase-Knockout sorgte außerdem für eine Reduktion der Lymphozyten (B-, NK- und T-Zellen) und konventionellen Dendritischen Zellen, dagegen für einen Anstieg der myeloiden Zelltypen (Granulozyten und Monozyten) in Knochenmark, Milz und Blut. Der *MK2*-Knockout führte selbst schon zu einer Reduktion der B-, NK- und Dendritischen Zellen und zu einem Anstieg der Granulozyten und potenzierte hierbei den Phänotypen der Telomerase-Defizienz. Ein gegenläufiger Effekt zeigte sich dagegen mit der Erhöhung der T-Zellfrequenzen und der Verminderung von Monozyten und Makrophagen bei fehlender MAPKAP-Kinase 2.

3.3.8. Der *MK2*-Knockout reduziert die Zahl lymphoider Vorläuferzellen, hat aber keinen signifikanten Einfluss auf die B-Zell-Entwicklung im Knochenmark

Die Entwicklung der im Telomerase-Knockout beeinträchtigten Lymphozytenlinie – bestehend aus T-Zellen, NK-Zellen und B-Zellen – erfolgt über eine gemeinsame Vorläuferzelle (CLP, *common lymphoid progenitor*) im Knochenmark (Abb. 59). Frequenz und absolute Anzahl der CLPs waren bei verminderter und fehlender MK2-Expression im Wildtyphintergrund zwar nicht signifikant, aber dennoch sichtbar reduziert im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 60, rote Balken). Im Telomerase-Knockout-Hintergrund war dieser Effekt noch verstärkt: hatte Telomerase-defizientes Knochenmark (G3 $mTerc^{-/-}$ $MK2^{+/+}$) allein schon eine reduzierte CLP-Frequenz, verringerte sich die CLP-Frequenz und -Anzahl bei verminderter und fehlender MK2-Expression (G3 $mTerc^{-/-}$ $MK2^{+/-}$, G3 $mTerc^{-/-}$ $MK2^{-/-}$) auf ein Drittel der CLPs des Wildtypknochenmarks ($mTerc^{+/+}$ $MK2^{+/+}$, Abb. 60, blaue Balken).

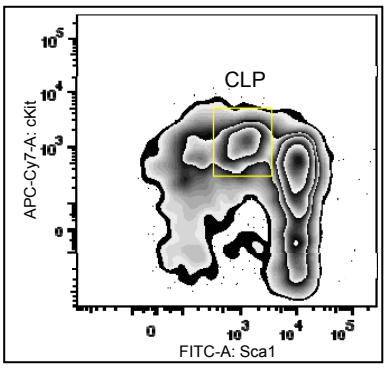

Abb. 59. Durchflusszytometrische *Gating*-Strategie für die gemeinsame lymphoide Vorläuferzelle (CLP, *common lymphoid progenitor*) im Knochenmark. Siehe auch Abb. 15.

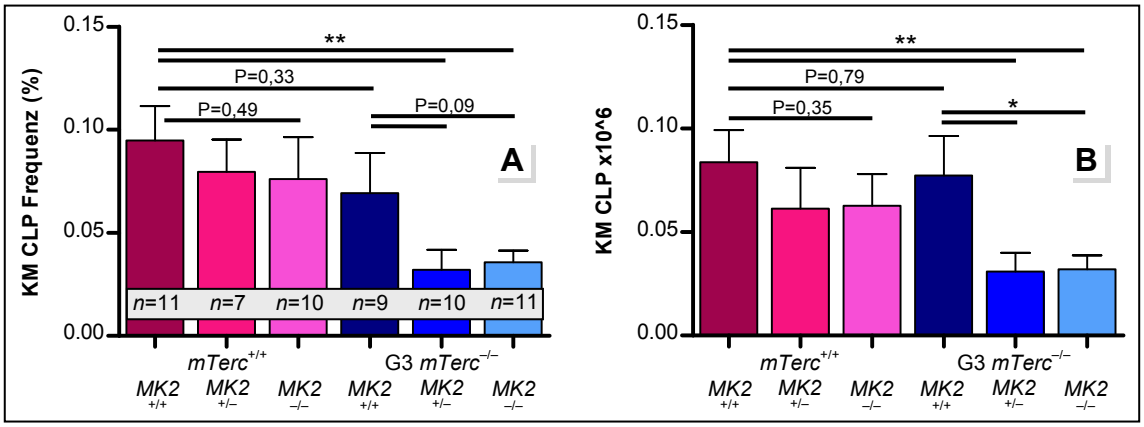

Abb. 60. *mTerc*- und *MK2*-Knockout reduzieren die lymphoiden Vorläuferzellen. Histogrammauswertung der durchflusszytometrischen Bestimmung (A) von oligopotenten Vorläuferzellen der lymphoiden Linie: CLP (*common lymphoid progenitor*, Lin^- IL-$7R\alpha^+$ Sca-$1^{+/-}$ $cKit^{+/-}$) im Beinknochenmark (KM) der angegebenen Genotypen. Zur Berechnung der Zellzahlen (B) wurden die Gesamtzellzahlen für das Beinknochenmark herangezogen. Siehe Tabelle 8 im Anhang.

Die weitere Entwicklung der T-Zellen läuft im Thymus ab, wobei über die eine, das Knochenmark verlassende und den Thymus besiedelnde Vorläuferzelle noch diskutiert wird (Chi et al., 2009). Da weder reduzierte noch fehlende MK2-Expression die Thymusatrophie der Telomerase-Knockout-Mäuse verhinderte, der Thymus in allen Telomerase-Wildtypmäusen äußerlich keine Unterschiede aufwies und es Ziel dieser Arbeit war, die Telomerase- und *MK2*-Doppelknockout-Maus daraufhin zu untersuchen, ob *MK2*-Defizienz den Telomerase-Knockout-Phänotyp beeinflusst, wurde die T-Zellentwicklung im Thymus nicht untersucht. Da sowohl die Telomerase- als auch die *MK2*-Knockout-Maus keinen ausgeprägten Phänotyp hinsichtlich der Zahl der NK-Zellen in Knochenmark, Milz und Blut hat(te), wurden auch die in der Literatur beschriebenen NK-Vorläuferzellen nicht untersucht (Di Santo, 2006; Di Santo und Vosshenrich, 2006). Die dritte Gruppe lymphoider Zellen, die B-Zellen, zeigten im Knochenmark eine milde, in der Milz und im Blut eine stärkere Reduktion abhängig von der Stärke der MK2-Expression (Abb. 44), weshalb die in der Literatur sehr gut beschriebenen B-Zell-Entwicklungsstufen weiter analysiert wurden (z.B. Nagasawa, 2006; Abb. 61).

Präpro-B-Zellen zeigten hinsichtlich Frequenz und Anzahl keine Abhängigkeit von der Dosis der MK2-Expression, aber eine leichte Reduktion in der Frequenz in allen Telomerase-defizienten Gruppen (Abb. 62 A-B). Pro-B-Zellen hingegen zeigten eine drastische, mehr oder weniger *MK2*-unabhängige Reduktion in Frequenz und Anzahl in allen Telomerase-Knockout-Tieren auf ungefähr ein Viertel, prä-B-Zellen sogar auf nur ein Zehntel der Werte der Telomerase-Wildtypgruppen (Abb. 62 C-F, blaue Balken).

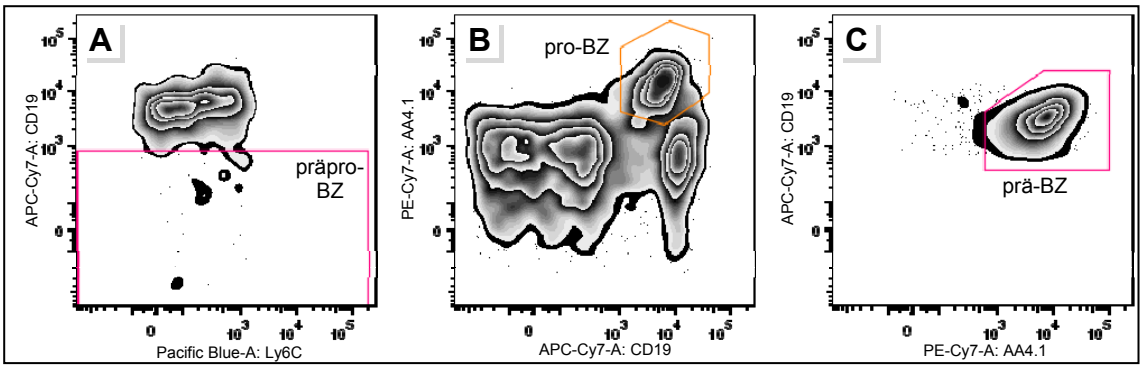

Abb. 61. *Gating* bei der Durchflusszytometrie von B-Zellvorstufen (BZ) im Knochenmark. Siehe Abb. 16.

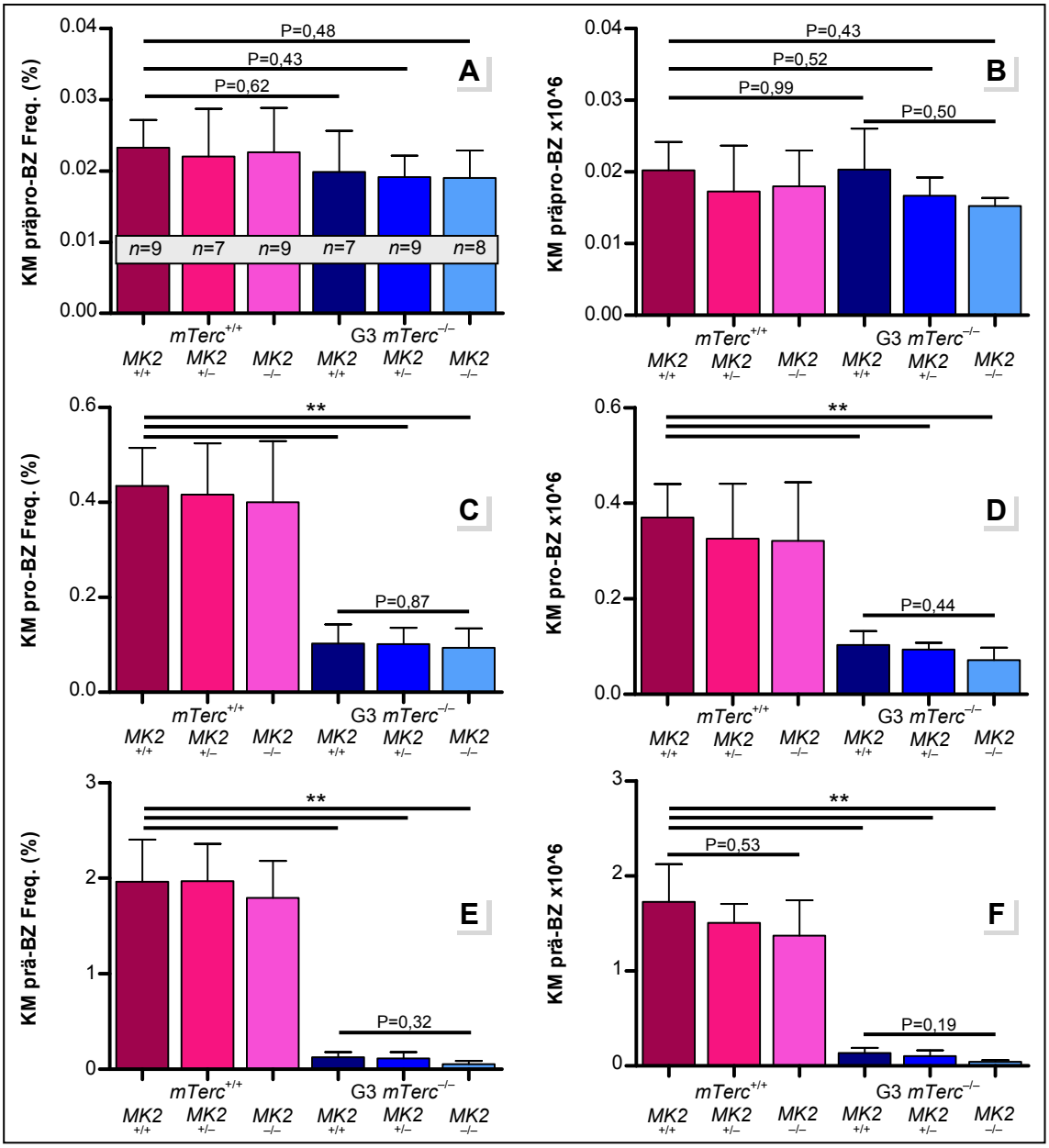

Abb. 62. *mTerc*$^{-/-}$-Mäuse zeigen einen Entwicklungsstopp bei den pro-B-Zellen, *MK2*$^{-/-}$-Mäuse eine Reduktion der prä-B-Zellen. Histogrammauswertung der durchflusszytometrischen Bestimmung von B-Vorläuferzellen: präpro-B-Zellen (A-B, B220$^+$ CD43$^+$ CD19$^-$ AA4.1$^+$ Ly6C$^-$), pro-B-Zellen (C-D, B220$^+$ CD43$^+$ CD19$^+$ AA4.1$^+$), prä-B-Zellen (E-F, B220$^+$ CD43$^-$ CD19$^+$ AA4.1$^+$) im Beinknochenmark (KM) der angegebenen Genotypen. Zur Berechnung von Zellzahlen (B, D, F) wurden die Gesamtzellzahlen für das Beinknochenmark herangezogen. Siehe Tabelle 8 im Anhang.

Eine Abhängigkeit von der MK2-Expression war in geringem Ausmaß in Telomerase-Wildtyptieren in den pro-B-Zellen und etwas stärker in den prä-B-Zellen zu erkennen, als dass bei abnehmender *MK2*-Dosis Frequenz und Anzahl beider Zelltypen sanken (Abb. 62 C-F, rote Balken).

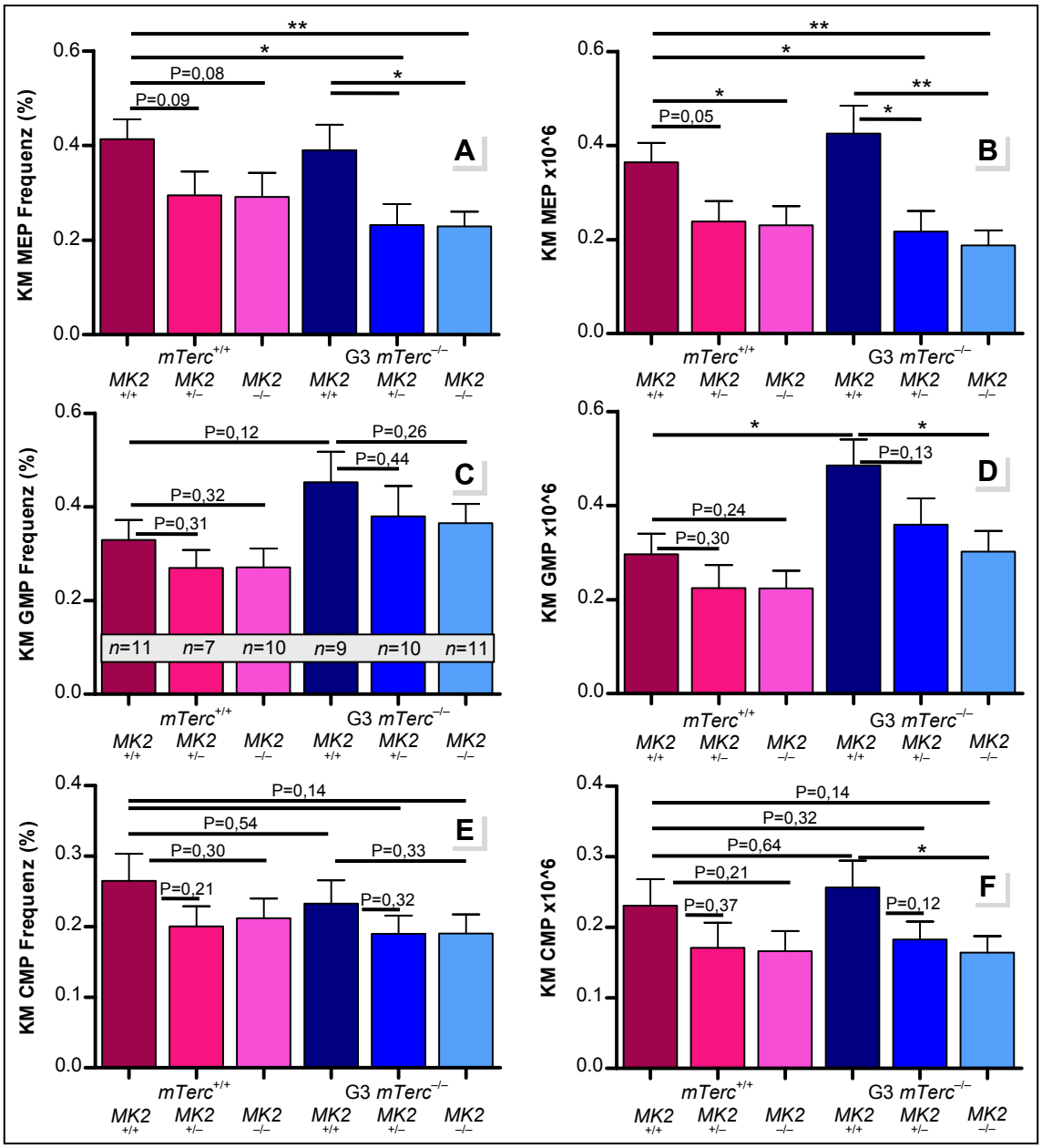

Abb. 63. *MK2*-Defizienz führt zur Verminderung von myeloiden Vorläuferzellen. Histogrammauswertung der durchflusszytometrischen Bestimmung des Anteils von oligopotenten Vorläuferzellen der myeloiden Linie (gemeinsame Antigene: Lin^- IL-7Rα^- $Sca\text{-}1^-$ $cKit^+$): A) MEP (*megakaryocyte/erythroid progenitor*, $CD34^-$ $Fc\gamma R^-$), C) GMP (*granulocyte/macrophage progenitor*, $CD34^+$ $Fc\gamma R^+$), E) CMP (*common myeloid progenitor*, $CD34^+$ $Fc\gamma R^{+/-}$) im Beinknochenmark (KM) der angegebenen Genotypen. Zur Berechnung von Zellzahlen (B, D, F) aus prozentualen Anteilen wurden die Gesamtzellzahlen für das Beinknochenmark herangezogen. Siehe Tabelle 9 im Anhang.

3.3.9. *MK2*-Defizienz führt auch zu einer Reduktion der myeloiden Vorläuferzellen

Da in Telomerase- und/oder *MK2*-Knockout-Tieren vermehrt Granulozyten und Thrombozyten, jedoch weniger Erythrozyten zu finden waren, die Deletion von *MK2* aber zu einer Reduktion der in Telomerase-Knockout-Tieren erhöhten Monozytenzahlen führte, wurde die Möglichkeit untersucht, dass bereits die Vorläufer dieser Zellen im Knochenmark betroffen waren.

Das bislang gültige Konzept der Hämatopoese (Kawamoto und Katsura, 2009) geht davon aus, dass es neben einer Vorläuferzelle für lymphoide Zellen (CLP) auch eine für myeloide Zelltypen gibt (CMP), aus denen wiederum Vorläuferzellen mit weiter eingeschränktem Differenzierungspotential hervorgehen. Thrombozyten entstehen im Blut aus Megakaryozyten, Erythrozyten über Zwischenstufen aus denselben Vorläuferzellen (MEP). Monozyten/Makrophagen und Dendritische Zellen sowie Granulozyten gehen ebenfalls aus einem gemeinsamen Vorläufer hervor (GMP, Abb. 5, Abb. 64).

Die Frequenz der Megakaryozyten- und Erythrozyten-Vorläuferzellen (MEP, *megakaryocyte/erythroid progenitor*) sowie der gemeinsamen myeloiden Vorläuferzellen (CMP, *common myeloid progenitor*) wurden durch den Telomerase-Knockout leicht, durch fehlende MK2-Expression stärker vermindert (Abb. 63 A-B, E-F). In Telomerase-Knockout-Tieren waren im Gegensatz zu Wildtyptieren aber Frequenz und Anzahl der Granulozyten-/Makrophagen-Vorläuferzellen (GMP, *granulocyte/macrophage progenitor*) mehr oder weniger signifikant erhöht. Verminderte MK2-Expression führte auch bei diesem Zelltyp zu einer Reduktion in Frequenz und Zahl (Abb. 63 C-D).

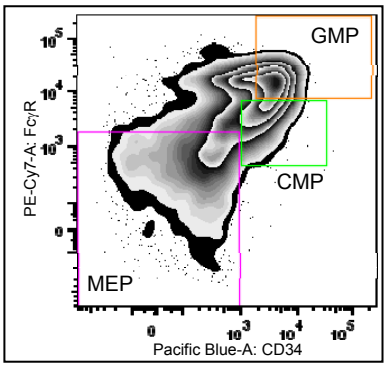

Abb. 64. Durchflusszytometrische *Gating*-Strategie bei der gemeinsamen myeloiden Vorläuferzelle (CMP), der Granulozyten- und Makrophagen-Vorläuferzelle (GMP) und der Megakaryozyten- und Erythrozyten-Vorläuferzelle (MEP) im Knochenmark. Siehe Abb. 15.

3.3.10. Der *MK2*-Knockout vermindert die Zahl der Erythroblasten in Knochenmark und Milz

Frühe, noch kernhaltige Erythroblasten reifen in sogenannten erythroblastischen Inseln (Nischen der Erythropoese) mit Hilfe von Makrophagen zu kernlosen Erythrozyten, die erst dann das Knochenmark verlassen und in die Zirkulation eintreten. In der adulten Maus spielt die Milz eine ebenso große Rolle in der Erythropoese wie das Knochenmark (Brodsky et al., 1966; Koury et al., 2002; Koury und Ponka, 2004).

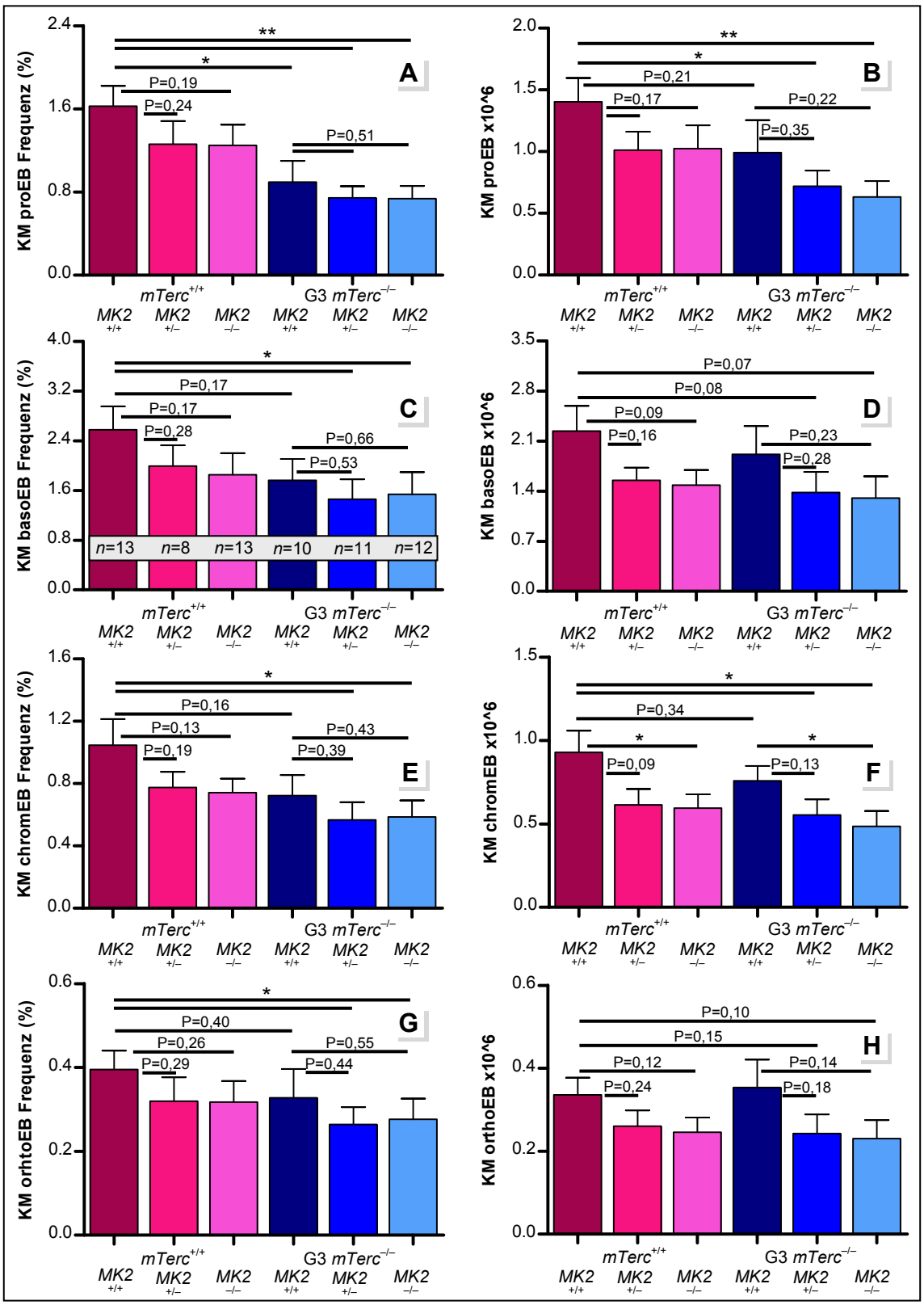

Abb. 65. Telomerase- und MK2-Defizienz schwächen die Erythropoese im Knochenmark. Histogrammauswertung der Durchflusszytometrie von Erythrozyten-Vorläuferzellen: Proerythroblasten (pro EB, A-B), basophile E. (baso EB, C-D), chromatophile E. (chrom EB, E-F), orthochromatophile E. (ortho EB, G-H) im Beinknochenmark (KM) der angegebenen Genotypen. Zur Berechnung der Zellzahlen (B, D, F, H) wurden die Knochenmarksgesamtzellzahlen herangezogen. Siehe Tabelle 9 im Anhang.

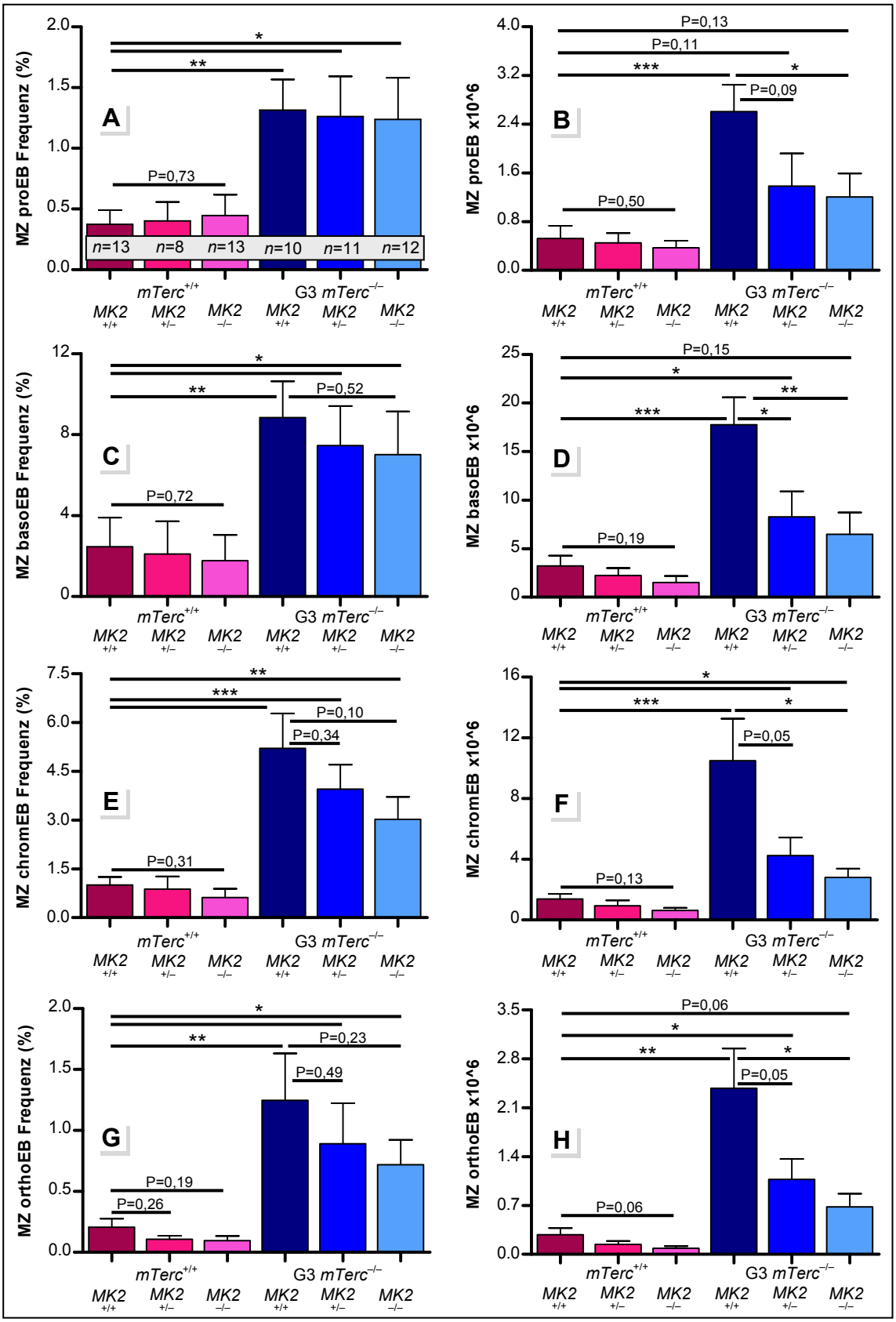

Abb. 66. MK2-defiziente Mäuse haben auch in der Milz weniger Erythroblasten, *mTerc*$^{-/-}$-Mäuse dagegen sehr viel mehr. Histogrammauswertung der Durchflusszytometrie von Erythrozytenvorläuferzellen in der Milz (MZ, siehe Abb. 65) der angegebenen Genotypen. Zur Berechnung der Zellzahlen (B, D, F, H) wurden die Milzgesamtzellzahlen herangezogen. Siehe Tabelle 12 im Anhang.

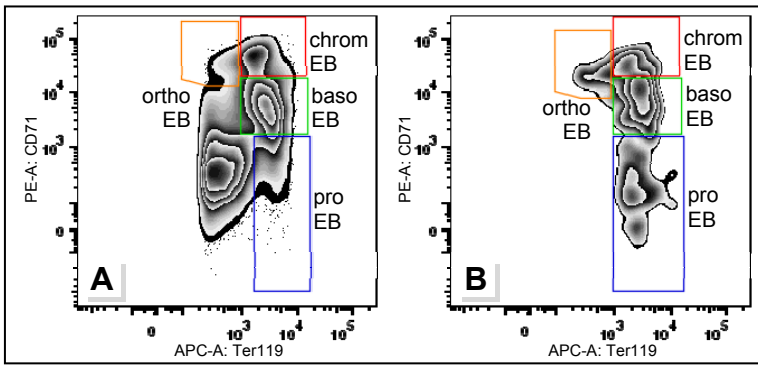

Abb. 67. *Gating*-Strategie bei der durchflusszytometrischen Bestimmung von Erythroblastensubtypen (ortho EB, orthochromatophile Erythroblasten; chrom EB, chromatophile Erythroblasten; baso EB, basophile Erythroblasten; pro EB, Proerythroblasten) im Knochenmark (A) und in der Milz (B). Siehe auch Abb. 14.1-2.

Telomerase-Knockout-Tiere (G3 $mTerc^{-/-}$ $MK2^{+/+}$) zeigten im Blut reduzierte Erythrozytenzahlen (Abb. 42.2 E) und hatten auch im Knochenmark niedrige Frequenzen der Erythrozytenvorläuferzellen (Abb. 67 A). Dabei war die fünfzigprozentige Reduktion der Proerythroblasten (proEB) bei den stark proliferierenden baso- und chromatophilen Erythroblasten (baso/chromEB) gemildert. Der prozentuale Anteil der letzten (über Ter119 und CD71 detektierbaren) Entwicklungsstufe vor der Kernausstoßung, der orthochromatophilen Erythroblasten (orthoEB) am Knochenmark war nur noch wenig niedriger als in Wildtypmäusen ($mTerc^{+/+}$ $MK2^{+/+}$). Auf Grund der höheren Zellularität des Knochenmarks Telomerase-defizienter Tiere waren die absoluten Zahlen der Erythrozytenvorläuferzellen nicht signifikant reduziert, orthoEBs sogar in gleicher Anzahl wie in Wildtyptieren vorhanden. Der *MK2*-Knockout ($mTerc^{+/+}$ $MK2^{+/-}$ und $MK2^{-/-}$) hatte den gleichen Einfluss auf die Frequenz der Erythroblasten wie der Telomerase-Knockout, wenngleich schwächer. In Doppelknockout-Tieren (G3 $mTerc^{-/-}$ $MK2^{+/-}$ und $MK2^{-/-}$) potenzierten sich die Effekte, sodass in diesen Tieren Frequenz und Anzahl aller Erythroblastentypen niedriger war als in Wildtyptieren (Abb. 65).

In der Milz hatte der *MK2*-Knockout den gleichen dezimierenden Einfluss auf Erythroblasten-Frequenzen und -Anzahlen wie im Knochenmark. Telomerase-defiziente Mäuse allerdings hatten prozentual vier bis sechs Mal mehr, absolut sogar fünf bis acht Mal mehr Erythroblasten in der Milz als Wildtyptiere (Abb. 66 und 67).

3.3.11. Auch auf primitivste hämatopoetische Vorläuferzellen und Stammzellen hat der Verlust von *MK2* einen negativen Einfluss

Wie in Abbildung 5 dargestellt, entstehen alle Immunzellen über ein hierarchisches System aus Vorläuferzellen mit verschiedenem Differenzierungspotential, das in der hämatopoetischen Stammzelle ihren Ursprung hat. Möglich ist die lebenslange Hämatopoese dank des Potentials der Stammzellen zur Selbsterneuerung und Differenzierung. Basierend auf der Dauer, für die Stammzellen die Hämatopoese aufrecht erhalten können,

unterscheidet man zwischen Langzeit- und Kurzzeitstammzellen, die sich lebenslang bzw. nur vorübergehend selbst erneuern können. Aus Kurzzeitstammzellen entstehen multipotente Vorläuferzellen, die kaum noch selbsterneuerungsfähig sind, aber volles Differenzierungspotential besitzen (Lai et al., 2005; Yang et al., 2005).

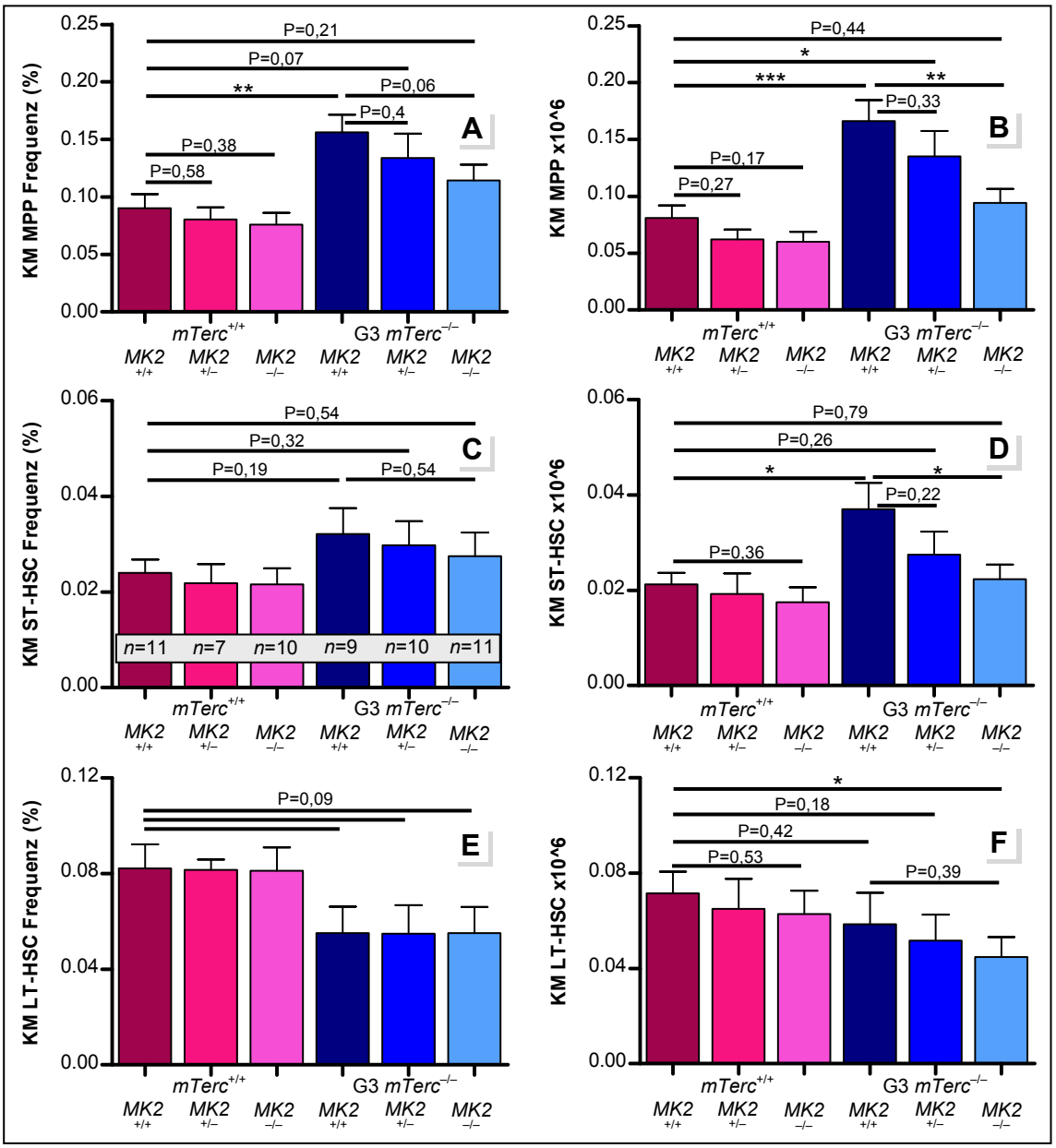

Abb. 68. Der *MK2*-Knockout reduziert die in Telomerase-defizienten Tieren vermehrt auftretenden Kurzzeitstammzellen und Multipotenten Vorläuferzellen. Histogrammauswertung der durchflusszytometrischen Bestimmung des Anteils pluripotenter Vorläuferzellen und hämatopoetischer Stammzellen (gemeinsame Antigene: Lin^- IL-7Rα$^-$ Sca-1^+ cKit^+): A und B) MPP (*multipotent progenitor*, $CD34^+$ $Flt3^+$), C und D) ST-HSC (*short-term hematopoetic stem cell*, $CD34^+$ $Flt3^-$), E und F) LT-HSC (*long-term hematopoetic stem cell*, $CD34^-$ $Flt3^-$) im Beinknochenmark (KM) der angegebenen Genotypen. Zur Berechnung der Zellzahlen (B, D, F) aus den prozentualen Anteilen wurden die Gesamtzellzahlen für das Beinknochenmark herangezogen. Siehe Tabelle 10a im Anhang.

Hämatopoetische Kurzzeitstammzellen (ST-HSC, *short-term hematopoetic stem cell*) und Multipotente Vorläuferzellen (MPP, *multipotent progenitor*) waren in Frequenz und Anzahl in Telomerase-Knockout-Mäusen (G3 $mTerc^{-/-}$ $MK2^{+/+}$) im Vergleich zur Wildtypkontrolle ($mTerc^{+/+}$ $MK2^{+/+}$) erhöht (Abb. 68 A-D). Verminderte MK2-Expression ($MK2^{+/-}$, $MK2^{-/-}$) führte zu einer mehr oder weniger signifikanten Reduktion beider Zelltypen im Telomerase-Wildtyp- und Telomerase-Knockout-Hintergrund (Abb. 68). Hämatopoetische Langzeitstammzellen (LT-HSC, *long-term hematopoetic stem cell*) hingegen waren im Vergleich zum Wildtypknochenmark in Frequenz und Zahl in Telomerase-Knockout-Mäusen reduziert, wobei *MK2*-Defizienz hier (G3 $mTerc^{-/-}$ $MK2^{+/-}$, G3 $mTerc^{-/-}$ $MK2^{-/-}$) noch zu einer weiteren Reduktion in der absoluten Zahl dieser Stammzellen führte (Abb. 68 E-F).

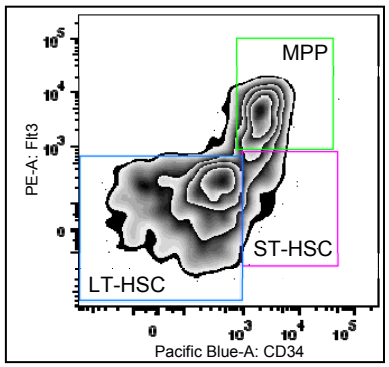

Abb. 69. Durchflusszytometrische *Gating*-Strategie für die multipotente Vorläuferzelle (MPP, *multipotent progenitor*), die Kurz- und Langzeit-Stammzelle (ST- und LT-HSC, *short-term* und *long-term hematopoietic stem cell*) im Knochenmark. Siehe Abb. 15.

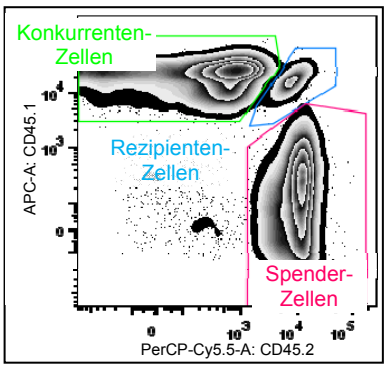

Abb. 70. Durchflusszytometrische *Gating*-Strategie bei der Blutanalyse nach einer kompetitiven Transplantation. Siehe Abb. 17.

Da neben dem zahlenmäßigen Vorkommen der Stamm- und Vorläuferzellen natürlich auch deren Funktionalität eine Rolle bei der Effizienz der Hämatopoese spielt, wurde diese in Transplantationsexperimenten untersucht. Hierbei wurden Knochenmarkszellen von Mäusen der verschiedenen *mTerc*- und *MK2*-Genotypen zusammen mit (Konkurrenten-)Knochenmarkszellen von Wildtypmäusen in Empfängermäuse injiziert. Die Proliferationsfähigkeit des Empfängermausknochenmarks war zuvor durch γ-Strahlung ausgeschaltet worden, sodass nur Spenderzellen zur Blutbildung beitrugen. Eine quantitative Beurteilung der Repopulationsfähigkeit des jeweiligen Spenderknochenmarks war über die Herkunftsanalyse der Blutleukozyten in den Empfängermäusen möglich, da Konkurrentenzellen die CD45.1-Variante des Leukozytenantigens (CLA, *common leukocyte antigen*, CD45, Ly5) tragen, Spenderzellen jedoch CD45.2 (Abb. 70).

Stammzellen aller Telomerase-Knockout-Spender konnten sich in ihrer Repopulationsfähigkeit nur schlecht mit Konkurrenten-Stammzellen messen. Ihr Anteil am Blut der Empfängertiere lag bei nur 40-50% einen Monat nach der Transplantation und bei nur noch 30-45% sechs Monate nach der Transplantation. *MK2*-Knockout-Stammzellen waren in der Wettbewerbssituation mit parallel transplantiertem Konkurrenten-Knochenmark weniger leistungsfähig als Wildtypstammzellen, denn sie trugen nur zu 65% bis 70% zum Empfängerblut bei, während Wildtypstammzellen zwischen 70% und 85% beisteuerten. Dieser Unterschied war bei 3 und 6 Monaten nach der Transplantation signifikant. Im Telomerase-defizienten Hintergrund war ebenfalls eine Tendenz dahingehend zu sehen, dass das Fehlen von MK2 zu einer Verschlechterung der Stammzellfunktion führte. Lag *MK2* noch im heterozygoten Zustand vor, zeigten diese Stammzellen eine ähnliche Repopulations- bzw. Konkurrenzfähigkeit wie die Kontrollstammzellen im Telomerase-Wildtyp- und -Knockout-Hintergrund (Abb. 71).

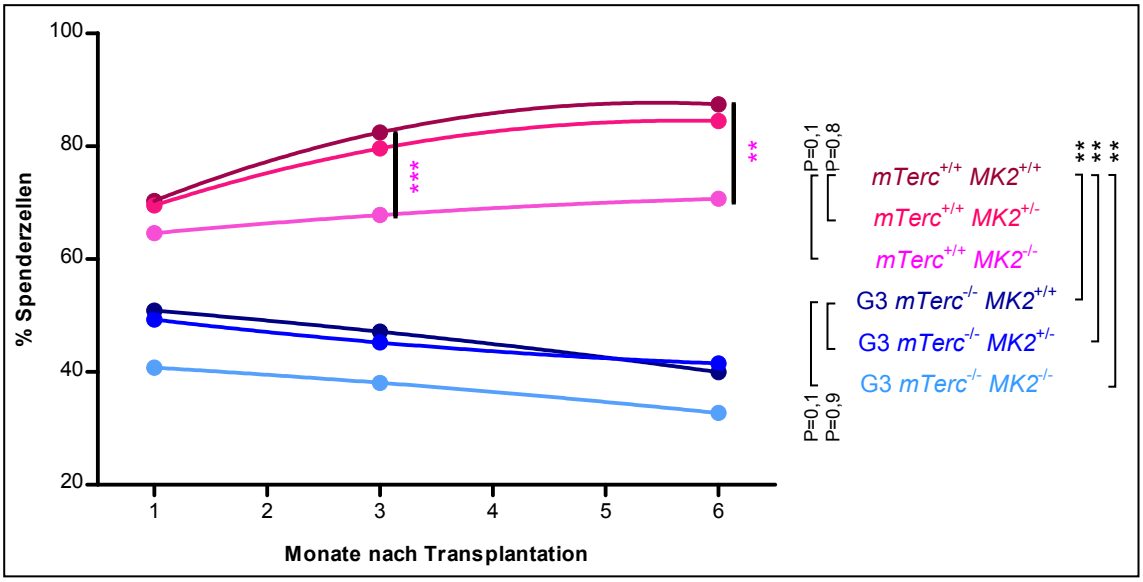

Abb. 71. *MK2*- und Telomerase-Defizienz beeinträchtigen die Stammzellfunktion. Vom Spendertierknochenmark entstammende weiße Blutzellen in den Transplantat-Empfängertieren 1, 3 und 6 Monate nach der kompetitiven Knochenmarkstransplantation (4 Spender pro Genotyp in unabhängigen Experimenten, 3 Empfänger pro Spender, Verhältnis Spender- zu Konkurrenzknochenmark 3:2). Siehe Tabelle 10b, Anhang.

Der Verlust sowohl von *MK2* als auch von Telomerase führte zur Verminderung lymphoider Vorläuferzellen, wobei sich diese Effekte in Doppelknockout-Mäusen potenzierten. B-Lymphozytenvorläufer waren vom *MK2*-Knockout nicht so stark betroffen, in Telomerase-Knockout-Mäusen jedoch zeigten B-Lymphozyten einen Entwicklungsstopp auf der Stufe der pro-B-Zellen. Während Telomerase-defiziente Tiere vermehrt Vorläufer der myeloiden Zelltypen Granulozyten/Makrophagen und Megakaryozyten/

Erythrozyten bildeten, hatte das Fehlen der MAPKAP-Kinase 2 auf all diese Vorläuferzellen einen negativen Einfluss. Die Erythropoese im Knochenmark wurde durch beide Knockouts eingeschränkt, allerdings zeigten Telomerase-defiziente Mäuse vermehrt Erythroblasten in der Milz. Nicht nur die Zahl der Stammzellen war in Telomerase-defizienten Tieren reduziert, sondern auch deren Funktion; verminderte MK2-Expression hatte zwar keinen Einfluss auf die Stammzellzahl, reduzierte jedoch deren Repopulationsfähigkeit und verstärkte damit den Einfluss des Telomerase-Knockouts.

3.3.12. *MK2*-Defizienz führt zur partiellen Normalisierung der Zytokinexpression in Telomerase-defizienten Mäusen

Die Hämatopoese wird an vielen Punkten bei Proliferation und Differenzierung ganz entscheidend von interzellulären Botenstoffen beeinflusst, ebenso wie auch das Immunsystem bei der Rekrutierung und Reifung spezialisierter Leukozyten. Da die Hämatopoese in den hier untersuchten Mäusen teils stark von der Wildtypsituation abwich, wurde deren Blutplasma mittels membranbasierten Zytokintests untersucht, um einen Überblick über die systemische Expression bzw. Ausschüttung möglichst vieler Faktoren zu erhalten. In Abbildung 72.1 sind die Membranen mit Chemilumineszenzsignalen abgebildet, Zytokine mit differentieller Expression sind farbig eingekreist. Die Intensität der einzelnen Punkte wurde über die jeweilige Positivkontrolle mit den Werten des Wildtypplasmas normalisiert (Abb. 72.2).

GM-CSF (Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor) und die antiinflammatorischen Zytokine IL (Interleukin)-13, IL-4 und IL-10 waren im Blutplasma von Telomerase-Knockout-Mäusen (G3 $mTerc^{-/-}$ $MK2^{+/+}$, △) in geringerer Menge als im Wildtypblutplasma vorhanden ($mTerc^{+/+}$ $MK2^{+/+}$, ○; Abb. 72.2 A, F-H). In zwei Fällen, bei IL-13 und IL-4, wurde bei der Kombination des Telomerase- mit dem *MK2*-Knockout (G3 $mTerc^{-/-}$ $MK2^{-/-}$, □) die Expression dieser Zytokine wieder auf Wildtypniveau gefunden (Abb. 72.2 F-G). Im Fall von GM-CSF war die Expression in Doppelknockout-Mäusen sogar noch geringer als bereits in Telomerase-defizienten Tieren und damit auf dem Niveau der *MK2*-Knockout-Mäuse ($mTerc^{+/+}$ $MK2^{-/-}$, ◇). In Doppelknockout-Mäusen ebenfalls noch niedriger als schon in Telomerase-Knockout-Mäusen war die Expression von IL-10 (Abb. 72.2 H), wobei in *MK2*-defizienten Tieren IL-10 doppelt so hoch exprimiert wurde wie in Wildtyptieren. BLC (B-Lymphozyten Chemoattraktant), MIP-3α (Makrophagen-inflammatorisches Protein 3 alpha), IL-6 und G-CSF (Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor) waren in Telomerase-Knockout-

Mäusen mit MK2-Expression in größerer Menge als im Wildtypplasma vorhanden (Abb. 72.2 B-E). Die Expression dieser vier Faktoren war im *MK2*-Knockout-Plasma ähnlich wie im Wildtypen, in Doppelknockout-Mäusen waren diese Faktoren nur noch leicht erhöht, IL-6 niedriger als in der Wildtypkontrolle.

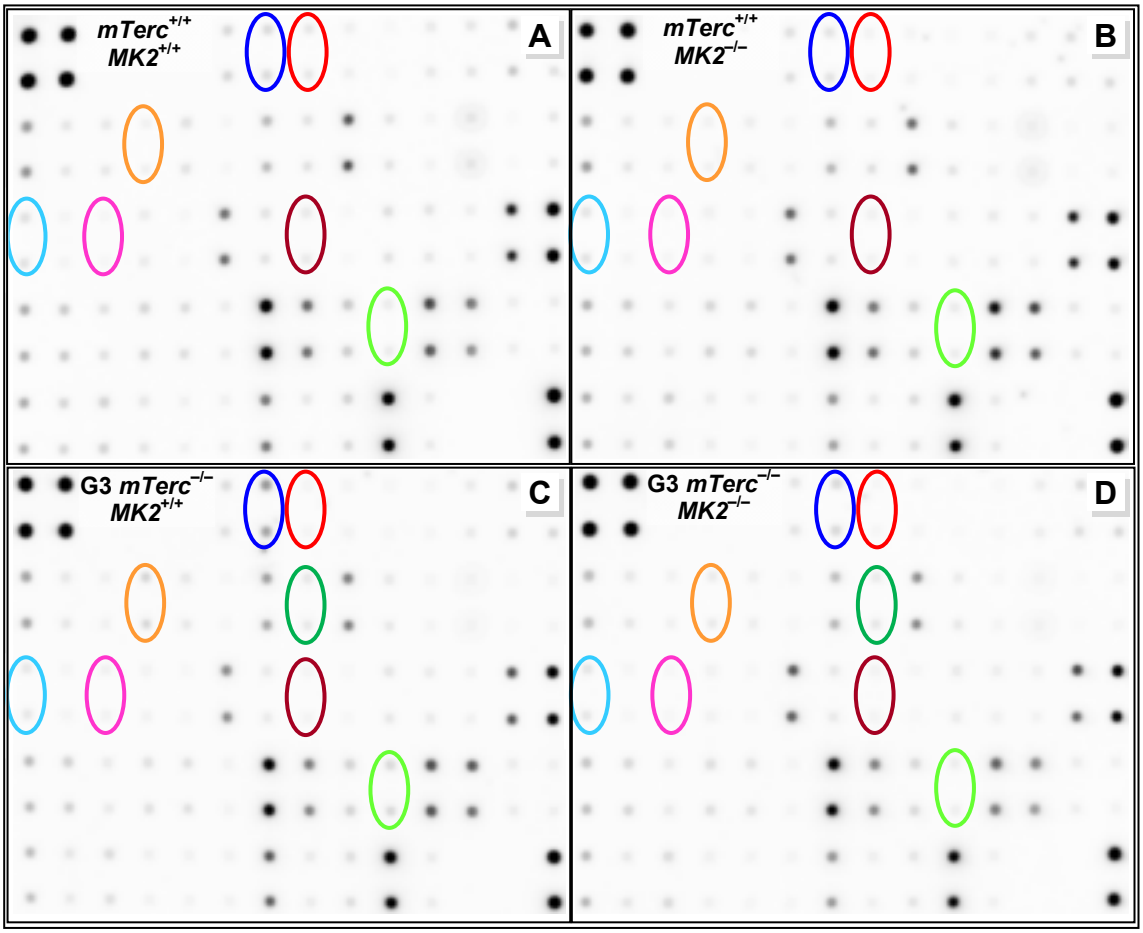

Abb. 72.1. Zytokinexpressionsmuster in den verschiedenen Genotypen. Entwickelte Membranen des Zytokinarrays auf gepooltem Blutplasma von 10 Mäusen pro angegebenem Genotyp. Positivkontrollen 4x links oben und 2x rechts unten, daneben Negativkontrollen 4x rechts unten. Differentiell exprimierte Zytokine: grün MIP-3α, blau BLC, dunkelrot IL-13, pink IL-6, orange G-CSF, rot GM-CSF, hellblau IL-4, dunkelgrün IL-10.

Die Expression der beiden Zytokine im Blutplasma Telomerase-defizienter Tiere (G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/+}$) mit der größten Abweichung zum Wildtyp wurde auf Einzelproben überprüft. Die differentielle Expression von G-CSF und IL-6 wie sie mittels Membran-Dotblots auf vereinigten Plasmaproben bestimmt worden war (Abb. 72.2), konnte durch ELISAs auf Einzelproben verifiziert und zudem genauer bestimmt werden. Verminderte und fehlende MK2-Expression führten zu einer rund 25%igen Reduktion der G-CSF-Expression schon im Wildtyphintergrund (Abb. 73 A). Im Blutplasma Telomerase-defizienter Mäuse ist der G-CSF-Spiegel 10 Mal höher als in Wildtypmäusen.

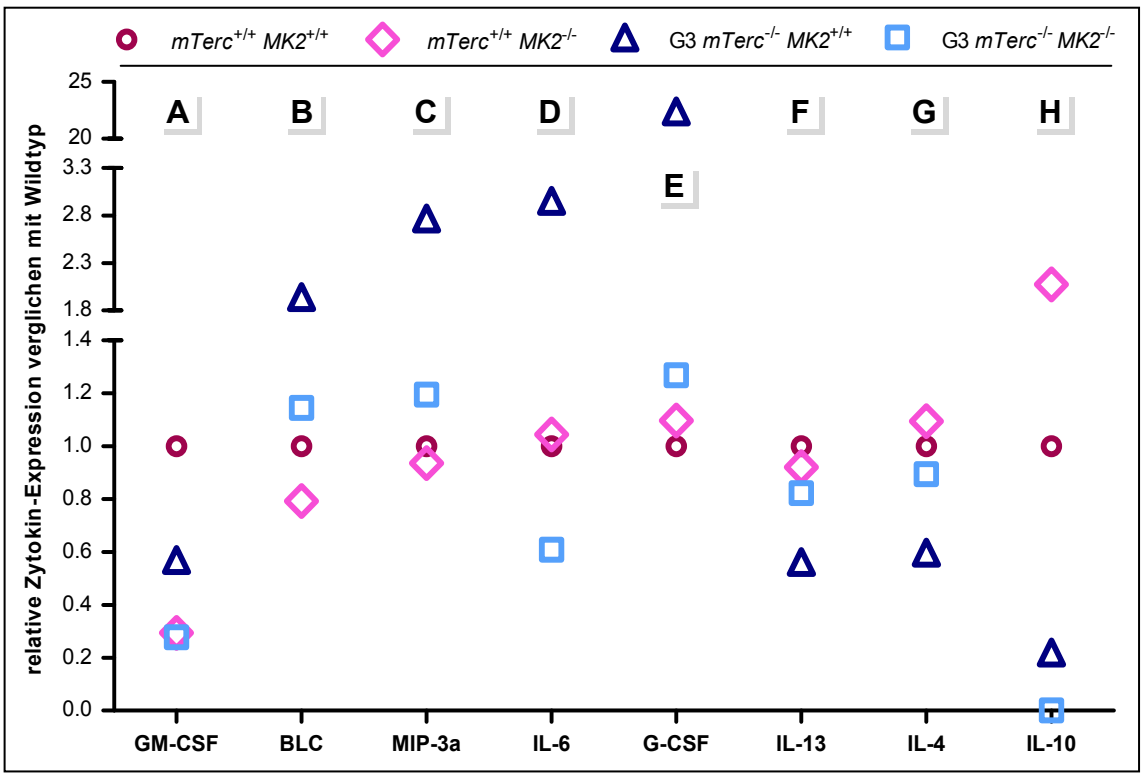

Abb. 72.2. *MK2*-Defizienz normalisiert die bei Telomerase-Defizienz erhöhten Level einiger Zytokine. Normalisierte Werte des Zytokinarrays auf gepooltem Blutplasma von 10 Mäusen pro Genotyp für Zytokine mit differentieller Expression. GM-CSF, Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor; BLC, B-Lymphozyten Chemoattraktant; MIP-3alpha, Makrophagen-inflammatorisches Protein 3 alpha; G-CSF, Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor; IL, Interleukin.

Heterozygote und fehlende MK2-Expression konnten hier zwar die G-CSF-Expression nicht auf Wildtypniveau senken, jedoch um die Hälfte reduzieren (Abb. 73 A, blaue Balken). IL-6 war im Telomerase-Wildtypplasma auf sehr niedrigem Niveau zu detektieren und MK2 hatte darauf keinen nennenswerten Einfluss (Abb. 73 B, rote Balken). Im Blutplasma Telomerase-defizienter Mäuse war die IL-6-Konzentration auf das siebenfache des Wildtypwertes erhöht, verminderte und fehlende MK2-Expression konnten die IL-6-Konzentration um die Hälfte reduzieren (Abb. 73 B, blaue Balken).

In gealterten Telomerase-Knockout-Mäusen ließ sich eine Verminderung von Zytokinen im Blutplasma beobachten, die charakteristisch für eine T_H2- oder hauptsächlich humorale Immunantwort sind (IL-4, IL-10, IL-13). In Doppelknockout-Mäusen konnten diese teils wiederhergestellt werden (IL-4, IL-13). IL-10 jedoch, eines der wichtigsten anti-inflammatorischen Zytokine, blieb auf niedrigem Niveau. Dagegen war beim pro-inflammatorischen Zytokin IL-6 und dem Wachstumsfaktor G-CSF im Blutplasma Telomerase-defizienter Tiere ein Anstieg zu verzeichnen, der in Doppelknockout-Tieren teilweise normalisiert wurde.

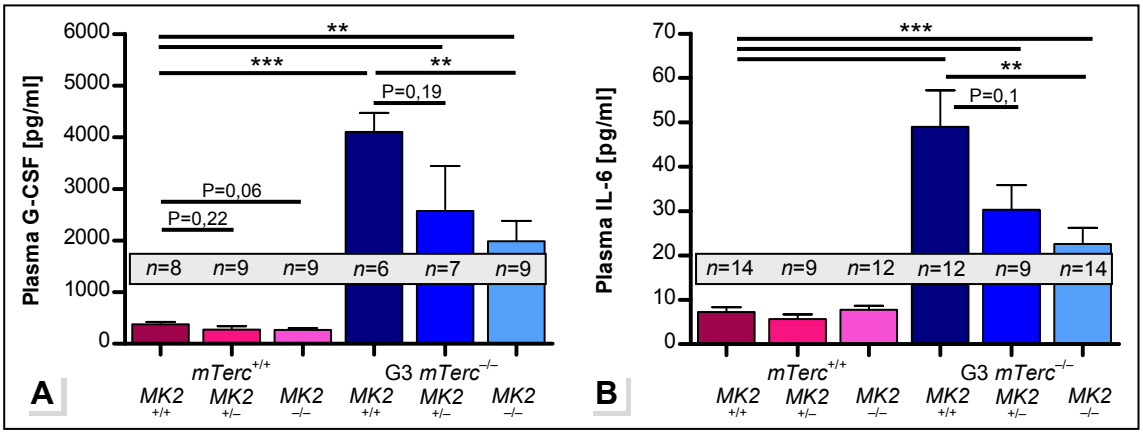

Abb. 73. *MK2*-Defizienz reduziert die stark erhöhten Mengen von G-CSF und IL-6 in *mTerc*$^{-/-}$-Blutplasma. A) G-CSF (Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor) und B) Interleukin (IL)-6 im Blutplasma von Mäusen der angegebenen Genotypen detektiert mittels ELISA. Siehe Tabelle 17 im Anhang.

3.3.13. Die Deletion von *MK2* reduziert die Zahl der Stammzellen, die im Blut zirkulieren und teils auch die extramedulläre Hämatopoese

Die Lymphopoese im Knochenmark und wahrscheinlich auch im Thymus, sowie die Funktion der hämatopoetischen Stammzellen war in Telomerase-defizienten Tieren eingeschränkt. Zudem war der hämatopoetische Wachstumsfaktor G-CSF und das proinflammatorische Zytokin IL-6 im Blutplasma von Telomerase-Knockout-Tieren angereichert. Ausgehend von diesen Voraussetzungen bzw. Anzeichen für extramedulläre Hämatopoese wurden Blut und Milz auf das Vorkommen von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen untersucht.

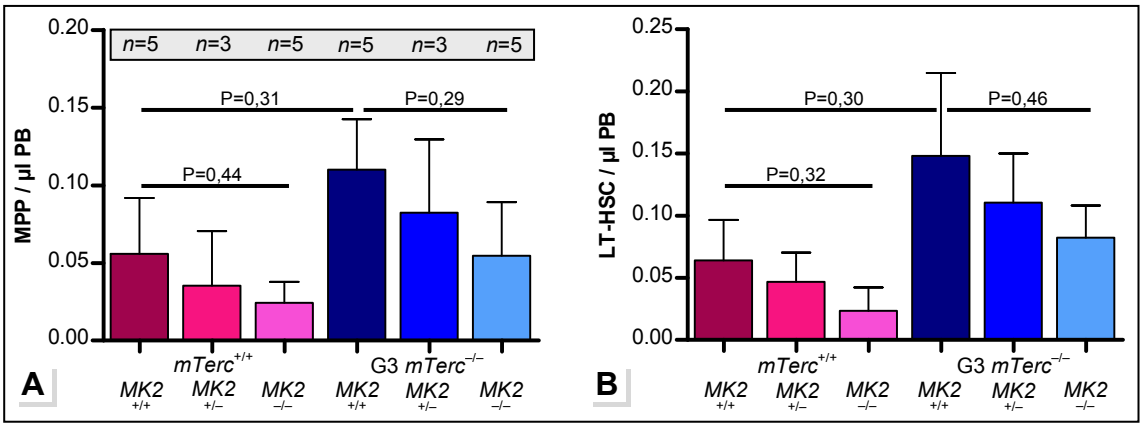

Abb. 74. Das Ausschalten von *MK2* reduziert die Zahl der im Blut Telomerase-defizienter Mäuse zirkulierenden hämatopoetischen Stammzellen. Histogrammauswertung der durchflusszytometrischen Bestimmung von pluripotenten Vorläuferzellen bzw. hämatopoetischen Stammzellen: A) MPP (*multipotent progenitor*) und B) LT-HSC (*long-term hematopoetic stem cell*) im Blut (PB) der angegebenen Genotypen. Zur Berechnung der Zellzahlen wurde die Leukozytenzahl pro Blutvolumen herangezogen. *Gating* siehe Abb. 15, Daten siehe Tabelle 16 im Anhang.

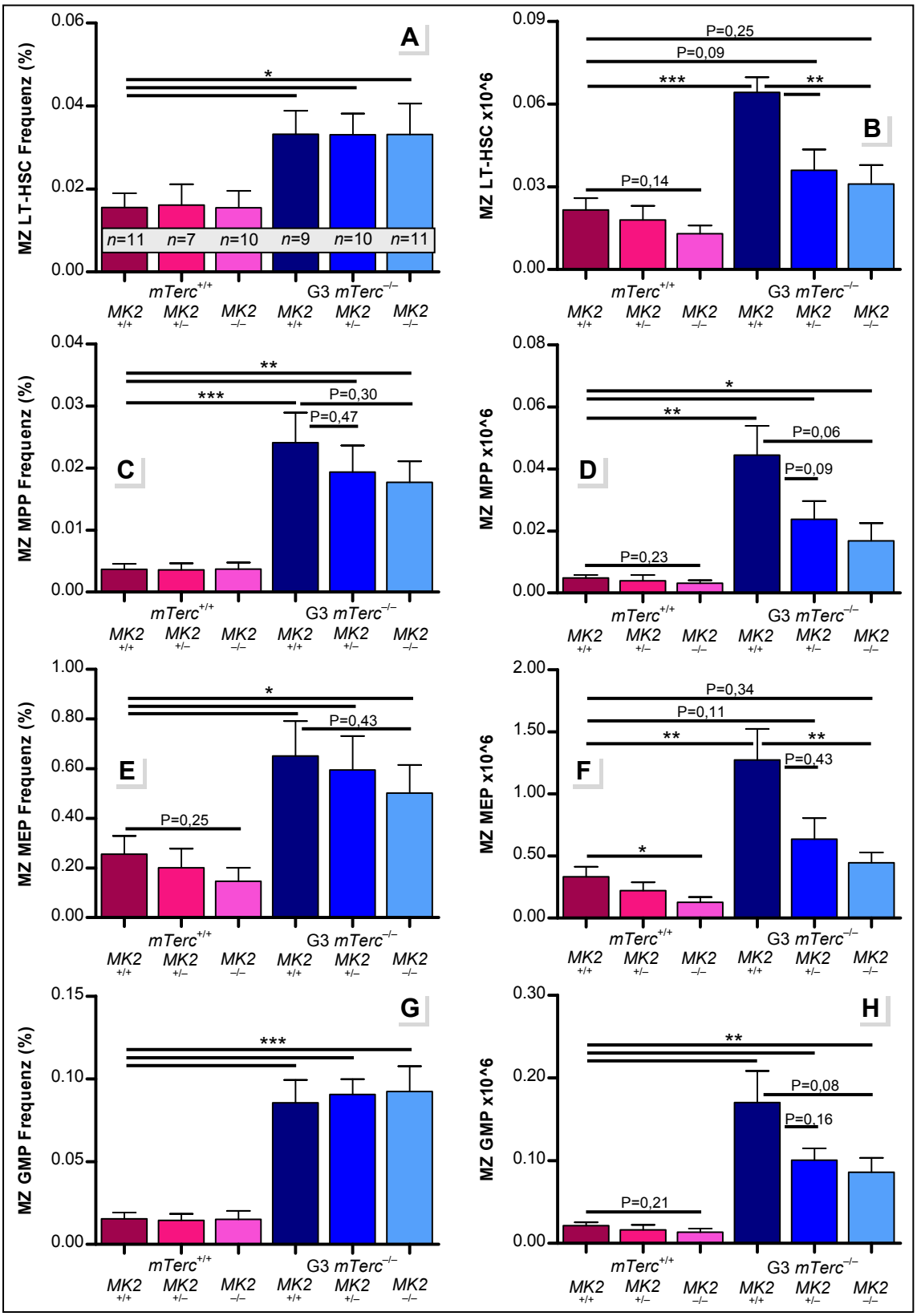

Abb. 75. *MK2*-Defizienz vermindert die extramedulläre Hämatopoese in der Milz Telomerase-defizienter Mäusen nur teilweise. Histogrammauswertung der durchflusszytometrischen Bestimmung von hämatopoetischen Vorläufer- und Stammzellen: A-B) LT-HSC (*long-term hematopoetic stem cell*), C-D) MPP (*multipotent progenitor*), E-F) MEP (*megakaryocyte/erythroid p.*), G-H) GMP (*granulocyte/macrophage p.*) in der Milz der angegebenen Genotypen. Zur Berechnung der Zellzahlen (B, D, F, H) wurden Milz-Gesamtzellzahlen herangezogen. *Gating* siehe Abb. 15, Daten s. Tabellen 12 und 13, Anhang.

Im Vergleich zum Blut der Wildtyptiere waren im Blut Telomerase-defizienter Mäuse tatsächlich doppelt so viele primitive Vorläuferzellen (Abb. 74 A) und Stammzellen (Abb. 74 B) zu finden, deren Zahl sich jedoch fast bis auf Wildtypniveau verringerte, je weniger MK2 diese Tiere exprimierten.

Alle Gruppen Telomerase-defizienter Mäuse (G3 *mTerc*$^{-/-}$) hatten erhöhte Frequenzen von Vorläufer- und Stammzellen in der Milz. Auf den Anteil von Stammzellen (LT-HSC) an der Milz hatte MK2 keinen Einfluss (Abb. 75 A). Das Vorkommen der multipotenten Vorläufer (MPP) und der Vorläuferzellen für Megakaryozyten und Erythrozyten (MEP) in der Milz wurde jedoch schon in der Frequenz negativ durch den *MK2*-Knockout beeinflusst (Abb. 75 C und 75 E). Granulozyten/Makrophagen-Vorläuferzellen (GMP) zeigten mit abnehmender MK2-Expression einen leichten Anstieg in der Frequenz (Abb. 75 G). Da die Größe der Milz mit sinkender MK2-Expression abnahm (Abb. 40 B), waren die absoluten Anzahlen primitiver Vorläufer- und Stammzellen in der Milz der *MK2*-heterozygoten und *MK2*-defizienten Mäuse im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen verringert und waren bei Stammzellen (LT-HSC) und Megakaryozyten/Erythrozyten-Vorläuferzellen (MEP) in der Zahl fast gleich der Wildtypkontrolle (Abb. 75 B und 75 F).

3.3.14 *MK2*-Defizienz hat einen negativen Einfluss auf die Zellzyklusprogression im Knochenmark und in der Milz

Wachstumshormon (GH, Abb. 36) und der hämatopoetische Wachstumsfaktor G-CSF (Abb. 73) waren im Blutplasma Telomerase-defizienter Mäuse um ein Vielfaches erhöht. Das Fehlen von *MK2* führte im Fall von GH zu einer weiteren Zunahme, im Fall von G-CSF jedoch zu einem Rückgang. Zudem zeigten Telomerase-Knockout-Mäuse Zeichen extramedullärer Hämatopoese, die durch das Ausschalten von *MK2* zumindest teilweise verringert werden konnten (Abb. 74 und 75).

Inwieweit fehlende MAPKAP-Kinase 2 die Abnahme der Zellzahlen in Knochenmark und Milz durch Beeinflussung des Zellzyklus verursachte, wurde mittels intrazellulärer Färbung des DNS-Gehalts und des Proliferationsmarkers Ki67 bestimmt. Dabei waren proliferierende Zellen mit wenig DNS (einem Chromosomensatz) in der G1-Phase (DAPI^{+} Ki67^{+}), nicht proliferierende Zellen in G0 (DAPI^{+} Ki67^{-}), proliferierende Zellen mit doppelt so viel DNS (zwei Chromosomensätzen, DAPI^{++} Ki67^{+}) in der S-, G2- und M-Phase des Zellzyklus.

Der Telomerase-Knockout (G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/+}$) führte zu einem signifikanten Anstieg der nicht proliferierenden Knochenmarkszellen der G0-Phase des Zellzyklus verglichen mit dem Wildtypknochenmark (*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/+}$, Abb. 76 A). *MK2*-Defizienz änderte daran im Telomerase-Knockout-Hintergrund kaum etwas (G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{-/-}$), führte aber allein (*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{-/-}$) ebenfalls zu einer Zunahme der Zellen in G0. Die restlichen Zellen des Wildtypknochenmarks verteilten sich gleichmäßig auf die G1- und die S/G2/M-Phasen des Zellzyklus, während *MK2*- und Telomerase-Knockout- sowie Doppelknockout-Knochenmarkszellen etwas seltener in G1 als in S/G2/M gefunden wurden (Abb. 76 B-C).

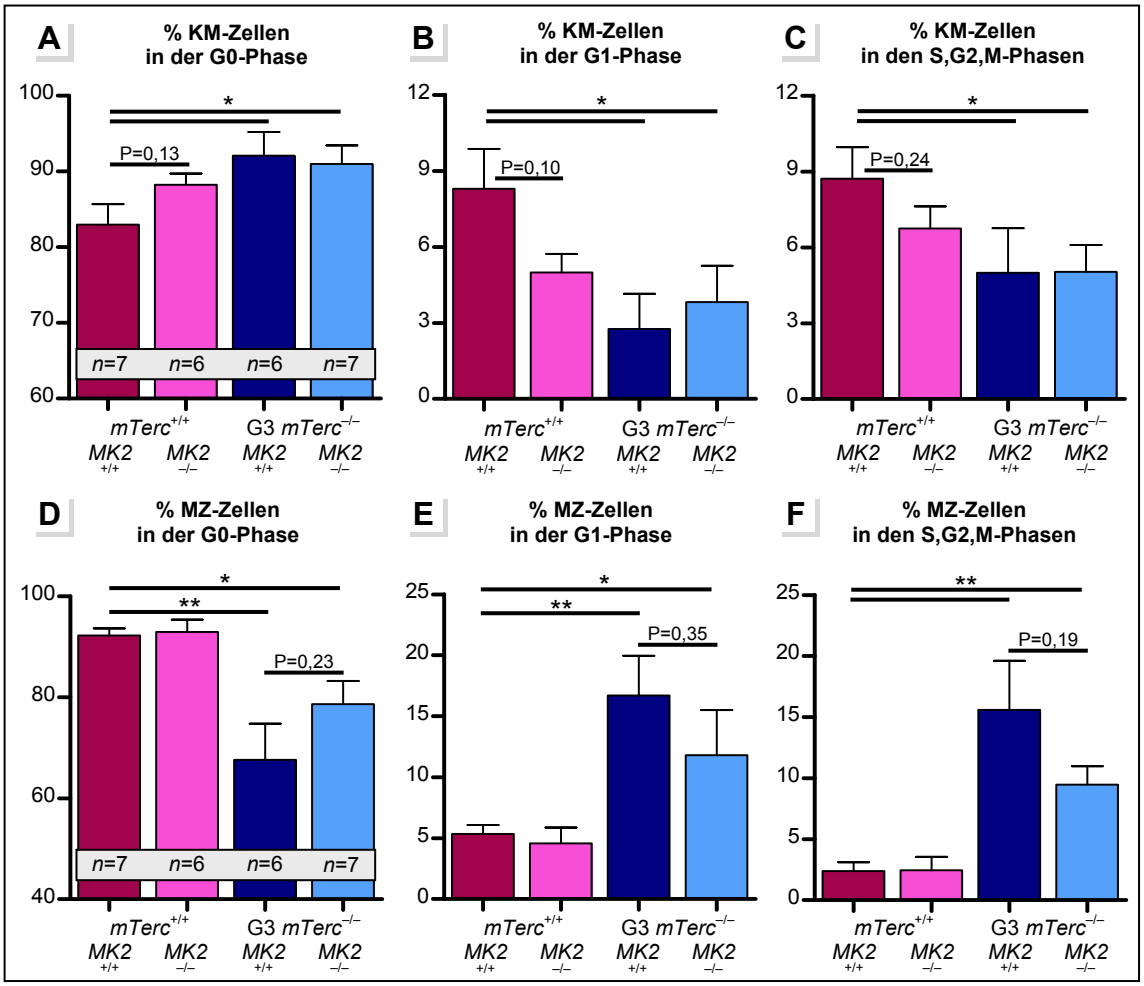

Abb. 76. *MK2*-Defizienz hemmt die Zellteilung im hochproliferativen Hintergrund. Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellzyklusphase von Knochenmarks- (A-C) und Milzzellen (D-F) der angegebenen Genotypen (DAPI-DNS- und Ki67-Proliferationsfärbung). *Gating* siehe Abb. 18.

Während Knochenmarkszellen der Telomerase-defizienten Gruppen (G3 *mTerc*$^{-/-}$) weniger Teilungsaktivität zeigten als die im Wildtypen, waren deren Milzzellen hoch proliferativ (Abb. 76 D). Auch in der Milz hatte das Fehlen von *MK2* einen negativen

Einfluss auf die stark proliferierenden Zellen, sodass in der Doppelknockout-Milz Zellen in G1- und S/G2/M-Phasen des Zellzyklus wieder deutlich weniger waren als im Telomerase-Knockout (Abb. 76 E-F).

Das Fehlen von *MK2* hatte immer auf die Zellen einen teilungshemmenden Einfluss, die stark proliferierten: das Knochenmark im Wildtyphintergrund und die Milz bei Telomerase-Defizienz. Die verminderte Teilungsaktivität Telomerase-defizienten Knochenmarks ist auch ein Hinweis darauf, dass extramedulläre Hämatopoese zur ausreichenden Blutbildung in diesen Tieren notwendig sein könnte und Doppelknockout-Tiere durch die reduzierte Milzzellproliferation in dieser Hinsicht benachteiligt sein könnten.

3.3.15 MK2 hat keinen Einfluss auf die Telomerlänge

In differenzierten hämatopoetischen Zellen Telomerase-defizienter Tiere war die (relative) Telomerlänge signifikant reduziert im Vergleich zu Kontrolltieren. Die Deletion von *MK2* hatte keinen Einfluss auf die Telomerlänge.

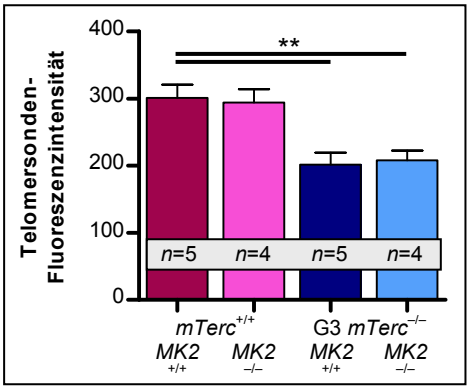

Abb. 77. Bestimmung der relativen Telomerlänge in Knochenmarkszellen der angegebenen Genotypen. Die Messung erfolgte durchflusszytometrisch (FlowFISH). *Gating* siehe Abb. 20.

4. Diskussion

4.1. DNS-Schädigung und Zellzyklus im Darmepithel

Telomerase-defiziente Mäuse der dritten und aller späteren Inzuchtgenerationen haben verkürzte Telomere (Rudolph et al., 1999). Kritisch kurze Telomere können die Chromosomenenden nicht mehr davor schützen, als DNS-Schaden (Strangbruch) erkannt und prozessiert zu werden. Die Induktion der DNS-Schädigungssignalkaskade führt zur Aktivierung des sogenannten Seneszenzkontrollpunktes (M1, Mortalitätsstadium 1; Shay et al., 1991; Zou et al., 2004). Seneszente Zellen sind durch permanenten Zellzyklusarrest und Apoptose charakterisiert, die durch Akkumulation von p53 und Aktivierung von p21 erreicht werden (Shay et al., 1991; Brown et al., 1997; d'Adda di Fagagna et al., 2003; Jackson und Pereira-Smith, 2006), wie in Kryptenzellen des Dünndarms von Telomerase-Knockout-Mäusen gezeigt werden konnte.

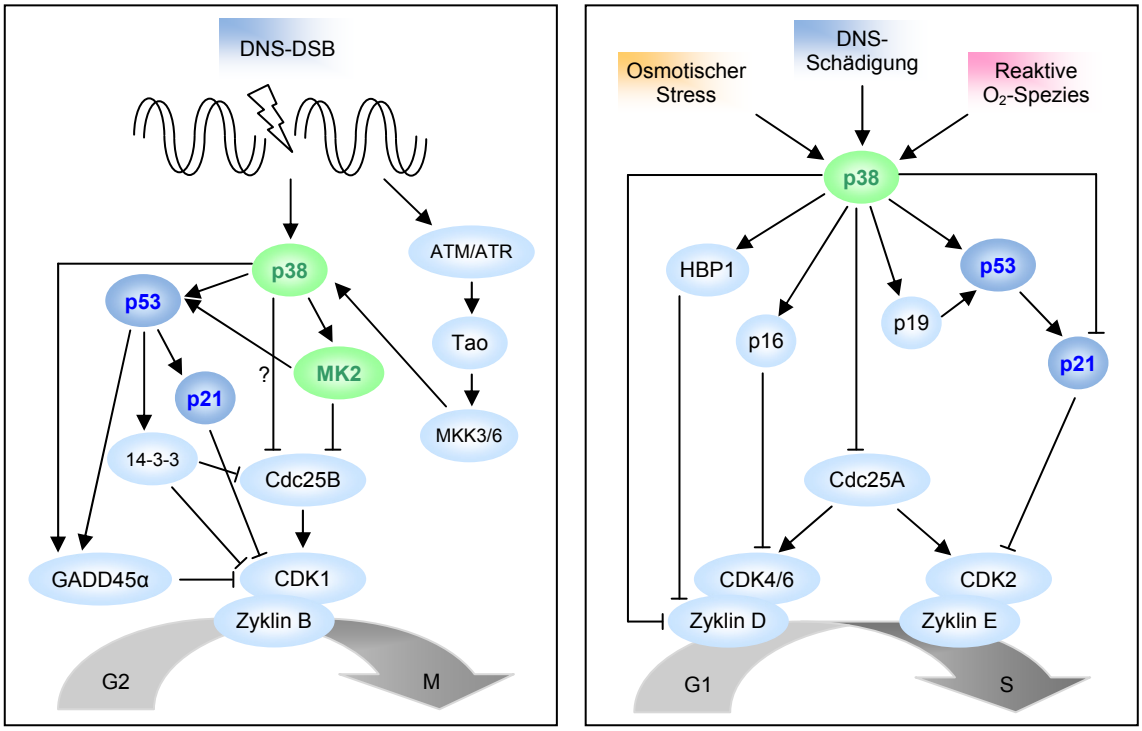

Abb. 78. Die Rolle von p38 und MK2 bei DNS-Schädigungs-/Zellzykluskontrollpunkten (nach Thornton und Rincon, 2009). DSB, Doppelstrangbruch; ATR, *ATM (Ataxia telangiectasia-mutated) and Rad3-related*; GADD, *growth arrest and DNA damage*; Cdc, *cell division cycle*; CDK, *cyclin dependent kinase*.

Neben den konventionellen Modulen der DNS-Schädigungsantwort (ATM/Chk2 und ATR/Chk1; siehe 1.2) wurde in einigen Studien auch eine Beteiligung der p38/MK2-Signalkette an der Zellzykluskontrolle gefunden (Abb. 78). Sowohl p38 als auch MK2

können in Antwort auf UV-strahlungsbedingte DNS-Schäden p53 phosphorylieren und damit stabilisieren, was zu Zellzyklusarrest, Seneszenz und/oder Apoptose führt. MK2 kann zudem die Ubiquitinligase Mdm2 (*Murine double minute 2*) phosphorylieren, die so nicht mehr zur Degradation von p53 beitragen kann (Bulavin et al., 1999; She et al., 2002; Wu, 2004; Weber et al., 2005). Ein entscheidender Hinweis darauf, dass p38 und MK2 eine Rolle bei den Telomer-DNS-Schädigungssignalen spielen, kommt von Studien um das Werner-Syndrom (WS). WS-Patienten leiden an frühzeitiger Alterung, die mit Telomerverkürzung korreliert. WS-Fibroblasten zeigen eine Aktivierung von p38, erhöhte p21-Level und replikative Seneszenz durch Zellzyklusarrest (Davis et al., 2006; Bagley et al., 2010). Darauf basierend wurde die Hypothese formuliert, dass das Ausschalten von MK2 und damit die Unterbrechung der Stresskinasekaskade die zu Seneszenz und Apoptose führende Aktivierung der p53/p21-Signale nach Telomer-verkürzungsbedingter DNS-Schädigung unterdrückt und somit Gewebsschaden vermieden werden könnte.

Im Gegensatz zur Deletion von p53 oder p21 zeigte die Deletion von MK2 in Telomerase-defizienten Mäusen keinen Einfluss auf das Überleben der Tiere. Telomerverkürzung im hämatopoetischen System konnte durch das Ausschalten von MK2 nicht verhindert werden, sodass Telomerase-Knockout-Mäuse ungeachtet der MK2-Expression um ein Drittel kürzere Telomere hatten als Wildtypmäuse. MK2 hatte einen stabilisierenden Einfluss auf DNS-schädigungsinduziertes p53 und p21 im Darmepithel, denn beim Fehlen dieser Kinase in Telomerase-Knockout-Därmen wurden tatsächlich weniger p53/p21-positive Zellen gefunden (Abb. 80). Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu der von Weber et al. beschriebenen Stabilisierung von p53 bei MK2-Defizienz in Kulturzellen (Weber et al., 2005). Allerdings wurde diese Beobachtung an immortalisierten Zellen (MEFs) gemacht, in denen eine Störung der p53-Signaltransduktion wahrscheinlich ist; in primären Zellen hatte der Knockdown von MK2 nur einen geringen Einfluss auf p53 nach UV-Bestrahlung (Weber et al., 2005). Die von She et al. beschriebene, nach UV-Bestrahlung einer epidermalen Zelllinie auftretende Phosphorylierung von p53 selbst, sowohl durch p38 als auch durch MK2 (She et al., 2002), beschreibt ein ähnliches wie das hier gewonnene Bild der abgeschwächten p53-Aktivierung nach Telomer-DNS-Schädigung im p53-profizienten Telomerase/*MK2*-Doppelknockout-Darmepithel. Bei Fehlen von MK2 ist auch p38 weniger stabil (Kotlyarov et al., 2002; Yannoni et al., 2004), weshalb die p38-abhängige Phosphorylierung von p53 vermindert ist. Da p53 deshalb mit Mdm2 assoziiert bleibt und degradiert wird, werden p53-Zielgene wie p21 vermindert abgelesen. Eine Abschwächung der erhöhten p21-Level konnte auch in Werner-

Syndrom-Fibroblasten nach Behandlung mit einem p38-Inhibitor erreicht werden (Davis et al., 2006). Da aber sowohl ATM/Chk2 als auch ATR/Chk1 als Sensoren von DNS-Doppelstrangbrüchen und Telomer-DNS-Schädigung noch aktiv sind, wird der Signalweg durch das Fehlen von MK2 nicht abgeschaltet, sodass auch in Doppelknockout-Därmen eine Aktivierung von p53 stattfindet (Abb. 80).

Die aus der Prozessierung kritisch kurzer Telomere wie auch aus der „Reparatur" anderer DNS-Strangbrüche resultierenden chromosomalen Fusionen sind als Anaphasenbrücken sichtbar. Während Telomerase-defiziente Darmkryptenzellen erwartungsgemäß vermehrt Anaphasenbrücken zeigten, führte das Ausschalten von MK2 ebenfalls zur Häufung dieser Fusionen. Deshalb kann vermutet werden, dass MK2 zum ordnungsgemäßen Arrest des Zellzyklus nach DNS-Schädigung notwendig ist beziehungsweise dass die Aktivierung der p38/MK2-Signalkaskade die Akkumulation von DNS-Schäden in proliferierenden (Darm-)Zellen verhindert. Zumindest scheint der Anstieg der Anaphasenbrücken in *MK2*-Knockout-Mäusen auf das Sechsfache des Wildtypniveaus unabhängig von der p53/p21-Signalkaskade zu sein, denn die Zahl der für diese Signalmoleküle positiven Zellen war nicht erhöht. Neben der p38/MK2-vermittelten Aktivierung von p53/p21 und der negativen Regulierung von Zyklin D1 am G1/S-Kontrollpunkt (siehe 1.3; Bulavin et al., 1999; She et al., 2002; Lavoie et al., 1996; Casanovas et al., 2000) und der inhibierenden Phosphorylierung der Cdc25B-Phosphatase am G2/M-Kontrollpunkt (Bulavin et al., 2001; Manke et al., 2005), spielen die p38/MK2-Signale aber auch am Spindelkontrollpunkt eine Rolle (Meta-/Anaphase; Takenaka et al., 1998; Bettencourt-Dias et al., 2004; Tang et al., 2008; Yuan et al., 2010) und sind an der Modellierung des Aktin-Zytoskeletts beteiligt (Kotlyarov et al., 2002; Singh et al., 2003; Guerra et al., 2008; Gaestel, 2006). Deshalb könnten weitere Erklärungen für die im Telomerase-profizienten Hintergrund vermehrt auftretenden Anaphasenbrücken bei Fehlen von MK2 auch sein, dass (Darm-)Zellen trotz natürlich auftretender DNS-Schäden hier auf Grund eines unfunktionellen Spindelkontrollpunktes in die Mitose eintreten beziehungsweise dass auf Grund von Spindelabnormalitäten chromosomale Fehlverteilungen bei der Mitose stattfinden.

Im Telomerase-Knockout-Hintergrund ist das für das Überleben (im Gegensatz zur Apoptose) einer Zelle maximale Ausmaß chromosomaler Instabilität wahrscheinlich schon erreicht, denn die Anzahl der Anaphasenbrücken ist bei zusätzlichem Fehlen von MK2 nicht weiter erhöht. Möglich ist aber auch, dass der durch Abwesenheit von MK2 verursachte Anstieg der chromosomalen Instabilität nicht mehr anhand einer Zunahme der Anaphasenbrücken beobachtet werden kann, weil diese erneut auftretende Fusionen

in wiederholten Zellzyklen sind (Fusions-Zerreißungszyklen) oder weil Zellen mit zu starker DNS-Schädigung auf Grund der Aktivierung der zwar schwächeren aber doch vorhandenen p53/p21-Signale durch Apoptose entfernt wurden. Ob in *MK2*-Knockout-Mäusen bereits chromosomal instabile Stammzellen zur Darmregeneration beitragen, wie das in darmepithelspezifisch p53-defizienten Tieren gezeigt wurde, könnte in zukünftigen Studien mittels CGH analysiert werden (Begus-Nahrmann et al., 2009).

4.2. Darmstruktur und Ernährungszustand

Telomerase-Defizienz und dabei auftretender Zellzyklusarrest und Apoptose führen bei gleichbleibender Abschilferung ausgedienter Darmzellen dazu, dass Villi und Krypten durch die Darmstammzellen nicht erneuert werden und diese Mäuse daher an Villus- und Kryptenatrophie leiden. Gegen eine Verstärkung des bereits massiven Zelltods im Darm bei Verlust von Telomerase und MK2 spricht, dass die Zahl der Krypten und Villi in Doppelknockout-Därmen nicht weiter reduziert war als mit MK2-Expression. Auch im Telomerase-profizienten Hintergrund führte das Fehlen von MK2 nicht zu einer Abnahme der Anzahl von Villi und Krypten. Wahrscheinlich ist, dass auf Grund der aktivierten p53/p21-Signalkaskade bei Telomer-DNS-Schädigung die Zellen im Zyklus arretiert sind und deshalb MK2-abhängige Spindelprobleme hinsichtlich der Entfernung geschädigter Zellen keine große Rolle spielen.

Wenn sich in *MK2*-Knockout-Tieren wegen gestörten Zellzyklusarrests chromosomal instabile Darmstamm- und *transit amplifying* Zellen weiter teilen und akkumulieren, kommen zwar offensichtlich nicht weniger, aber eventuell funktionell beeinträchtigte differenzierte Zellen am Villus an. Differenzierte, postmitotische Darmepithelzellen sind absorptive Enterozyten und sekretorische Becherzellen, Paneth- und enteroendokrine Zellen (Porter et al., 2002; Schonhoff et al., 2004; van der Flier und Clevers, 2009; Drozdowski et al., 2010; Kim und Ho, 2010). Die sowohl in *MK2*- als auch in Telomerase-Knockout-Tieren aus der Häufung anormaler Zellen entstehende eingeschränkte Darmfunktion könnte die niedrigen postprandialen Blutzuckerspiegel und das geringe Körpergewicht der Tiere erklären. Das Ausmaß der Mangelernährung wurde auch im intraperitonealen Glucose-Toleranztest (IPGTT) deutlich, bei dem Glucose nicht über den Darm, sondern über das Peritoneum als Dialysemembran ins Blut gelangt. Dreißig Minuten nach Injektion der Glucose war deren Konzentration im Blut aller Genotypen angestiegen, in *MK2*- und Telomerase-Knockout-Tieren jedoch weniger, in Doppelknockout-Tieren nur auf die Hälfte des Wildtypwerts. Das lässt sich auf zweierlei Weise erklären: die Glu-

cose-Toleranz steigt von *MK2*-Knockout über Telomerase-Knockout hin zum Doppelknockout, das heißt die Glucose wird so schnell aus dem Blut in die (hungernden) Gewebe aufgenommen, dass der Analysezeitpunkt 30 Minuten nach Injektion schon nach dem Glucosemaximum im Blut lag (erhöhte Insulinausschüttung oder Insulin-Sensitivität). Andererseits ist Glucosetransport zwar passiv, aber immer an transmembranäre Transportproteine gebunden (GLUT-1 bis GLUT-7), sodass auch eine verminderte Expression dieser Proteine im Peritoneum und damit eine verminderte Aufnahme ins Blut Ursache für die geringere Glucose-Konzentration im Testblut sein könnte. Wie sich das im Darm verhält, müsste mit einem oralen Glucose-Toleranztest (OGTT) bestimmt werden, bei dem neben der Glucoseaufnahme durch Enterozyten auch deren hormonelle Regulation durch Incretine von enteroendokrinen Zellen und Pankreas-Insulin berücksichtigt würde. Anhand der unveränderten Expression des Insulin-Rezeptors in der Leber kann aber vermutet werden, dass zumindest die einer Gewebsaufnahme der Glucose vorausgehende Insulin-Rezeptorbindung keine große Rolle spielt. Ob aber Insulin in genügendem Maße sezerniert wird, die Signaltransduktion am Insulinrezeptor funktioniert und ob die Expression der Glucosetransportproteine durch den *MK2*-Knockout beeinflusst wird, muss in zukünftigen Analysen geklärt werden. Hinweise gibt aber eine Umstellung des Futters auf Pellets, die Glucose statt Mehrfachzucker enthalten, mit dem zumindest die verminderte Verdauungsfunktion für Zucker umgangen werden kann. Die Blutzuckerwerte der Mäuse aller Genotypen waren bei dieser Diät höher als bei Normalfutter, was dafür spricht, dass auch *MK2*- und Telomerase-Knockout-Darmzellen in der Lage sind, Glucose ins Blut aufzunehmen. Da in den Knockout-Tieren der Blutzucker auch Wochen nach der Futterumstellung aber immer noch niedriger als in Wildtyptieren war, kann man davon ausgehen, dass der Glucosetransport durch das intestinale Epithel ins Blut beeinträchtigt war. Bei den Telomerase-defizienten Tieren erklärt sich das sicher durch die auf Grund der Villusatrophie extrem reduzierte Darmoberfläche und die dadurch verminderte Anzahl von Glucosetransportern, bei *MK2*-Knockout-Tieren möglicherweise durch unfunktionelle Darmepithelzellen.

4.3. Kataboler Metabolismus und Stress

Die Unterernährung der *MK2*- und Telomerase-Knockout-Mäuse beruhte wahrscheinlich nicht nur auf einer eingeschränkten Darmfunktion, sondern auch auf einer gestörten somatotropen Achse (GH/IGF-1). Das aus der Hypophyse stammende Wachstumshormon (*growth hormone*, GH) und dessen Ziel-Gen und Vermittler, der hauptsächlich in

der Leber produzierte Wachstumsfaktor IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*) sind die bestimmenden Faktoren somatischen Wachstums und der Aufrechterhaltung der strukturellen Körperzusammensetzung (siehe 1.6). Dabei beeinflusst GH auch die Expression der IGF-Bindeproteine (IGFBP) negativ, welche freies IGF inaktivieren können. Zudem besteht ein negativer Rückkopplungsmechanismus zwischen dem GH-stimulierten IGF-1 und der GH-Sekretion selbst (Gahete et al., 2009). Neben anderen Hormonsystemen zeigt auch die somatotrope Achse eine Verminderung zirkulierender Hormonkonzentrationen während der normalen Alterung (Lamberts et al., 1997). In frühzeitig alternden Telomerase-Knockout-Mäusen war die Ausschüttung des Wachstumshormons (GH) ins Blutplasma entgegen der Erwartung aber nicht vermindert. Im Gegenteil, GH war sowohl bei fehlender Telomerase als auch mit abnehmender MK2-Menge vermehrt im Blutplasma vorhanden. Dabei war das Vorkommen von IGF-1 allerdings nicht erhöht sondern in Telomerase-Knockout-Tieren sogar geringer als in Wildtypen, was für eine hepatische GH-Resistenz spricht (Lang et al., 2005; Abb. 80).

Positiv auf die GH-Sekretion wirkt auch der appetitregulierende Faktor Ghrelin, der in Abhängigkeit vom Ernährungszustand beziehungsweise der Nahrungszufuhr vor allem im Magen produziert wird (Ariyasu et al., 2008; Gahete et al., 2009). Wie GH ist auch Ghrelin im normalgewichtigen alten Menschen reduziert, wird aber bei akutem und chronischem Fastenzustand wie z.B. bei altersassoziierter Magersucht vermehrt ausgeschüttet (Morley, 2001; Ariyasu et al., 2008). Ob Ghrelin in den hungernden Telomerase- und *MK2*-Knockout-Mäusen tatsächlich zur erhöhten GH-Sekretion beiträgt, sollte in zukünftigen Analysen geklärt werden.

Direkte (IGF-1-unabhängige) Effekte von GH sind z.B. gesteigerte Lipolyse, Glykogenolyse und verminderte Gluconeogenese (Clemmons, 2007; Møller und Jørgensen, 2009). Der diesbezügliche Phänotyp der Telomerase-Knockout-Mäuse mit überwiegend katabolem Metabolismus bestehend aus vermehrt sezerniertem GH aber sogar vermindertem IGF-1 und erhöhter IGFBP-Mengen sowie verminderter Glykogen- und Fettspeicherung in der Leber ist also vielmehr ein (unter-)ernährungsbedingter Zustand als ein gesunder Alterungsphänotyp. Der *MK2*-Knockout trug teilweise noch zur Verschlimmerung der Symptome Telomerase-defizienter Tiere bei, auch weil hier durch die reduzierte Expression von PEP-CK die Gluconeogenese beeinträchtigt war (Cao et al., 2005; Abb. 80).

Beim Angebot von Einfachzucker in der Nahrung konnte die GH-Sekretion reduziert werden, die Tiere hungerten also nicht mehr (so stark). Das Körpergewicht der Tiere konnte durch die Futterumstellung zwar nur kurzfristig erhöht beziehungsweise stabili-

siert werden (Missios et al., unpublizierte Daten), das Überleben der Telomerase-Knockout-Tiere konnte dabei allerdings signifikant verlängert werden. Auf IGF-1 und IGFBP-1 hatte die Futterumstellung jedoch keinerlei Einfluss, was wiederum die Störung der somatotropen Achse beziehungsweise die GH-Resistenz unterstreicht.

Dass die Telomerase-Knockout-Tiere aber Appetit zu haben schienen und sogar übermäßig viel Nahrung aufnahmen (Missios et al., unpublizierte Daten) spricht dafür, dass das System zumindest auf der Stufe des im Magen produzierten Ghrelins und dessen Stimulation der GH-Expression funktioniert. Der Einschnitt erfolgt wahrscheinlich erst bei und/oder nach der Bindung von GH an seinen Rezeptor. Die hepatische GH-Resistenz entsteht hier vermutlich durch eine verminderte GH-Rezeptordichte (Expression, Internalisierung) und/oder eine gestörte Signaltransduktion am GH-Rezeptor, der fehlenden IGF-1-Sekretion durch Leberzellen, der Inaktivierung von IGF-1 durch Bindeproteine (IGFBP-1) und der dadurch gestörten Rückkopplungsregulation von GH (Maes et al., 1991; Tonshoff et al., 1994; Schaefer et al., 2001). Eine GH-induzierte Insulin-Resistenz, wie sie mehrfach in der Literatur beschrieben worden ist (Cartee und Bohn, 1995; Sasaki-Suzuki et al., 2009), konnte in Telomerase-Knockout-Tieren nicht beobachtet werden (Missios et al., unpublizierte Daten), was ebenfalls für eine gestörte GH-Rezeptorsignaltransduktion spricht.

Nach DNS-Schädigung wird p53 aktiviert, akkumuliert und induziert p21-abhängigen Zellzyklusarrest, wie das in hochproliferativen Geweben wie dem Darm der Telomer-dysfunktionellen Maus gezeigt wurde. P53 wird aber auch von anderen Zellstresssituationen wie Nahrungsmangel aktiviert, greift daraufhin negativ-regulierend an mehreren Stellen in das IGF-1/AKT/mTOR-Signalnetzwerk ein und verhindert somit dessen anabole Wirkung (Abb. 79; Feng et al., 2005; Feng und Levine, 2010; Jones et al., 2005; Buchakjian und Kornbluth, 2010). Zudem resultiert die p53-Aktivierung in der verstärkten Internalisierung von Wachstumsfaktorrezeptoren (Yu et al., 2009), was die betroffenen Zellen weniger sensitiv für Wachstums- und Teilungssignale macht und im Fall von GH zur Hemmung der IGF-1-Ausschüttung durch Hepatozyten führen würde. Eine ähnliche, wobei im Ausmaß noch stärkere Beeinträchtigung der somatotropen Achse wurde auch im DNS-Reparaturmechanismus-defekten, frühzeitig alternden XPF-ERCC1-defizienten Mausmodell beschrieben (Niedernhofer et al., 2006). Alles in allem unterstützt die Aktivierung von p53 die bei Nahrungsmangel eintretende Verschiebung der Energieinvestition in Zellwachstum und -teilung hin zur Substanzerhaltung und ist daher nicht mit lebensverlängernder eingeschränkter Kalorienzufuhr zu vergleichen.

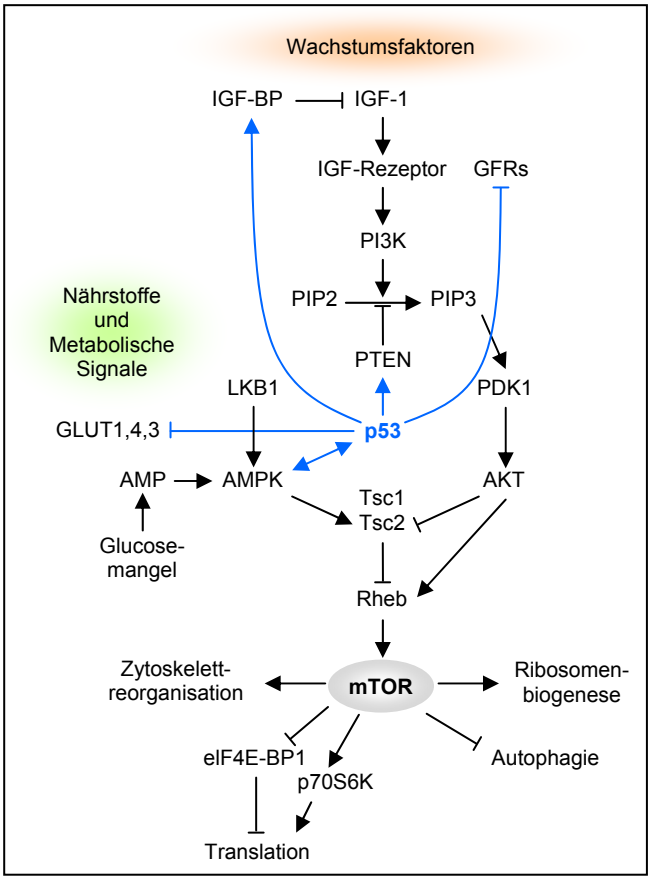

Abb. 79. Signaltransduktionsnetzwerk um die mTOR-Aktivierung (nach Feng et al., 2005 und Feng und Levine, 2010). IGF-BP, *insulin-like growth factor*-Bindeprotein; GFRs, *growth factor*-Rezeptoren; PI3K, Phosphatidylinositol-3-Kinase; PIP2/3, Phosphatidylinositol-4,5-bis-/trisphosphat; PTEN, Phosphatase- und Tensinhomolog; PDK, Phosphatidylinositol-abhängige Kinase; GLUT, Glucosetransporter; AKT=PKB, Proteinkinase B; AMPK, Adenosinmonophosphat-aktivierte Kinase; Tsc, *Tuberous Sclerosis Complex*; mTOR, *mammalian target of rapamycin*; Rheb, *Ras homolog enriched in brain*; eIF4E-BP, eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 4E-Bindeprotein; p70S6K, p70-Kinase des ribosomalen S6-Proteins.

Das Ausschalten von MK2 führte in epithelialen Darmkryptenzellen zwar zur Reduktion der p53- und p21-Signale im Telomerase-Knockout-Hintergrund, konnte jedoch dadurch eine hepatische GH-Resistenz nicht verhindern. Gründe, aus denen der *MK2*-Knockout zu einer weiteren Steigerung der GH-Werte führte, könnten verminderte Gluconeogenese (PEP-CK; Liu und Cao, 2009) und eine überaktive muskuläre Glykogensynthase sein (Stokoe et al., 1992; Kuma et al., 2004; Abb. 80). Die niedrigeren Blutzuckerspiegel und das geringere Körpergewicht lassen eine Interpretation in diese Richtung zu. Telomerase-profiziente MK2-defiziente Mäuse hatten zwar ebenso reduzierte Blutzuckerspiegel und ein geringeres Körpergewicht, Gluconeogenesefehler und vermehrte Glykogenspeicherung hatten aber hier (innerhalb der beobachteten Lebensspanne) keine gravierenden Folgen, da diese Tiere ernährungsphysiologisch fit waren.

Was neben genotoxischem Stress (p53) und Mangelernährung (GH-Rezeptordichte) bei der hepatischen GH-Resistenz und dem katabolen Metabolismus in Telomerase-defizienten Tieren außerdem eine Rolle spielen könnte, ist der Einfluss pro-inflammatorischer Zytokine (O'Connor et al., 2008). So war die systemische Konzentration von Interleukin (IL-) 6, einem Zytokin mit vielfältigen Wirkungen vor allem in der Entzündungsregulation und Immunantwort, in Telomerase-Knockout-Mäusen auf das Siebenfache

des Kontrollwertes erhöht. Bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa, die mit Telomerverkürzung assoziiert sind und damit dem Darmphänotypen der Telomerase-Knockout-Tiere ähneln (Herrera et al., 1999), tritt eine erworbene GH-Resistenz auf, die in einem IL-6-induzierten post-GH-Rezeptordefekt ihre Ursache haben könnte (Schaefer et al., 2001; DePascalis et al., 2006). Zu den Eigenschaften von IL-6 gehören außerdem Insulin-antagonistische Wirkungen wie die Reduktion der hepatischen Glykogensynthese und die Förderung der Lipolyse im Fettgewebe (Hoene und Weigert, 2008), was auch in Telomerase-Knockout-Tieren bestätigt werden konnte. Obwohl das Ausschalten von MK2 im Telomerase-Knockout-Hintergrund die IL-6-Menge im Blutplasma auf die Hälfte reduzieren konnte, war im Hinblick auf hepatische GH-Resistenz, Lipolyse und Leber-Glykogen keine Verbesserung zu erkennen. Die hier im Vergleich zu Wildtypen noch immer doppelt so hohe IL-6-Konzentration war offensichtlich ausreichend, um den katabolen Metabolismus zu fördern.

4.4. Zytokine, Hämatopoese und Immunfunktion

IL-6 wird von vielen verschiedenen Zelltypen sezerniert, vom Endothel und Knochenmarksstroma über Myo- und Adipozyten bis hin zu Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen an Entzündungsorten. In der akuten Entzündungsreaktion reguliert es die Bildung der Akutphasenproteine in Hepatozyten und die Rekrutierung von Neutrophilen und Monozyten/Makrophagen zum Entzündungsort (Gabay, 2006; Cray et al., 2009). Zusammen mit den Kolonie-stimulierenden Faktoren (CSFs, siehe 1.5) reguliert IL-6 auch die Differenzierung und Proliferation myeloider hämatopoetischer Zellen (Lotem und Sachs, 2002; Matsuda und Hirano, 2000). Neben IL-6 war auch G-CSF im Telomerase-Knockout-Plasma erhöht, weshalb die große Zahl Granulozyten im Knochenmark, in der Milz und im Blut Telomerase-defizienter Tiere nicht überraschte. Zudem induzieren G-CSF und IL-6 (neben M-CSF) auch die Differenzierung von knochenabsorbierenden Osteoklasten aus Monozyten (Bost et al., 2000), womit neben der Osteoblastenseneszenz die brüchigen Knochen der Telomerase-Knockout-Mäuse zu erklären wären (Valdes et al., 2007; Pignolo et al., 2008; Boskey und Coleman, 2010). Das dazu auftretende blasse Knochenmark und die verringerte Erythrozytenzahl im Blut bestätigen die Feststellung, dass IL-6-Überproduktion auch für die Entstehung der sogenannten chronischen Entzündungsanämie (*anemia of chronic disease*, ACD) verantwortlich ist (Nishimoto, 2010).

Der p38/MK2-Stresskinasesignalweg wird durch verschiedene Formen von zellulärem Stress aktiviert und reguliert Zellproliferation, Apoptose und Entzündungsantworten. Zu

den aktivierenden Faktoren gehören neben UV-Strahlung, LPS und Wachstumsfaktoren auch die hämatopoetischen Zytokine IL-3 und G-CSF (Rausch und Marshall, 1999). Eine Beteiligung von MK2 wurde bei der Biosynthese von TNFα und IL-6 beschrieben (Winzen et al., 1999; Neininger et al., 2002; Campbell et al., 2004; Hitti et al., 2006; Gaestel et al., 2009). P38/MK2-Signale sind zudem an der Induktion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 beteiligt (Ma et al., 2001; Reiling et al., 2001; Kim et al., 2008; Tudor et al., 2009). Eine Phosphorylierung von p38 ging auch der Sekretion von TNFα und G-CSF in Lektin-stimulierten Mausmakrophagen voraus (Yamanishi et al., 2007). Deshalb war eine weitere Überlegung bei der Generierung der Telomerase- und *MK2*-Doppelknockout-Maus, dass die systemische Entzündung der Telomerase-Knockout-Tiere, erkennbar am veränderten Zytokinmilieu und vermehrt auftretenden Zellen der angeborenen Immunabwehr, durch p38/MK2-Signale vermittelt wird und ein Ausschalten dieser Kinasekaskade auf der Stufe von MK2 zu einer Verbesserung dieses Phänotyps führen könnte.

Die im Vergleich zu Wildtypmäusen stark erhöhten Mengen sowohl von IL-6 als auch von G-CSF waren im Blutplasma der Telomerase-Knockout-Mäuse tatsächlich um die Hälfte reduziert, wenn *MK2* ausgeschaltet wurde (Abb. 80). Die zelluläre Zusammensetzung von Knochenmark, Blut und Milz änderte sich jedoch bei gleichzeitigem Ausschalten von Telomerase und MAPKAP-Kinase 2 kaum, sodass diese Organe auch hier durch Granulozytose und Lymphopenie gekennzeichnet waren.

Da beide Zytokine zur Differenzierung und Proliferation hämatopoetischer Zellen beitragen, wurde zudem der Zellzyklus hämatopoetischer Zellen des Knochenmarks und der Milz untersucht. Telomerase-defizientes Knochenmark zeigte einen sehr hohen Anteil von Zellen in der Ruhephase des Zellzyklus (G0), was zwar in Anbetracht der erhöhten Zytokinwerte überraschte, aber im Hinblick auf verkürzte Telomere und damit zusammenhängendem Zyklusarrest auch im hämatopoetischen System zu erklären wäre (Rufer et al., 1999; Allsopp und Weissman, 2002; Aviv, 2009). Im Knochenmark MK2-defizienter Tiere befanden sich ebenfalls mehr Zellen in der G0-Phase im Vergleich zum Wildtypknochenmark, was eventuell mit der bereits im Darmepithel beschriebenen genetischen Instabilität auch im *MK2*-Knockout-Hintergrund zusammenhängt. Konform mit den Ergebnissen im Darm, änderte der *MK2*-Knockout am Anteil der G0-Zellen im Telomerase-defizienten Hintergrund nichts. Die Hauptzellpopulation des kaum proliferierenden Telomerase-Knockout-Knochenmarks waren etwa 85% myeloide Zellen (Granulozyten und Monozyten) im Gegensatz zu nur etwa 65% myeloiden Zellen im proliferativ aktiveren Wildtyp-Knochenmark. Der Überschuss an IL-6 und G-CSF in Telomerase-defi-

zienten Tieren hatte (zu diesem späten Analysezeitpunkt) offensichtlich keinen proliferationsstimulierenden, aber einen in die Granulozytenlinie differenzierenden Einfluss auf das Knochenmark, der auch noch bei halbierten Zytokinwerten in *MK2*-Knockout-Mäusen wirkte, da die Knochenmarkszusammensetzung hier nahezu unverändert war.
Die herrschende Meinung über adulte Gewebsstammzellen wie die hämatopoetischen (HSCs) ist, dass sie sich nur selten teilen und meist ruhen (Wilson und Trumpp, 2006). Auf Grund der schlechten Repopulationsfähigkeit transplantierten Knochenmarks Telomerase-defizienter Tiere und der hier verminderten Zahl hämatopoetischer Stammzellen bei vermehrt auftretenden Vorläuferzellen, ist unsere Theorie, dass HSCs in frühzeitig alternden Telomerase-Knockout-Mäusen vermehrt proliferieren und dadurch das sonst lebenslang ausreichende Stammzellreservoir schneller aufgezehrt wird. Die Folgen sind, dass die auch in der normalen Alterung auftretende Verschiebung zu vermehrt vorkommenden myeloid-geprägten HSCs in Telomerase-Knockout-Mäusen eher eintritt und die Ursache für das gehäufte Auftreten der Granulozyten ist (Muller-Sieburg et al., 2004; Sharpless und DePinho, 2007; Warren und Rossi, 2009; Kawamoto et al., 2010; Rudolph et al., 2010). Da hier nur der Zellzyklus in unfraktioniertem Knochenmark analysiert wurde, kann diese Hypothese nur in zukünftigen Studien eindeutig bestätigt werden. Neben den oben dargestellten Anzeichen sprechen jedoch auch die für IL-6 beschriebene Zellzyklus-aktivierende Wirkung in ruhenden Vorläuferzellen (Matsuda und Hirano, 2000) und die Frequenzsteigerung der verschiedenen aufeinander folgenden Differenzierungsstufen dafür (siehe 1.5).
Der *MK2*-Knockout im Telomerase-defizienten Hintergrund hatte trotz halbierter Zytokinmengen für IL-6 und G-CSF keinen positiven Einfluss auf die niedrige Frequenz der Stammzellen. Multipotente und myeloide Vorläuferzellen (MPP, GMP) waren jedoch in ihrer Frequenz sowohl im Wildtyp- als auch im Telomerase-defizienten Hintergrund bei Fehlen von MK2 etwas geringer als in den Vergleichstieren. Dass sich dieser, wenn auch geringe Effekt von MK2 nicht in der Frequenz differenzierter Zellen widerspiegelt, könnte daran liegen, dass vor allem die Granulozyten entweder an einem anderen Ort produziert worden und gereift sind und als teilungsinaktive Effektorzellen ins Knochenmark eingewandert sind, oder an der Akkumulation von Knochenmarksgranulozyten, da G-CSF anti-apoptotisch auf reife Granulozyten wirkt (Hoffbrand et al., 2006).
Im Gegensatz zum Knochenmark zeigten Telomerase-defiziente Zellen in der Milz eine übermäßig starke Proliferation (25% mehr als Wildtypzellen), die durch den *MK2*-Knockout vermindert wurde. Anders als das Knochenmark, wo die Produktion der Blutzellen aus hämatopoetischen Stammzellen stattfindet, sind die Hauptaufgaben der Milz

die Makrophagen-vermittelte Erkennung und Entsorgung von im Blut zirkulierenden alten und kaputten Zellen (Erythrozyten, Thrombozyten, apoptotische Zellen) ebenso wie von Mikroorganismen, und außerdem die Aktivierung und Proliferation von B- und T-Zellen (Brendolan et al., 2007). Die Hauptzellpopulationen der Telomerase-Knockout-Milz waren die im Vergleich zum Wildtyp vermehrt vorkommenden, also hier stark proliferierenden, etwa 20% Granulozyten und etwa 16% Erythroblasten, und die im Vergleich zum Wildtyp vermindert auftretenden etwa 20% B-Zellen und nur etwa 15% T-Zellen. Trotz B-Zell-Entwicklungsblock im Knochenmark hatten Telomerase-defiziente Tiere in der Milz mehr B-Zellen als vermutet, was auf deren starke Proliferation in diesem Organ hindeutet. Zudem ist in diesen Tieren die Expression des für die Migration und „Residenz" von B-Zellen unter anderem in splenischen Follikeln wichtigen Chemokins CXCL-13 (BLC) erhöht. Die verminderten entzündungssignalisierenden IL-6-Level, G-CSF- und BLC-Mengen in Doppelknockout-Tieren gingen einher mit einer zehnprozentigen Reduktion der Milzzellproliferation und auch der B-Zellfrequenz bei steigender T-Zellfrequenz. Der Anteil der Granulozyten in der Milz war wie im Knochenmark bei Fehlen von MK2 fast unverändert.

Zu bedenken ist hier, dass G-CSF neben seinem proliferationsstimulierenden und differenzierenden Einfluss im Knochenmark auch zum vermehrten Auswandern der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ins Blut und damit auch in die Milz führt (Petit et al., 2002; Gertz, 2010). Dieser Vorgang wird in der Transplantationsmedizin zur Mobilisierung der Spenderknochenmarkszellen ins Blut angewandt und ist mit einer auch in Telomerase-Knockout-Tieren zu beobachtenden Splenomegalie assoziiert (Platzbecker et al., 2001; Picardi et al., 2003; Stroncek et al., 2003). Anhand der in Telomerase-Knockout-Tieren gemessenen erhöhten Vorläuferzellzahlen in Blut und Milz und der extrem vergrößerten Milz dieser Tiere bei nur moderat erhöhten Leukozytenzahlen im Blut, muss man hier extramedulläre Hämatopoese zur normalen Milzfunktion hinzuzählen (Christensen et al., 2004; Kiel et al., 2005; Cumano und Godin, 2007; Wilson und Trumpp, 2006). Extramedulläre Hämatopoese (EMH) kann in diversen hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Organen stattfinden und ist oft das Ergebnis einer gestörten Knochenmarksumgebung (O'Malley et al., 2005; O'Malley, 2007), die z.B. auch in der chronisch myeloischen Leukämie (CML) auftritt (Heaney und Holyoake, 2007). Neben entzündungsverursachter Infiltration wären weitere Erklärungen der hohen Granulozyten- und Erythroblastenzahlen in der Milz auch entzündungsbedingt benötigte oder leukämische EMH. Die verminderte G-CSF-Menge im Blutplasma der Doppelknockout-Tiere wurde

von einer Reduktion der Stammzellmobilisierung ins Blut begleitet. Obwohl in der Milz der Doppelknockout-Tiere trotz Mobilisierungsverminderung (zu diesem Analysezeitpunkt) prozentual ähnlich viele Stammzellen nachweisbar waren wie in Telomerase-defizienten Tieren mit MK2-Expression, entstanden aus jenen weniger multipotente Progenitorzellen beziehungsweise differenzierten diese schnell in die myeloide Richtung. Trotz verbesserter Werte für die in Telomerase-defizienten Mäusen extrem deregulierten Faktoren IL-6 und G-CSF, beeinflusste der *MK2*-Knockout also weder im Knochenmark noch in der Milz die myeloide Verschiebung der Hämatopoese. Der Einfluss, den MK2 auf die Hämatopoese hat, scheint größtenteils in der Reduktion der Proliferation (fast) aller hämatopoetischen Zellen zu liegen. So waren die Kochenmarks- und Milzzellsubpopulationen zwar teilweise kleinen Frequenzänderungen unterworfen, am Auffälligsten war jedoch die Reduktion deren absoluter Anzahl.

Neben der (stamm-)zellintrinsischen Regulation der Chromatinumgestaltung durch MK2 (Schwermann et al., 2009), der schon im Darm beschriebenen Regulation von DNS-Schädigungssignalen und Zellzyklusarrest durch MK2 (siehe 4.1) und gestörter Immunzellapoptose (Kontoyiannis et al., 1999; Kontoyiannis et al., 2002), könnte das Fehlen von MK2 auch die Entfernung geschädigter Stromazellen in Knochenmark und Milz verhindern. Dadurch könnte MK2-Defizienz veränderten oder fehlenden Signalen seitens der Stromazellen Raum geben (*microenvironment*) und so die Hämatopoese negativ beeinflussen (Ju et al., 2007). Deshalb sollte zukünftig getestet werden, ob MK2 auch die lokale Sekretion/Membranpräsentation von Faktoren wie SCF, Tie-2, Flt3-Ligand oder Thrombopoietin beeinflusst, die zum Überleben und zur normalen Proliferation der hämatopoetischen Stammzellen notwendig sind (Zhu und Emerson, 2002; Thomas et al., 2004).

Neben G-CSF und IL-6 wurden noch zwei MK2-abhängige Faktoren gefunden: Wachstumshormon (GH) und Interleukin (IL-)10 (Abb. 80). GH war bei verringerter MK2-Expression vermehrt im Blutplasma der Mäuse vorhanden, wird also (direkt oder indirekt) negativ von MK2 beeinflusst. Neben seiner Funktion in der somatotropen Achse stimuliert GH auch die Hämatopoese allgemein und wie G-CSF speziell die Granulopoese. GH unterstützt außerdem die T-Zellentwicklung im Thymus sowie die Proliferation und Funktion von peripheren T-Zellen (Chappel und Murphy, 2000), was die leicht erhöhten T-Zell-Frequenzen in MK2-defizienten Mäusen erklären würde. Die Konzentration des anti-inflammatorisch wirkenden IL-10 (Brown et al., 1996; de Waal Malefyt, 2000) war in Doppelknockout-Tieren noch niedriger als schon in Telomerase-defizienten Tieren.

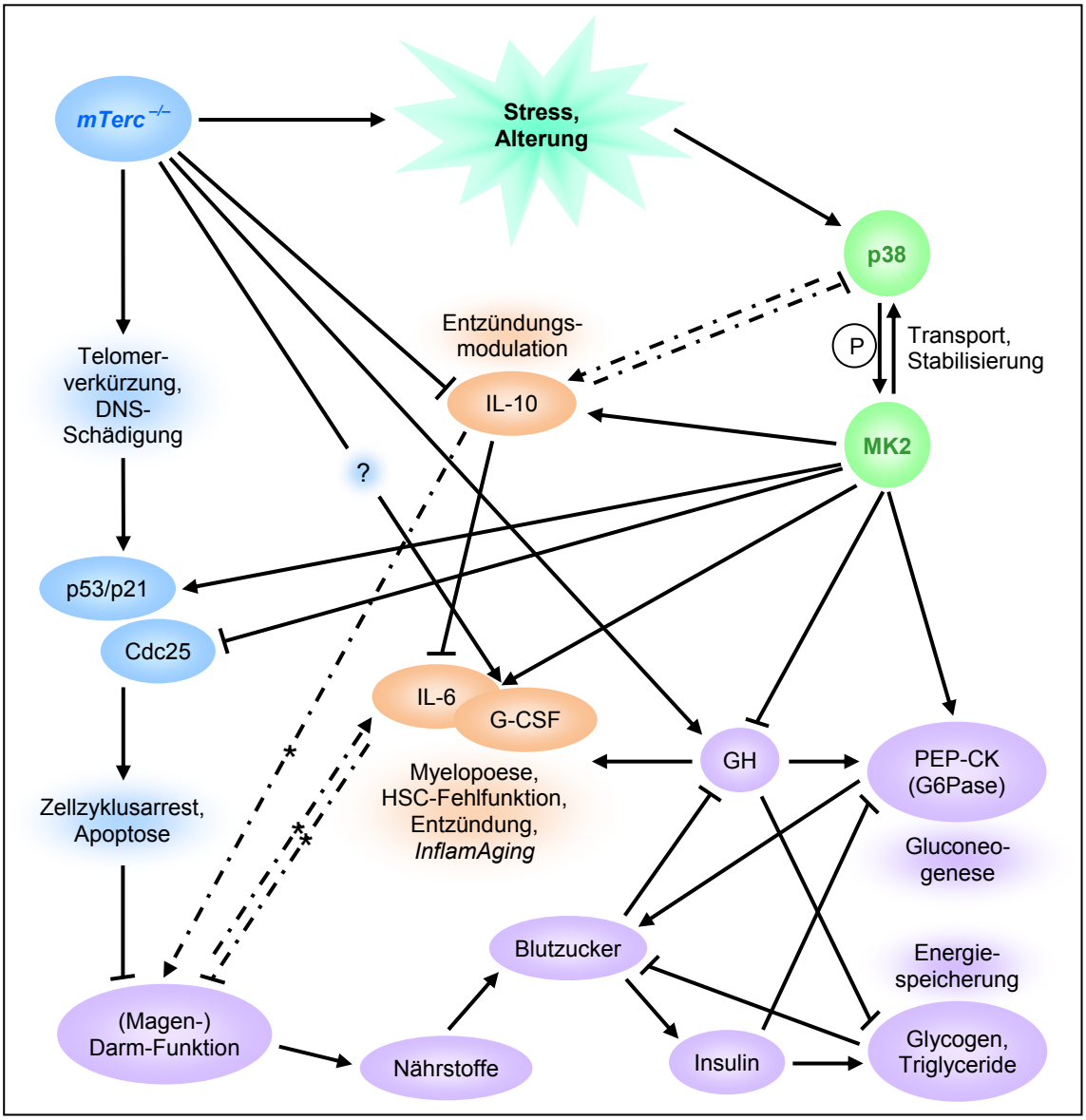

Abb. 80. Auswirkungen des Telomerase- und *MK2*-Knockouts in Mäusen. Telomerase-Defizienz in der dritten (und aller darauf folgenden) Generation(en) führt in Mäusen auf zellulärer Ebene zu DNS-Schädigung, Zellzyklusarrest und Apoptose. Der Organismus leidet unter genotoxischem, metabolischem und inflammatorischem Stress und altert frühzeitig. Die sog. Stresskinase- oder p38/MK2-Signalkaskade wird durch Stresssituationen wie bei (UV-)DNS-Schädigung und entzündungsassoziierter Ausschüttung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren aktiviert. MAPKAP-Kinase 2-Aktivierung führt zu Zellzyklusarrest und Apoptose durch Stabilisierung von p53 (und p21) und Inhibition von Cdc25-Phosphatasen. Die in Telomerase-defizienten Mäusen erhöhte Ausschüttung der Faktoren G-CSF (Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor) und IL (Interleukin)-6 wird teils durch die p38/MK2-Signalkaskade vermittelt. Das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 wird sowohl von Telomerase- als auch von MK2-Defizienz unterdrückt. Das Ausschalten sowohl der Telomerase als auch von MK2 führt in Mäusen zu niedrigen Blutzuckerspiegeln. Die in Telomerase-defizienten Mäusen durch Mangelernährung auftretende Wachstumshormonüberproduktion (*growth hormone*, GH) ist bei Fehlen von MK2 wahrscheinlich durch eine gestörte Gluconeogenese (PEP-CK, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase; G6Pase, Glucose-6-Phosphatase) noch verstärkt. – · –, laut Literaturangaben; *, bei Entzündung.

Ein Zusammenhang zwischen der Produktion von IL-10 und den p38-aktivierten Kinasen MSK1 und MSK2 ist beschrieben worden (Ma et al., 2001), ebenso wie ein Rückkopplungsmechanismus, in dem IL-10 durch die Regulation von p38 die TNFα-Produktion hemmt (Kontoyiannis et al., 2001). Bezieht man diese zwei Faktoren, GH und IL-10, mit in die Betrachtung ein, erstaunt es nicht, dass die teils entzündungsverursachte und teils schon auf Stammzellebene zur Myelopoese verschobene Hämatopoese in gealterten Telomerase-defizienten Tieren auch durch Halbierung der IL-6- und G-CSF-Produktion beim Ausschalten von MK2 nicht normalisiert wurde.

Beide, IL-10-defiziente Mäuse sehr früh im Leben und Telomerase-Knockout-Mäuse erst während der Alterung, entwickeln eine der menschlichen IBD (*inflammatory bowel disease*) ähnliche chronische Enterocolitis mit Begleitsymptomen wie Gewichtsverlust, hohen Leukozytenzahlen, Splenomegalie und Anämie (Rennick et al., 1997; Herrera et al., 1999; Rudolph et al., 1999; Sturlan et al., 2001; Begus-Nahrmann et al., 2009). Obwohl das Fehlen von MK2 in *Toll-like*-Rezeptor-vermittelten (Haut-)Entzündungen über die Reduktion der entzündungsvermittelnden TNFα-Reaktion anti-inflammatorische Eigenschaften zeigt, wirkt MK2-Defizienz in T-Zellrezeptor-vermittelten (Haut-)Entzündungen jedoch mit lokalem Zytokinanstieg und erhöhten Granulozytenzahlen pro-inflammatorisch (Schottelius et al., 2010; Fyhrquist et al., 2010). Das Fehlen von MK2 ist auch mit der Verschlechterung der TNFα-vermittelten intestinalen Pathologie in TNFα-überproduzierenden $Tnf^{\Delta ARE}$-Mäusen beschrieben worden. Diese Tiere entwickeln parallel zur Darmentzündung Splenomegalie mit vergrößerten Anteilen myeloider und T-Zellen, wobei der Einfluss von MK2 auf das Ausmaß der Entzündung hier nicht unbedingt in der Modulation der Zytokinexpression, sondern wahrscheinlich in der bei Fehlen von MK2 verminderten Apoptose der Immunzellinfiltrate im Darm bestand (Kontoyiannis et al., 1999; Kontoyiannis et al., 2002).

4.5. Zusammenfassung und Ausblick

Der hier untersuchte, durch Telomerverkürzung, DNS-Schädigung, Zellzyklusarrest und Apoptose geschädigte Darm erfuhr auch durch das Ausschalten der MK2-Stresskinase-signale weder Verbesserung noch Verschlimmerung der Symptome. Die DNS-Schädigungssignale p53 und p21, das pro-inflammatorische Zytokin IL-6 und der myelopoetische Wachstumsfaktor G-CSF waren in Doppelknockout-Tieren zwar reduziert, die Expression des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 wurde allerdings nicht wiederhergestellt. Obwohl das Fehlen von MK2 die myeloide Verschiebung der Hämatopoese

in Telomerase-Knockout-Mäusen nicht verhinderte, waren die (entzündungsvermittelnden) Immunzelltypen dank Hyposplenie und dadurch verminderter extramedullärer splenischer Hämatopoese im Doppelknockout in der Anzahl pro Tier stark reduziert. Auf Morphologie und Funktion des Darms hatte das allerdings keinen substanzerhaltenden Einfluss, sodass statt Zerstörung des Darmepithels durch Immunzellen wahrscheinlich DNS-schädigungsinduzierter Zellzyklusarrest und Apoptose für Krypten- und Villusatrophie in Telomerase-Knockout-Mäusen verantwortlich sind, welche trotz verminderter p53/p21-Signale bei MK2-Defizienz nicht verhindert werden konnten.
Das Fehlen von MK2 hatte zwar auf die Darmstruktur keinen Einfluss, die durch Darmfehlfunktion in Telomerase-defizienten Tieren entstehende Unterernährung und daraufhin ausgelöste Verschiebung zum katabolen Metabolismus wurde durch Ausschalten von MK2 allerdings noch verstärkt. So hatten Doppelknockout-Tiere bei verringerter Gluconeogenese aber vermehrter Glykogenspeicherung im Muskel weiter erhöhte Wachstumshormonkonzentrationen und geringere Körpergewichte als Telomerase-defiziente Tiere. Obwohl Doppelknockout-Tiere stärker hungerten, war ihre Lebensspanne dadurch nicht kürzer als die der Telomerase-defizienten Tiere.
Ob nun die auch bei der „gesunden“ Alterung zu beobachtende Verschiebung zur Myeloproliferation durch eine altersbedingte Veränderung des Stammzellpools hervorgerufen wird und eine dementsprechend veränderte Zytokinproduktion zur Folge hat, oder ob die myeloide Verschiebung die Folge des altersbedingt veränderten Zytokinmilieus ist, lässt sich auch mittels dieses Mausmodells aus telomerverkürzungsbedingter Alterung und MK2-Defizienz nicht feststellen. Da das Fehlen von MK2 die Ausschüttung von IL-6 und G-CSF nur auf die Hälfte der Werte in Telomerase-Knockout-Mäusen reduzierte und nichts an der myeloiden Verschiebung änderte, gibt es offensichtlich noch andere Signalwege, die nach DNS-Schädigung und/oder Alterung zur Induktion dieser Faktoren führen. Ob komplettes Fehlen von G-CSF in Telomerase-defizienten Tieren die Myeloproliferation verhindert, kann aber vielleicht ein bereits in der Generierung befindliches Mausmodell beantworten, in dem Telomerase-defiziente Tiere mit G-CSF-Knockout-Mäusen gekreuzt werden.
Der Zeitpunkt für die Beurteilung hämatopoetischer Schäden könnte trotz fortgeschrittenen Alters der untersuchten Tiere noch immer zu früh sein. Zu früh, weil die Telomere hämatopoetischer Zellen dank vielschichtiger Hierarchie (siehe 1.5) und seltenerer Teilungen länger sind als im Darmepithel mit vergleichsweise einfachem Aufbau, bei dem die Darmstammzelle alle Darmepithelzellen hervorbringt. Wenn Telomerase-

defiziente Tiere länger lebten beziehungsweise nicht an Darmversagen und Nährstoffmangel sterben würden, bestünde die Möglichkeit, dass sie (myeloide) Leukämie entwickelten bzw. die chronisch myeloische Leukämie fortschreiten würde, für deren chronische Phase die Anzeichen einer entzündungsbedingten Leukozytose sehr ähnlich und bereits in den untersuchten Tieren vorhanden waren. Das Fehlen von MK2 könnte die Telomerase-defizienten Tiere durch Proliferationsminderung im hämatopoetischen System davor schützen. Allerdings würde die bei Fehlen von MK2 im Telomerase-defizienten Hintergrund auftretende weitere Verminderung von B-Zellen, Milzmakrophagen und Dendritischen Zellen die bereits bei Vorhandensein von MK2 in Telomerase-Knockout-Tieren verminderte Immunfunktion weiter schwächen.

Zumindest im Alterungsmodell der Telomerase-defizienten Maus, welches mit Telomerverkürzung der menschlichen Alterung ähnelt, führte die Unterbrechung der Stresskinasesignale durch Ausschalten von MK2 nicht zur Verminderung alterungsbegleitend auftretender Symptome oder gar zur Lebenszeitverlängerung. Im Gegenteil, durch den Einfluss von MK2 auf den Glucose- und Lipidmetabolismus hungerten Doppelknockout-Tiere sogar mehr. Da bei der „gesunden“ menschlichen Alterung Darmunterfunktion und Mangelernährung keine so große Rolle wie in Telomerase-defizienten Mäusen spielen, ist der diesbezüglich in der Maus beobachtete negative Einfluss der MK2-Defizienz im Menschen wahrscheinlich zu vernachlässigen. Beim Einsatz von MK2-Inhibitoren zur Linderung der „Entzündungsalterung“ oder von entzündlichen Krankheiten, die im Menschen teilweise auch mit Telomerverkürzung assoziiert sind, darf nicht übersehen werden, dass neben pro-inflammatorischen Faktoren wie IL-6 und TNFα auch das anti-inflammatorische IL-10 nicht nur durch Hemmung von p38, sondern auch bei Ausschalten von MK2 reduziert wird. Wie bei Hautentzündungen schon beschrieben, ist der Behandlungserfolg mit MK2-Inhibitoren von dem der Erkrankung zugrundeliegendem Mechanismus abhängig. Obwohl die mit Telomerverkürzung assoziierten Krankheitssymptome in Mäusen eine entzündliche und damit eventuell auf MK2-Defizienz ansprechende Komponente haben, konnten sie durch die Unterbrechung der p38/MK2-Stresskinasesignale nicht gemildert werden. Zur gezielten Behandlung der „Entzündungsalterung“ sind die hierbei deregulierten Faktoren wie IL-6 und G-CSF bzw. deren Auswirkungen wahrscheinlich bessere Angriffsziele als MK2.

5. Anhang

Tabelle 2. In Methylenblau-gefärbten *Whole Mount*-Präparaten gezählte basale Krypten des Dickdarms (Kolonkrypten) pro Sichtfeld (Abb. 23 G); mittels Immunfluoreszenzfärbung detektierte p53- und p21-positive Zellen pro Dünndarmkrypte (Abb. 25); Anaphasenbrücken in Kryptenzellen des Dünndarms als prozentualer Anteil an allen gefundenen Anaphasen (Abb. 26). Alle Werte sind Mittelwert ± Standardfehler.

	***mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/+}$**	***mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/-}$**	***mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{-/-}$**	**G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/+}$**	**G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/-}$**	**G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{-/-}$**
Kolon-krypten	1652±92	1660±171	1706±97	418±46	381±34	386±63
p53+ Zellen	0,14±0,13	0,25±0,24	0,01±0,01	4,57±0,85	4,03±0,69	3,19±0,52
p21+ Zellen	0,0	0,0	0,0	4,88±0,60	3,37±0,94	3,31±0,65
Anaphase-brücken	0,36±0,36	1,17±0,39	2,39±0,46	4,89±0,42	4,58±0,75	4,58±0,50

Tabelle 3. Blutzuckerspiegel [mg/dl] von Mäusen auf Normalfutter (NF) oder Glucose-reichem Futter (GF) postprandial (pp) oder in der Ruhephase (r, Abb. 27 & 32); Blutzuckerspiegel [mg/dl] von Mäusen nach Über-Nacht-Fasten beim Glucose-Toleranztest (GT) in Minuten (') nach der Glucose-Injektion (Abb. 28). Alle Werte sind Mittelwert ± Standardfehler.

	***mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/+}$**	***mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/-}$**	***mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{-/-}$**	**G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/+}$**	**G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/-}$**	**G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{-/-}$**
NF pp	276,5±7,6	267,8±43,0	235,7±14,1	191,7±18,8	186,3±20,3	175,6±9,8
GF pp	372,7±26,1	349,0±49,0	290,2±22,1	279,6±27,5	253,8±36,3	245,0±15,6
NF r	122,4±10,6	112,6±6,2	113,1±8,2	99,2±6,6	97,8±6,4	93,0±7,9
GT 0'	75,9±8,6	n.b.	73,0±15,1	90,5±5,6	n.b.	75,3±8,5
GT 30'	335,8±31,8	n.b.	305,0±25,5	262,3±27,5	n.b.	165,5±12,2
GT 60'	227,8±25,4	n.b.	202,8±35,3	168,4±18,1	n.b.	132,3±16,6
GT 90'	163,5±20,2	n.b.	160,3±29,8	134,4±10,7	n.b.	121,8±6,9

Tabelle 4. Glykogenkonzentration [µg/mg] in der Leber (L) und im Muskel (M) auf Normalfutter (NF) und Glucose-reichem Futter (GF, Abb. 29 & 33). Bestimmung der Glykogenkonzentration bei GF-Lebern mit anderem Standard, deshalb insgesamt niedriger. Alle Werte sind Mittelwert ± Standardfehler; n.b., nicht bestimmt.

	***mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/+}$**	***mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/-}$**	***mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{-/-}$**	**G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/+}$**	**G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/-}$**	**G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{-/-}$**
L-NF	68,1±8,8	n.b.	70,7±6,7	47,1±12,5	n.b.	48,7±8,7
L-GF	51,8±14,7	n.b.	44,9±11,4	26,7±10,2	n.b.	23,9±13,1
M-NF	107,6±10,4	n.b.	156,3±12,3	88,3±18,5	n.b.	109,9±21,4

Tabelle 5. Wachstumshormon- (GH) und IGF-1-Konzentration [ng/ml] im Blutplasma von Mäusen auf Normalfutter (NF) und Glucose-reichem Futter (GF, Abb. 36 & 37). Alle Werte sind Mittelwert ± Standardfehler; n.b., nicht bestimmt.

	***mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/+}$**	***mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/-}$**	***mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{-/-}$**	**G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/+}$**	**G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/-}$**	**G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{-/-}$**
GH NF	4,33±1,52	10,84±4,17	16,44±6,18	43,64±7,83	49,68±16,38	58,32±13,26
GH GF	6,86±4,63	4,19±4,19	5,56±4,59	16,99±5,23	16,06±8,83	11,69±5,56
IGF-1 NF	509,6±46,6	407,2±26,6	474,5±75,9	355,8±17,5	328,4±20,1	392,7±15,6
IGF-1 GF	432,7±28,0	n.b.	455,7±40,3	375,3±14,9	312,4±46,0	340,1±7,6

Tabelle 6. Zellzahl $\bullet 10^6$ nach Erythrozytenlyse in Milz und Knochenmark bestimmt mittels Vi-CELL-*Analyzer*. Absolute Zellzahl pro Tier (†, Abb. 40) und pro Gramm Körpergewicht (‡, Abb. 41). Alle Werte sind Mittelwert ± Standardfehler.

		***mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/+}$**	***mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/-}$**	***mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{-/-}$**	**G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/+}$**	**G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/-}$**	**G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{-/-}$**
Milz		134±13 †	111±11 †	86±15 †	198±23 †	109±14 †	93±12 †
		3,85±0,33 ‡	3,41±0,46 ‡	2,98±0,52 ‡	7,87±0,84 ‡	5,30±0,97 ‡	4,28±0,48 ‡
Knochen-mark		87±5 †	80±7 †	79±5 †	108±6 †	94±8 †	83±7 †
		2,54±0,14 ‡	2,38±0,23 ‡	2,81±0,15 ‡	4,24±0,29 ‡	4,19±0,43 ‡	4,02±0,36 ‡

Tabelle 7. Blutbild (bestimmt mittels scil Vet abc). Leukozytenzahl $\bullet 10^6$/ml; Thrombozyten $\bullet 10^6$/µl; MPV (*mean platelet volume*) in Femtoliter; PDW (*platelet distribution width*) in Prozent; Erythrozytenzahl $\bullet 10^6$/µl; HGB (Hämoglobin) in Gramm pro Deziliter; HCT (Hämatokrit) in Prozent; MCV (*mean corpuscular volume*) in Femtoliter; MCH (*mean corpuscular haemoglobin*) in Picogramm; MCHC (*mean corpuscular haemoglobin concentration*) in Gramm pro Deziliter; Abb. 42. Mittelwert ± Standardfehler.

	***mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/+}$**	***mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/-}$**	***mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{-/-}$**	**G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/+}$**	**G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/-}$**	**G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{-/-}$**
Leuko	9,09±0,38	8,05±0,62	8,77±0,69	10,13±0,99	10,93±1,05	11,14±0,87
Thrombo	1,68±0,11	1,48±0,11	1,88±0,14	2,45±0,20	2,64±0,19	2,89±0,22
Thrombo ♀	*1,42±0,12*	*1,37±0,13*	*1,69±0,14*	*2,49±0,28*	*2,73±0,27*	*2,73±0,36*
Thrombo ♂	*1,81±0,13*	*1,56±0,18*	*2,04±0,21*	*2,21±0,28*	*2,49±0,27*	*3,15±0,31*
MPV	5,57±0,07	5,65±0,08	5,67±0,06	5,57±0,078	5,41±0,07	5,33±0,08
PDW	13,38±0,25	13,25±0,15	13,27±0,10	15,04±0,54	15,10±0,39	14,72±0,37
Ery	8,29±0,24	8,54±0,36	8,56±0,36	6,54±0,47	6,67±0,44	6,80±0,33
HGB	12,63±0,31	12,75±0,51	12,38±0,45	10,01±0,66	9,92±0,57	10,08±0,53
HCT	42,96±1,08	43,43±1,82	42,55±1,72	33,52±2,19	34,20±1,99	34,60±1,82
MCV	52,00±0,45	50,94±0,39	50,20±0,59	52,38±0,91	52,20±1,12	52,20±0,97
MCH	15,31±0,16	14,97±0,15	14,60±0,19	15,50±0,34	15,20±0,38	15,41±0,34
MCHC	29,43±0,15	29,41±0,17	29,11±0,13	29,20±0,26	29,09±0,23	29,13±0,21

Tabelle 8. Frequenzen (%) und absolute Anzahlen •10^6 (#) von lymphoiden Vorläuferzellen und differenzierten Lymphozyten im Knochenmark. CLP (*common lymphoid progenitor*) siehe Abb. 60, B-Zell-Entwicklung siehe Abb. 62, B-Zellen siehe Abb. 44, NK- (Natürliche Killer-)Zellen siehe Abb. 48, T-Zellen siehe Abb. 45 & 46, lyDC/plDC (lymphoide/plasmazytoide Dendritische Zellen) siehe Abb. 56 & 58. Alle Werte sind Mittelwert ± Standardfehler.

	***mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/+}$**	***mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/-}$**	***mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{-/-}$**	**G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/+}$**	**G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/-}$**	**G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{-/-}$**
CLP	0,095±0,017 %	0,079±0,016 %	0,076±0,020 %	0,069±0,019 %	0,032±0,009 %	0,036±0,006 %
	0,084±0,016 #	0,061±0,019 #	0,063±0,015 #	0,077±0,019 #	0,031±0,009 #	0,032±0,007 #
präpro-B-Zellen	0,023±0,004 %	0,022±0,007 %	0,023±0,006 %	0,020±0,006 %	0,019±0,003 %	0,019±0.004 %
	0,020±0,004 #	0,017±0,007 #	0,018±0,005 #	0,020±0,006 #	0,017±0,003 #	0,015±0,001 #
pro-B-Zellen	0,435±0,080 %	0,416±0,108 %	0,400±0,128 %	0,103±0,040 %	0,101±0,034 %	0,094±0,041 %
	0,370±0,070 #	0,326±0,115 #	0,321±0,123 #	0,103±0,029 #	0,094±0,014 #	0,071±0,026 #
prä-B-Zellen	1,961±0,444 %	1,970±0,390 %	1,794±0,388 %	0,124±0,056 %	0,113±0,066 %	0,054±0,033 %
	1,727±0,398 #	1,506±0,199 #	1,370±0,373 #	0,134±0,056 #	0,105±0,060 #	0,041±0,022 #
B220+ B-Zellen	11,41±1,54 %	9,86±1,95 %	9,91±1,94 %	2,13±0,42 %	2,15±0,27 %	1,49±0,23 %
	10,07±1,53 #	8,77±1,74 #	9,00±1,84 #	2,10±0,39 #	1,89±0,33 #	1,19±0,17 #
NK-Zellen	0,696±0,061 %	0,455±0,072 %	0,383±0,038 %	0,474±0,065 %	0,420±0,063 %	0,406±0,073 %
	0,612±0,073 #	0,368±0,063 #	0,298±0,036 #	0,481±0,069 #	0,416±0,077 #	0,313±0,045 #
CD4-T-Zellen	0,959±0,066 %	0,980±0,108 %	1,477±0,227 %	0,531±0,083 %	0,519±0,052 %	0,725±0,129 %
	0,837±0,075 #	0,788±0,109 #	1,158±0,161 #	0,550±0,100 #	0,458±0,034 #	0,555±0,076 #
CD8-T-Zellen	1,109±0,095 %	0,989±0,105 %	1,223±0,181 %	0,539±0,064 %	0,658±0,086 %	0,667±0,127 %
	0,983±0,120 #	0,811±0,119 #	0,954±0,138 #	0,560±0,078 #	0,598±0,078 #	0,526±0,094 #
lyDC	0,183±0,030 %	0,125±0,032 %	0,103±0,017 %	0,099±0,014 %	0,044±0,013 %	0,038±0,013 %
	0,161±0,026 #	0,092±0,017 #	0,085±0,015 #	0,099±0,018 #	0,058±0,019 #	0,028±0,007 #
plDC	2,106±0,264 %	1,836±0,386 %	1,685±0,252 %	1,125±0,250 %	0,797±0,196 %	0,706±0,134 %
	1,830±0,143 #	1,483±0,290 #	1,359±0,214 #	1,266±0,225 #	0,721±0,129 #	0,597±0,116 #

Tabelle 9. Frequenzen (%) und absolute Anzahlen •10^6 (#) von myeloiden Vorläuferzellen und differenzierten myeloiden Zellen im Knochenmark. CMP (*common myeloid progenitor*), GMP (*granulocyte/macrophage progenitor*), MEP (*megakaryocyte/erythroid progenitor*) siehe Abb. 63, Granulozyten und Monozyten siehe Abb. 50 und 52, Erythroblasten (EB) siehe Abb. 65, myDC (myeloide Dendritische Zellen) siehe Abb. 57. Alle Werte sind Mittelwert ± Standardfehler.

	***mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/+}$**	***mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/-}$**	***mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{-/-}$**	**G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/+}$**	**G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/-}$**	**G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{-/-}$**
CMP	0,265±0,038 %	0,201±0,029 %	0,212±0,028 %	0,233±0,033 %	0,190±0,027 %	0,191±0,027 %
	0,231±0,038 #	0,171±0,036 #	0,166±0,028 #	0,257±0,038 #	0,183±0,025 #	0,164±0,023 #
GMP	0,330±0,042 %	0,270±0,038 %	0,271±0,040 %	0,453±0,065 %	0,380±0,065 %	0,366±0,041 %
	0,296±0,044 #	0,225±0,049 #	0,224±0,059 #	0,486±0,055 #	0,360±0,056 #	0,302±0,044 #
MEP	0,414±0,042 %	0,295±0,050 %	0,292±0,051 %	0,390±0,054 %	0,232±0,044 %	0,229±0,031 %
	0,365±0,041 #	0,239±0,043 #	0,230±0,041 #	0,425±0,059 #	0,217±0,044 #	0,188±0,032 #

Tabelle 9. Fortsetzung.

	mTerc$^{+/+}$ *MK2*$^{+/+}$	*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/-}$	*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{-/-}$	G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/+}$	G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/-}$	G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{-/-}$
Pro-EB	1,625±0,197 %	1,259±0,224 %	1,249±0,199 %	0,896±0,203 %	0,743±0,112 %	0,737±0,121 %
	1,404±0,192 #	1,011±0,151 #	1,025±0,189 #	0,993±0,263 #	0,720±0,126 #	0,632±0,129 #
basophile EB	2,577±0,378 %	1,994±0,333 %	1,855±0,346 %	1,767±0,343 %	1,461±0,323 %	1,542±0,353 %
	2,240±0,354 #	1,553±0,175 #	1,484±0,213 #	1,915±0,396 #	1,381±0,289 #	1,303±0,306 #
chromato-phile EB	1,047±0,168 %	0,775±0,100 %	0,741±0,091 %	0,722±0,134 %	0,567±0,114 %	0,585±0,107 %
	0,928±0,131 #	0,615±0,095 #	0,594±0,083 #	0,759±0,089 #	0,554±0,093 #	0,485±0,092 #
orhto-chromato. EB	0,395±0,045 %	0,319±0,058 %	0,318±0,050 %	0,328±0,069 %	0,264±0,041 %	0,277±0,049 %
	0,336±0,041 #	0,260±0,038 #	0,246±0,036 #	0,354±0,067 #	0,242±0,047 #	0,230±0,045 #
Granulo-zyten	53,51±3,07 %	55,68±4,08 %	54,27±3,57 %	68,55±1,83 %	71,30±3,11 %	72,86±1,72 %
	45,06±4,91 #	44,92±7,66 #	44,54±4,58 #	72,38±5,53 #	69,35±5,53 #	62,88±5,65 #
Mono-zyten	9,73±0,92 %	9,64±1,17 %	10,26±0,62 %	11,62±0,63 %	9,70±0,96 %	9,52±0,80 %
	8,44±0,73 #	8,25±1,39 #	8,26±0,74 #	11,41±0,94 #	9,35±1,08 #	8,28±0,99 #
myDC	0,860±0,061 %	0,751±0,104 %	0,732±0,058 %	0,622±0,045 %	0,464±0,063 %	0,463±0,047 %
	0,755±0,058 #	0,649±0,119 #	0,582±0,057 #	0,600±0,049 #	0,430±0,055 #	0,393±0,047 #

Tabelle 10a. Frequenzen (%) und absolute Anzahlen •10^6 (#) von Stamm- und frühen Vorläuferzellen im Knochenmark. LT-/ST-HSC (*long-/short-term hematopoetic stem cell*), MPP (*multipotent progenitor*) Abb. 68. Mittelwert ± Standardfehler.

	mTerc$^{+/+}$ *MK2*$^{+/+}$	*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/-}$	*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{-/-}$	G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/+}$	G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/-}$	G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{-/-}$
LT-HSC	0,082±0,010 %	0,082±0,004 %	0,081±0,010 %	0,055±0,011 %	0,055±0,012 %	0,055±0,011 %
	0,072±0,009 #	0,065±0,013 #	0,063±0,010 #	0,059±0,013 #	0,052±0,011 #	0,045±0,008 #
ST-HSC	0,024±0,003 %	0,022±0,004 %	0,022±0,003 %	0,032±0,005 %	0,030±0,005 %	0,028±0,005 %
	0,021±0,002 #	0,019±0,004 #	0,018±0,003 #	0,037±0,006 #	0,028±0,005 #	0,022±0,003 #
MPP	0,090±0,012 %	0,080±0,011 %	0,076±0,010 %	0,156±0,016 %	0,134±0,021 %	0,114±0,014 %
	0,081±0,011 #	0,062±0,009 #	0,060±0,009 #	0,166±0,019 #	0,135±0,022 #	0,094±0,012 #

Tabelle 10b. Spenderleukozyten (%) im Blut von Empfängermäusen 1, 3 und 6 Monate nach Knochenmarkstransplantation; Abb. 71. Mittelwert ± Standardfehler.

	mTerc$^{+/+}$ *MK2*$^{+/+}$	*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/-}$	*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{-/-}$	G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/+}$	G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/-}$	G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{-/-}$
1 Monat	70,29±2,24	69,48±4,84	64,58±3,62	50,84±6,66	49,26±19,04	40,76±12,08
3 Monate	82,41±2,02	79,57±3,42	67,77±2,40	47,12±11,85	45,20±19,84	38,06±9,49
6 Monate	87,40±2,85	84,45±4,41	72,69±1,95	39,94±10,06	41,49±19,09	32,71±11,79

Tabelle 11. Frequenzen (%) und absolute Anzahlen •10^6 (#) von lymphoiden Vorläuferzellen und differenzierten Lymphozyten in der Milz. B-Zellen siehe Abb. 44, NK- (Natürliche Killer-)Zellen siehe Abb. 48, T-Zellen siehe Abb. 45 & 46, lyDC/plDC (lymphoide/plasmazytoide Dendritische Zellen) siehe Abb. 56 & 58. Alle Werte sind Mittelwert ± Standardfehler.

	***mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/+}$**	***mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/-}$**	***mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{-/-}$**	**G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/+}$**	**G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/-}$**	**G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{-/-}$**
B220+ B-Zellen	45,09±2,34 %	41,94±3,19 %	31,24±3,51 %	18,81±3,07 %	18,38±2,39 %	15,91±2,13 %
	58,01±6,35 #	39,08±3,41 #	22,36±4,47 #	34,69±6,66 #	19,07±2,69 #	15,72±3,65 #
NK-Zellen	1,514±0,124 %	1,577±0,169 %	1,476±0,165 %	1,509±0,145 %	1,473±0,173 %	1,408±0,201 %
	2,142±0,328 #	1,817±0,234 #	1,541±0,242 #	3,027±0,413 #	1,678±0,292 #	1,392±0,269 #
CD4-T-Zellen	16,20±1,26 %	17,21±1,84 %	24,87±1,80 %	8,91±0,94 %	13,00±1,43 %	15,29±1,93 %
	21,24±1,90 #	18,96±2,88 #	22,10±3,52 #	16,94±2,14 #	12,09±1,85 #	13,39±2,03 #
CD8-T-Zellen	10,49±0,81 %	13,28±1,43 %	14,53±1,72 %	5,04±0,82 %	6,79±0,78 %	8,02±0,67 %
	13,96±1,36 #	14,44±2,07 #	12,25±1,79 #	9,25±1,16 #	7,38±1,31 #	7,54±1,48 #
lyDC	0,183±0,015 %	0,178±0,021 %	0,172±0,018 %	0,170±0,019 %	0,144±0,026 %	0,101±0,020 %
	0,252±0,03 #	0,176±0,026 #	0,164±0,041 #	0,345±0,065 #	0,136±0,025 #	0,097±0,023 #
plDC	0,857±0,111 %	0,821±0,184 %	0,802±0,130 %	0,933±0,094 %	0,825±0,154 %	0,748±0,187 %
	1,128±0,157 #	0,906±0,213 #	0,710±0,194 #	1,849±0,206 #	0,901±0,256 #	0,680±0,149 #

Tabelle 12. Frequenzen (%) und absolute Anzahlen •10^6 (#) von myeloiden Vorläuferzellen und differenzierten myeloiden Zellen in der Milz. GMP (*granulocyte/macrophage progenitor*), MEP (*megakaryocyte/erythroid progenitor*) siehe Abb. 75, Granulozyten siehe Abb. 50, Monozyten siehe Abb. 52, Makrophagen siehe Abb. 54, myDC (myeloide Dendritische Zellen) siehe Abb. 57, Erythroblasten siehe Abb. 66. Alle Werte sind Mittelwert ± Standardfehler.

	***mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/+}$**	***mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/-}$**	***mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{-/-}$**	**G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/+}$**	**G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/-}$**	**G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{-/-}$**
GMP	0,015±0,004 %	0,015±0,004 %	0,015±0,005 %	0,086±0,014 %	0,091±0,009 %	0,092±0,015 %
	0,022±0,004 #	0,017±0,006 #	0,013±0,004 #	0,170±0,038 #	0,101±0,014 #	0,086±0,017 #
MEP	0,256±0,073 %	0,201±0,077 %	0,147±0,055 %	0,651±0,141 %	0,595±0,137 %	0,502±0,113 %
	0,334±0,080 #	0,220±0,069 #	0,129±0,041 #	1,273±0,250 #	0,637±0,168 #	0,447±0,082 #
Pro-EB	0,374±0,117 %	0,402±0,157 %	0,445±0,173 %	1,315±0,251 %	1,262±0,329 %	1,237±0,345 %
	0,521±0,209 #	0,452±0,161 #	0,370±0,115 #	2,607±0,442 #	1,384±0,536 #	1,207±0,383 #
basophile EB	2,459±1,437 %	2,103±1,616 %	1,771±1,274 %	8,840±1,797 %	7,453±1,965 %	7,012±2,131 %
	3,213±1,069 #	2,226±0,790 #	1,521±0,651 #	17,75±2,833 #	8,270±2,629 #	6,488±2,233 #
chromato-phile EB	1,002±0,252 %	0,877±0,390 %	0,616±0,272 %	5,211±1,072 %	3,953±0,756 %	3,021±0,696 %
	1,379±0,344 #	0,933±0,369 #	0,633±0,178 #	10,49±2,763 #	4,250±1,180 #	2,809±0,567 #
orhto-chromato. EB	0,207±0,070 %	0,107±0,030 %	0,097±0,037 %	1,246±0,386 %	0,892±0,331 %	0,719±0,203 %
	0,280±0,095 #	0,141±0,049 #	0,086±0,029 #	2,378±0,570 #	1,072±0,294 #	0,681±0,188 #

Tabelle 12. Fortsetzung.

	mTerc$^{+/+}$ *MK2*$^{+/+}$	*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/-}$	*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{-/-}$	G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/+}$	G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/-}$	G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{-/-}$
Granulozyten	3,02±0,49 %	4,23±1,01 %	5,11±1,19 %	22,49±4,28 %	23,40±3,94 %	23,92±2,73 %
	4,58±1,34 #	3,94±0,91 #	4,00±1,13 #	39,84±6,69 #	28,36±5,27 #	22,90±4,35 #
Monozyten	1,922±0,211 %	1,918±0,379 %	1,675±0,225 %	4,410±0,494 %	3,323±0,325 %	3,479±0,423 %
	2,607±0,496 #	1,788±0,406 #	1,684±0,346 #	7,548±1,039 #	3,723±0,689 #	3,328±0,622 #
Makrophagen	0,680±0,072 %	0,508±0,102 %	0,467±0,077 %	0,534±0,106 %	0,503±0,087 %	0,476±0,063 %
	0,988±0,156 #	0,535±0,126 #	0,443±0,139 #	1,007±0,226 #	0,547±0,097 #	0,413±0,097 #
myDC	1,246±0,095 %	1,049±0,068 %	1,089±0,121 %	1,022±0,112 %	0,855±0,139 %	0,844±0,130 %
	1,684±0,254 #	1,258±0,199 #	1,009±0,215 #	1,981±0,275 #	0,921±0,062 #	0,756±0,124 #

Tabelle 13. Frequenzen (%) und absolute Anzahlen •10^6 (#) von Stammzellen und primitiven Vorläuferzellen in der Milz. LT-HSC (*long-term hematopoetic stem cell*), MPP (*multipotent progenitor*) siehe Abb. 75. Alle Werte sind Mittelwert ± Standardfehler.

	mTerc$^{+/+}$ *MK2*$^{+/+}$	*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/-}$	*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{-/-}$	G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/+}$	G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/-}$	G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{-/-}$
LT-HSC	0,016±0,003 %	0,016±0,005 %	0,015±0,004 %	0,033±0,005 %	0,033±0,005 %	0,033±0,007 %
	0,022±0,004 #	0,018±0,005 #	0,013±0,003 #	0,064±0,005 #	0,036±0,007 #	0,031±0,007 #
MPP	0,004±0,001 %	0,004±0,001 %	0,004±0,001 %	0,024±0,004 %	0,019±0,004 %	0,018±0,003 %
	0,005±0,001 #	0,004±0,001 #	0,003±0,001 #	0,044±0,009 #	0,024±0,005 #	0,017±0,005 #

Tabelle 14. Frequenzen (%) und absolute Anzahlen (#) von differenzierten Lymphozyten im Blut. B-Zellen (•10^2/µl) siehe Abb. 44, NK- (Natürliche Killer-)Zellen (•1/µl) siehe Abb. 48, T-Zellen (•1/µl) siehe Abb. 45 & 46, lyDC/plDC (lymphoide/plasmazytoide Dendritische Zellen, •1/µl) siehe Abb. 56 & 58. Alle Werte sind Mittelwert ± Standardfehler.

	mTerc$^{+/+}$ *MK2*$^{+/+}$	*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/-}$	*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{-/-}$	G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/+}$	G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{+/-}$	G3 *mTerc*$^{-/-}$ *MK2*$^{-/-}$
B220+ B-Zellen	42,17±3,73 %	31,63±4,49 %	27,44±4,67 %	16,33±3,08 %	9,78±2,39 %	8,01±2,07 %
	38,89±4,03 #	25,43±5,35 #	24,13±5,59 #	16,37±4,73 #	10,59±3,04 #	9,10±2,61 #
NK-Zellen	6,342±0,709 %	6,046±0,995 %	6,364±0,817 %	4,908±0,666 %	4,343±1,076 %	4,30±0,74 %
	569,7±64,8 #	491,9±94,1 #	553,4±106,2 #	491,4±109,8 #	471,4±116,8 #	485,3±100,8 #
CD4-T-Zellen	2,669±0,412 %	2,983±0,352 %	3,433±0,351 %	2,157±0,329 %	1,733±0,258 %	2,015±0,329 %
	242,4±30,1 #	230,3±32,6 #	290,4±45,5 #	214,1±44,6 #	190,7±36,9 #	217,0±36,6 #
CD8-T-Zellen	6,278±1,021 %	5,748±1,150 %	6,785±0,817 %	4,330±0,955 %	4,609±0,978 %	3,866±0,952 %
	541,8±63,8 #	443,5±106,1 #	586,3±98,2 #	445,9±112,7 #	500,6±104,7 #	429,8±95,2 #

Tabelle 14. Fortsetzung.

	mTerc$^{+/+}$ *MK2*$^{+/+}$	*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/–}$	*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{–/–}$	G3 *mTerc*$^{–/–}$ *MK2*$^{+/+}$	G3 *mTerc*$^{–/–}$ *MK2*$^{+/–}$	G3 *mTerc*$^{–/–}$ *MK2*$^{–/–}$
lyDC	0,218±0,069 %	0,206±0,074 %	0,219±0,055 %	0,221±0,069 %	0,091±0,035 %	0,109±0,047 %
	19,39±4,31 #	16,67±6,01 #	19,81±6,09 #	22,53±6,51 #	9,71±3,45 #	11,61±5,23 #
plDC	0,255±0,064 %	0,243±0,023 %	0,232±0,037 %	0,261±0,053 %	0,171±0,049 %	0,127±0,033 %
	23,77±3,13 #	19,53±2,39 #	20,36±4,12 #	26,59±5,93 #	19,41±5,75 #	14,63±4,54 #

Tabelle 15. Frequenzen (%) und absolute Anzahlen (#) von differenzierten myeloiden Zellen im Blut. Granulozyten und Monozyten (•10^2/µl) siehe Abb. 50 & 52, myDC (myeloide Dendritische Zellen, •1/µl) siehe Abb. 57. Alle Werte sind Mittelwert ± Standardfehler.

	mTerc$^{+/+}$ *MK2*$^{+/+}$	*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/–}$	*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{–/–}$	G3 *mTerc*$^{–/–}$ *MK2*$^{+/+}$	G3 *mTerc*$^{–/–}$ *MK2*$^{+/–}$	G3 *mTerc*$^{–/–}$ *MK2*$^{–/–}$
Granulo-zyten	15,41±1,97 %	16,47±5,12 %	21,03±4,89 %	31,84±9,30 %	35,21±10,68 %	38,56±10,78 %
	14,19±2,32 #	13,20±4,04 #	17,35±4,48 #	33,04±7,35 #	39,35±11,79 #	44,50±13,96 #
Mono-zyten	13,47±1,62 %	13,78±2,18 %	14,05±3,03 %	25,54±8,07 %	26,33±7,97 %	28,81±9,12 %
	12,00±1,24 #	11,83±1,85 #	12,29±2,33 #	25,54±7,21 #	28,57±9,11 #	32,93±8,49 #
myDC	7,446±1,130 %	6,860±0,536 %	6,268±1,473 %	3,599±0,625 %	3,665±1,067 %	2,343±0,503 %
	660,3±74,31 #	549,6±63,9 #	542,3±73,5 #	372,7±89,9 #	391,7±92,0 #	259,3±69,0 #

Tabelle 16. Absolute Anzahlen pro µl von Stammzellen und primitiven Vorläuferzellen im Blut. LT-HSC (*long-term hematopoetic stem cell*), MPP (*multipotent progenitor*) siehe Abb. 74. Alle Werte sind Mittelwert ± Standardfehler.

	mTerc$^{+/+}$ *MK2*$^{+/+}$	*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/–}$	*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{–/–}$	G3 *mTerc*$^{–/–}$ *MK2*$^{+/+}$	G3 *mTerc*$^{–/–}$ *MK2*$^{+/–}$	G3 *mTerc*$^{–/–}$ *MK2*$^{–/–}$
MPP	0,056±0,035	0,035±0,035	0,024±0,014	0,110±0,032	0,082±0,047	0,055±0,034
LT-HSC	0,064±0,032	0,047±0,024	0,023±0,018	0,148±0,066	0,111±0,039	0,082±0,026

Tabelle 17. Zytokinkonzentrationen von G-CSF (Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor) und Interleukin (IL)-6 [pg/ml] im Blutplasma (Abb. 73). Alle Werte sind Mittelwert ± Standardfehler.

	mTerc$^{+/+}$ *MK2*$^{+/+}$	*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{+/–}$	*mTerc*$^{+/+}$ *MK2*$^{–/–}$	G3 *mTerc*$^{–/–}$ *MK2*$^{+/+}$	G3 *mTerc*$^{–/–}$ *MK2*$^{+/–}$	G3 *mTerc*$^{–/–}$ *MK2*$^{–/–}$
G-CSF	378±44	279±61	269±31	4103±369	2571±874	1989±389
IL-6	7.3±1.1	5.6±1.1	7.7±0.9	49.0±8.2	30.3±5.5	22.6±3.6

6. Literaturverzeichnis

Abt,M.C. and Artis,D. (2009). The intestinal microbiota in health and disease: the influence of microbial products on immune cell homeostasis. Curr. Opin. Gastroenterol. *25*, 496-502.

Allsopp,R.C., Chang,E., Kashefi-Aazam,M., Rogaev,E.I., Piatyszek,M.A., Shay,J.W., and Harley,C.B. (1995). Telomere shortening is associated with cell division in vitro and in vivo. Exp. Cell Res. *220*, 194-200.

Allsopp,R.C. and Weissman,I.L. (2002). Replicative senescence of hematopoietic stem cells during serial transplantation: does telomere shortening play a role? Oncogene *21*, 3270-3273.

Antonescu,C.N., Huang,C., Niu,W., Liu,Z., Eyers,P.A., Heidenreich,K.A., Bilan,P.J., and Klip,A. (2005). Reduction of insulin-stimulated glucose uptake in L6 myotubes by the protein kinase inhibitor SB203580 is independent of p38MAPK activity. Endocrinology *146*, 3773-3781.

Ariyasu,H., Iwakura,H., Yamada,G., Nakao,K., Kangawa,K., and Akamizu,T. (2008). Efficacy of ghrelin as a therapeutic approach for age-related physiological changes. Endocrinology *149*, 3722-3728.

Armanios,M. (2009). Syndromes of telomere shortening. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. *10*, 45-61.

Armanios,M.Y., Chen,J.J., Cogan,J.D., Alder,J.K., Ingersoll,R.G., Markin,C., Lawson,W.E., Xie,M., Vulto,I., Phillips,J.A., III, Lansdorp,P.M., Greider,C.W., and Loyd,J.E. (2007). Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. N. Engl. J. Med. *356*, 1317-1326.

Aubert,G. and Lansdorp,P.M. (2008). Telomeres and aging. Physiol Rev. *88*, 557-579.

Aviv,A. (2009). Leukocyte telomere length: the telomere tale continues. Am. J. Clin. Nutr. *89*, 1721-1722.

Baerlocher,G.M., Vulto,I., de,J.G., and Lansdorp,P.M. (2006). Flow cytometry and FISH to measure the average length of telomeres (flow FISH). Nat. Protoc. *1*, 2365-2376.

Bagley,M.C., David,T., Murziani,P.G.S., Widdowson,C.S., and Kipling,D. (2010). Use of p38 MAPK Inhibitors for the Treatment of Werner Syndrome. Pharmaceuticals *3*, 1842-1872.

Barger,P.M., Browning,A.C., Garner,A.N., and Kelly,D.P. (2001). p38 mitogen-activated protein kinase activates peroxisome proliferator-activated receptor alpha: a potential role in the cardiac metabolic stress response. J. Biol. Chem. *276*, 44495-44501.

Bartke,A. (2005). Minireview: role of the growth hormone/insulin-like growth factor system in mammalian aging. Endocrinology *146*, 3718-3723.

Begus-Nahrmann,Y., Lechel,A., Obenauf,A.C., Nalapareddy,K., Peit,E., Hoffmann,E., Schlaudraff,F., Liss,B., Schirmacher,P., Kestler,H., Danenberg,E., Barker,N., Clevers,H., Speicher,M.R., and Rudolph,K.L. (2009). p53 deletion impairs clearance of chromosomal-instable stem cells in aging telomere-dysfunctional mice. Nat. Genet. *41*, 1138-1143.

Bekaert,S., Derradji,H., and Baatout,S. (2004). Telomere biology in mammalian germ cells and during development. Dev. Biol. *274*, 15-30.

Ben-Levy,R., Hooper,S., Wilson,R., Paterson,H.F., and Marshall,C.J. (1998). Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. Curr. Biol. *8*, 1049-1057.

Bengtson,V., Silverstein,M., Putney,N., and Gans,D. (2008). Handbook of Theories of Aging. (New York: Springer Publishing Company).

Bettencourt-Dias,M., Giet,R., Sinka,R., Mazumdar,A., Lock,W.G., Balloux,F., Zafiropoulos,P.J., Yamaguchi,S., Winter,S., Carthew,R.W., Cooper,M., Jones,D., Frenz,L., and Glover,D.M. (2004). Genome-wide survey of protein kinases required for cell cycle progression. Nature *432*, 980-987.

Bhattacharyya,S., Sandy,A., and Groden,J. (2010). Unwinding protein complexes in ALTernative telomere maintenance. J. Cell Biochem. *109*, 7-15.

Biagi,E., Nylund,L., Candela,M., Ostan,R., Bucci,L., Pini,E., Nikkila,J., Monti,D., Satokari,R., Franceschi,C., Brigidi,P., and De,V.W. (2010). Through ageing, and beyond: gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians. PLoS. One. *5*, e10667.

Blackburn,E.H. (1991). Structure and function of telomeres. Nature *350*, 569-573.

Blasco,M.A., Lee,H.W., Hande,M.P., Samper,E., Lansdorp,P.M., DePinho,R.A., and Greider,C.W. (1997). Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. Cell *91*, 25-34.

Boskey,A.L. and Coleman,R. (2010). Aging and bone. J. Dent. Res. *89*, 1333-1348.

Bost,K.L., Bento,J.L., Ellington,J.K., Marriott,I., and Hudson,M.C. (2000). Induction of colony-stimulating factor expression following Staphylococcus or Salmonella interaction with mouse or human osteoblasts. Infect. Immun. *68*, 5075-5083.

Brendolan,A., Rosado,M.M., Carsetti,R., Selleri,L., and Dear,T.N. (2007). Development and function of the mammalian spleen. Bioessays *29*, 166-177.

Brodsky,I., Dennis,L.H., Kahn,S.B., and Brady,L.W. (1966). Normal mouse erythropoiesis. I. The role of the spleen in mouse erythropoiesis. Cancer Res. *26*, 198-201.

Brown,C.Y., Lagnado,C.A., Vadas,M.A., and Goodall,G.J. (1996). Differential regulation of the stability of cytokine mRNAs in lipopolysaccharide-activated blood monocytes in response to interleukin-10. J. Biol. Chem. *271*, 20108-20112.

Brown,J.P., Wei,W., and Sedivy,J.M. (1997). Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. Science *277*, 831-834.

Brown-Borg,H.M. (2007). Hormonal regulation of longevity in mammals. Ageing Res. Rev. *6*, 28-45.

Brummendorf,T.H., Maciejewski,J.P., Mak,J., Young,N.S., and Lansdorp,P.M. (2001). Telomere length in leukocyte subpopulations of patients with aplastic anemia. Blood *97*, 895-900.

Bryder,D., Rossi,D.J., and Weissman,I.L. (2006). Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. Am. J. Pathol. *169*, 338-346.

Buchakjian,M.R. and Kornbluth,S. (2010). The engine driving the ship: metabolic steering of cell proliferation and death. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *11*, 715-727.

Bucher,N. and Britten,C.D. (2008). G2 checkpoint abrogation and checkpoint kinase-1 targeting in the treatment of cancer. Br. J. Cancer *98*, 523-528.

Bulavin,D.V., Higashimoto,Y., Popoff,I.J., Gaarde,W.A., Basrur,V., Potapova,O., Appella,E., and Fornace,A.J., Jr. (2001). Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase. Nature *411*, 102-107.

Bulavin,D.V., Saito,S., Hollander,M.C., Sakaguchi,K., Anderson,C.W., Appella,E., and Fornace,A.J., Jr. (1999). Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. EMBO J. *18*, 6845-6854.

Calado,R.T. (2009). Telomeres and marrow failure. Hematology. Am. Soc. Hematol. Educ. Program. 338-343.

Campbell,J., Ciesielski,C.J., Hunt,A.E., Horwood,N.J., Beech,J.T., Hayes,L.A., Denys,A., Feldmann,M., Brennan,F.M., and Foxwell,B.M. (2004). A novel mechanism for TNF-alpha regulation by p38 MAPK: involvement of NF-kappa B with implications for therapy in rheumatoid arthritis. J. Immunol. *173*, 6928-6937.

Cao,W., Collins,Q.F., Becker,T.C., Robidoux,J., Lupo,E.G., Jr., Xiong,Y., Daniel,K.W., Floering,L., and Collins,S. (2005). p38 Mitogen-activated protein kinase plays a stimulatory role in hepatic gluconeogenesis. J. Biol. Chem. *280*, 42731-42737.

Cartee,G.D. and Bohn,E.E. (1995). Growth hormone reduces glucose transport but not GLUT-1 or GLUT-4 in adult and old rats. Am. J. Physiol *268*, E902-E909.

Casanovas,O., Miro,F., Estanyol,J.M., Itarte,E., Agell,N., and Bachs,O. (2000). Osmotic stress regulates the stability of cyclin D1 in a p38SAPK2-dependent manner. J. Biol. Chem. *275*, 35091-35097.

Cawthon,R.M., Smith,K.R., O'Brien,E., Sivatchenko,A., and Kerber,R.A. (2003). Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. Lancet *361*, 393-395.

Cebon,J., Layton,J.E., Maher,D., and Morstyn,G. (1994). Endogenous haemopoietic growth factors in neutropenia and infection. Br. J. Haematol. *86*, 265-274.

Chambers,S.M., Shaw,C.A., Gatza,C., Fisk,C.J., Donehower,L.A., and Goodell,M.A. (2007). Aging hematopoietic stem cells decline in function and exhibit epigenetic dysregulation. PLoS. Biol. *5*, e201.

Chappel,S. and Murphy,W. (2000). Growth Hormone. In Cytokine Reference, A Compendium of Cytokines and Other Mediators of Host Defense, J.J.Oppenheim and M.Feldman, eds. (New York: Academic Press).

Chi,A.W., Bell,J.J., Zlotoff,D.A., and Bhandoola,A. (2009). Untangling the T branch of the hematopoiesis tree. Curr. Opin. Immunol. *21*, 121-126.

Choudhury,A.R., Ju,Z., Djojosubroto,M.W., Schienke,A., Lechel,A., Schaetzlein,S., Jiang,H., Stepczynska,A., Wang,C., Buer,J., Lee,H.W., Von,Z.T., Ganser,A., Schirmacher,P., Nakauchi,H., and Rudolph,K.L. (2007). Cdkn1a deletion improves stem cell function and lifespan of mice with dysfunctional telomeres without accelerating cancer formation. Nat. Genet. *39*, 99-105.

Christensen,J.L., Wright,D.E., Wagers,A.J., and Weissman,I.L. (2004). Circulation and chemotaxis of fetal hematopoietic stem cells. PLoS. Biol. *2*, E75.

Clemmons,D.R. (2007). Modifying IGF1 activity: an approach to treat endocrine disorders, atherosclerosis and cancer. Nat. Rev. Drug Discov. *6*, 821-833.

Collerton,J., Martin-Ruiz,C., Kenny,A., Barrass,K., Von,Z.T., Kirkwood,T., and Keavney,B. (2007). Telomere length is associated with left ventricular function in the oldest old: the Newcastle 85+ study. Eur. Heart J. *28*, 172-176.

Collins,K. (2006). The biogenesis and regulation of telomerase holoenzymes. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *7*, 484-494.

Coppe,J.P., Patil,C.K., Rodier,F., Krtolica,A., Beausejour,C.M., Parrinello,S., Hodgson,J.G., Chin,K., Desprez,P.Y., and Campisi,J. (2010). A human-like senescence-associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen. PLoS. One. *5*, e9188.

Coppe,J.P., Patil,C.K., Rodier,F., Sun,Y., Munoz,D.P., Goldstein,J., Nelson,P.S., Desprez,P.Y., and Campisi,J. (2008). Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. PLoS. Biol. *6*, 2853-2868.

Counter,C.M., Avilion,A.A., LeFeuvre,C.E., Stewart,N.G., Greider,C.W., Harley,C.B., and Bacchetti,S. (1992). Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. EMBO J. *11*, 1921-1929.

Cray,C., Zaias,J., and Altman,N.H. (2009). Acute phase response in animals: a review. Comp Med. *59*, 517-526.

Cumano,A. and Godin,I. (2007). Ontogeny of the hematopoietic system. Annu. Rev. Immunol. *25*, 745-785.

d'Adda di Fagagna,F., Reaper,P.M., Clay-Farrace,L., Fiegler,H., Carr,P., Von,Z.T., Saretzki,G., Carter,N.P., and Jackson,S.P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. Nature *426*, 194-198.

Davis,T., Haughton,M.F., Jones,C.J., and Kipling,D. (2006). Prevention of accelerated cell aging in the Werner syndrome. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1067*, 243-247.

De Boeck,G., Forsyth,R.G., Praet,M., and Hogendoorn,P.C. (2009). Telomere-associated proteins: cross-talk between telomere maintenance and telomere-lengthening mechanisms. J. Pathol. *217*, 327-344.

de Lange,T. (2005). Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. Genes Dev. *19*, 2100-2110.

de Waal Malefyt,R. (2000). IL-10. In Cytokine Reference, A Compendium of Cytokines and Other Mediators of Host Defense, J.J.Oppenheim and M.Feldman, eds. (New York: Academic Press).

Demetri,G.D. and Griffin,J.D. (1991). Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. Blood *78*, 2791-2808.

DePascalis,B., Bianchi,A., Satta,M.A., Lupascu,A., Mentella,M.C., Leo,D., Fiore,F., Fedeli,P., Pontecorvi,A., Pola,P., Melina,D., Gasbarrini,A., De,M.L., and Armuzzi,A. (2006). Growth hormone in inflammatory bowel disease. Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. *10*, 13-16.

Desai,A., Grolleau-Julius,A., and Yung,R. (2010). Leukocyte function in the aging immune system. J. Leukoc. Biol. *87*, 1001-1009.

Dey,D.K., Rothenberg,E., Sundh,V., Bosaeus,I., and Steen,B. (1999). Height and body weight in the elderly. I. A 25-year longitudinal study of a population aged 70 to 95 years. Eur. J. Clin. Nutr. *53*, 905-914.

Di Santo,J.P. (2006). Natural killer cell developmental pathways: a question of balance. Annu. Rev. Immunol. *24*, 257-286.

Di Santo,J.P. and Vosshenrich,C.A. (2006). Bone marrow versus thymic pathways of natural killer cell development. Immunol. Rev. *214*, 35-46.

Dodeller,F. and Schulze-Koops,H. (2006). The p38 mitogen-activated protein kinase signaling cascade in CD4 T cells. Arthritis Res. Ther. *8*, 205.

Dong,C., Davis,R.J., and Flavell,R.A. (2002). MAP kinases in the immune response. Annu. Rev. Immunol. *20*, 55-72.

Drozdowski,L. and Thomson,A.B. (2006). Aging and the intestine. World J. Gastroenterol. *12*, 7578-7584.

Drozdowski,L.A., Clandinin,T., and Thomson,A.B. (2010). Ontogeny, growth and development of the small intestine: Understanding pediatric gastroenterology. World J. Gastroenterol. *16*, 787-799.

Feng,Z. and Levine,A.J. (2010). The regulation of energy metabolism and the IGF-1/mTOR pathways by the p53 protein. Trends Cell Biol. *20*, 427-434.

Feng,Z., Zhang,H., Levine,A.J., and Jin,S. (2005). The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *102*, 8204-8209.

Finch,C.E. and Crimmins,E.M. (2004). Inflammatory exposure and historical changes in human life-spans. Science *305*, 1736-1739.

Fontana,L., Partridge,L., and Longo,V.D. (2010). Extending healthy life span--from yeast to humans. Science *328*, 321-326.

Franceschi,C. and Bonafe,M. (2003). Centenarians as a model for healthy aging. Biochem. Soc. Trans. *31*, 457-461.

Freund,A., Orjalo,A.V., Desprez,P.Y., and Campisi,J. (2010). Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. Trends Mol. Med. *16*, 238-246.

Fujii,H., Shao,L., Colmegna,I., Goronzy,J.J., and Weyand,C.M. (2009). Telomerase insufficiency in rheumatoid arthritis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *106*, 4360-4365.

Fyhrquist,N., Matikainen,S., and Lauerma,A. (2010). MK2 signaling: lessons on tissue specificity in modulation of inflammation. J. Invest Dermatol. *130*, 342-344.

Gabay,C. (2006). Interleukin-6 and chronic inflammation. Arthritis Res. Ther. *8 Suppl 2*, S3.

Gaestel,M. (2006). MAPKAP kinases - MKs - two's company, three's a crowd. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *7*, 120-130.

Gaestel,M., Kotlyarov,A., and Kracht,M. (2009). Targeting innate immunity protein kinase signalling in inflammation. Nat. Rev. Drug Discov. *8*, 480-499.

Gahete,M.D., Duran-Prado,M., Luque,R.M., Martinez-Fuentes,A.J., Quintero,A., Gutierrez-Pascual,E., Cordoba-Chacon,J., Malagon,M.M., Gracia-Navarro,F., and Castano,J.P. (2009). Understanding the multifactorial control of growth hormone release by somatotropes: lessons from comparative endocrinology. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1163*, 137-153.

Geiger,P.C., Wright,D.C., Han,D.H., and Holloszy,J.O. (2005). Activation of p38 MAP kinase enhances sensitivity of muscle glucose transport to insulin. Am. J. Physiol Endocrinol. Metab *288*, E782-E788.

Geissmann,F., Manz,M.G., Jung,S., Sieweke,M.H., Merad,M., and Ley,K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. Science *327*, 656-661.

Gertz,M.A. (2010). Current status of stem cell mobilization. Br. J. Haematol. *150*, 647-662.

Giunta,S. (2006). Is inflammaging an auto[innate]immunity subclinical syndrome? Immun. Ageing *3*, 12.

Gong,X., Ming,X., Deng,P., and Jiang,Y. (2010). Mechanisms regulating the nuclear translocation of p38 MAP kinase. J. Cell Biochem. *110*, 1420-1429.

Gorska,M.M., Liang,Q., Stafford,S.J., Goplen,N., Dharajiya,N., Guo,L., Sur,S., Gaestel,M., and Alam,R. (2007). MK2 controls the level of negative feedback in the NF-kappaB pathway and is essential for vascular permeability and airway inflammation. J. Exp. Med. *204*, 1637-1652.

Goto,M. (2009). Emerging concept of ageing: Inflammageing. Inflammation and Regeneration *29*, 249-257.

Gredilla,R. and Barja,G. (2005). Minireview: the role of oxidative stress in relation to caloric restriction and longevity. Endocrinology *146*, 3713-3717.

Griffith,J.D., Comeau,L., Rosenfield,S., Stansel,R.M., Bianchi,A., Moss,H., and de,L.T. (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. Cell *97*, 503-514.

Guerra,L., Carr,H.S., Richter-Dahlfors,A., Masucci,M.G., Thelestam,M., Frost,J.A., and Frisan,T. (2008). A bacterial cytotoxin identifies the RhoA exchange factor Net1 as a key effector in the response to DNA damage. PLoS. One. *3*, e2254.

Guigoz,Y., Dore,J., and Schiffrin,E.J. (2008). The inflammatory status of old age can be nurtured from the intestinal environment. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab Care *11*, 13-20.

Hajishengallis,G. (2010). Too old to fight? Aging and its toll on innate immunity. Mol. Oral Microbiol. *25*, 25-37.

Hande,M.P., Samper,E., Lansdorp,P., and Blasco,M.A. (1999). Telomere length dynamics and chromosomal instability in cells derived from telomerase null mice. J. Cell Biol. *144*, 589-601.

Harley,C.B., Futcher,A.B., and Greider,C.W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. Nature *345*, 458-460.

HAYFLICK,L. (1965). THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. Exp. Cell Res. *37*, 614-636.

HAYFLICK,L. and MOORHEAD,P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. Exp. Cell Res. *25*, 585-621.

Heaney,N.B. and Holyoake,T.L. (2007). What is new in chronic myeloid leukaemia? Scott. Med. J. *52*, 36-41.

Hegen,M., Gaestel,M., Nickerson-Nutter,C.L., Lin,L.L., and Telliez,J.B. (2006). MAPKAP kinase 2-deficient mice are resistant to collagen-induced arthritis. J. Immunol. *177*, 1913-1917.

Herrera,E., Samper,E., Martin-Caballero,J., Flores,J.M., Lee,H.W., and Blasco,M.A. (1999). Disease states associated with telomerase deficiency appear earlier in mice with short telomeres. EMBO J. *18*, 2950-2960.

Hitti,E., Iakovleva,T., Brook,M., Deppenmeier,S., Gruber,A.D., Radzioch,D., Clark,A.R., Blackshear,P.J., Kotlyarov,A., and Gaestel,M. (2006). Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 regulates tumor necrosis factor mRNA stability and translation mainly by altering tristetraprolin expression, stability, and binding to adenine/uridine-rich element. Mol. Cell Biol. *26*, 2399-2407.

Hoene,M. and Weigert,C. (2008). The role of interleukin-6 in insulin resistance, body fat distribution and energy balance. Obes. Rev. *9*, 20-29.

Hoffbrand,A.V., Moss,P.A.H., and Pettit,J.E. (2006). Essential Haematology. (Oxford: Blackwell Publishing).

Horner,M.J., Ries,L.A.G., Krapcho,M., Neyman,N., Aminou,R., Howlader,N., Altekruse,S.F., Feuer,E.J., Huang,L., Mariotto,A., Miller,B.A., Lewis,D.R., Eisner,M.P., Stinchcomb,D.G., and Edwards,B.K. (2009). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2006. National Cancer Institute, Bethesda, MD.

Hume,D.A. (2006). The mononuclear phagocyte system. Curr. Opin. Immunol. *18*, 49-53.

Hume,D.A., Ross,I.L., Himes,S.R., Sasmono,R.T., Wells,C.A., and Ravasi,T. (2002). The mononuclear phagocyte system revisited. J. Leukoc. Biol. *72*, 621-627.

Igarashi,M., Wakasaki,H., Takahara,N., Ishii,H., Jiang,Z.Y., Yamauchi,T., Kuboki,K., Meier,M., Rhodes,C.J., and King,G.L. (1999). Glucose or diabetes activates p38 mitogen-activated protein kinase via different pathways. J. Clin. Invest *103*, 185-195.

Ito,K., Hirao,A., Arai,F., Takubo,K., Matsuoka,S., Miyamoto,K., Ohmura,M., Naka,K., Hosokawa,K., Ikeda,Y., and Suda,T. (2006). Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. Nat. Med. *12*, 446-451.

Jackson,J.G. and Pereira-Smith,O.M. (2006). p53 is preferentially recruited to the promoters of growth arrest genes p21 and GADD45 during replicative senescence of normal human fibroblasts. Cancer Res. *66*, 8356-8360.

Jagavelu,K., Tietge,U.J., Gaestel,M., Drexler,H., Schieffer,B., and Bavendiek,U. (2007). Systemic deficiency of the MAP kinase-activated protein kinase 2 reduces atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. Circ. Res. *101*, 1104-1112.

Janeway,C.A.Jr., Travers,P., Walport,M., and Shlomchik,M.J. (2005). Immunobiology : the immune system in health and disease. (New York: Garland Science Publishing).

Jiang,H., Ju,Z., and Rudolph,K.L. (2007). Telomere shortening and ageing. Z. Gerontol. Geriatr. *40*, 314-324.

Jiang,H., Schiffer,E., Song,Z., Wang,J., Zurbig,P., Thedieck,K., Moes,S., Bantel,H., Saal,N., Jantos,J., Brecht,M., Jeno,P., Hall,M.N., Hager,K., Manns,M.P., Hecker,H., Ganser,A., Dohner,K., Bartke,A., Meissner,C., Mischak,H., Ju,Z., and Rudolph,K.L. (2008). Proteins induced by telomere dysfunction and DNA damage represent biomarkers of human aging and disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *105*, 11299-11304.

Johansen,C., Funding,A.T., Otkjaer,K., Kragballe,K., Jensen,U.B., Madsen,M., Binderup,L., Skak-Nielsen,T., Fjording,M.S., and Iversen,L. (2006). Protein expression of TNF-alpha in psoriatic skin is regulated at a posttranscriptional level by MAPK-activated protein kinase 2. J. Immunol. *176*, 1431-1438.

Jones,R.G., Plas,D.R., Kubek,S., Buzzai,M., Mu,J., Xu,Y., Birnbaum,M.J., and Thompson,C.B. (2005). AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. Mol. Cell *18*, 283-293.

Ju,Z., Jiang,H., Jaworski,M., Rathinam,C., Gompf,A., Klein,C., Trumpp,A., and Rudolph,K.L. (2007). Telomere dysfunction induces environmental alterations limiting hematopoietic stem cell function and engraftment. Nat. Med. *13*, 742-747.

Kang,S.W., Adler,S.G., LaPage,J., and Natarajan,R. (2001). p38 MAPK and MAPK kinase 3/6 mRNA and activities are increased in early diabetic glomeruli. Kidney Int. *60*, 543-552.

Karlseder,J., Broccoli,D., Dai,Y., Hardy,S., and de,L.T. (1999). p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. Science *283*, 1321-1325.

Kawamoto,H. and Katsura,Y. (2009). A new paradigm for hematopoietic cell lineages: revision of the classical concept of the myeloid-lymphoid dichotomy. Trends Immunol. *30*, 193-200.

Kawamoto,H., Wada,H., and Katsura,Y. (2010). A revised scheme for developmental pathways of hematopoietic cells: the myeloid-based model. Int. Immunol. *22*, 65-70.

Kawano,Y., Ryder,J.W., Rincon,J., Zierath,J.R., Krook,A., and Wallberg-Henriksson,H. (2001). Evidence against high glucose as a mediator of ERK1/2 or p38 MAPK phosphorylation in rat skeletal muscle. Am. J. Physiol Endocrinol. Metab *281*, E1255-E1259.

Kiel,M.J., Yilmaz,O.H., Iwashita,T., Yilmaz,O.H., Terhorst,C., and Morrison,S.J. (2005). SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. Cell *121*, 1109-1121.

Kim,C., Sano,Y., Todorova,K., Carlson,B.A., Arpa,L., Celada,A., Lawrence,T., Otsu,K., Brissette,J.L., Arthur,J.S., and Park,J.M. (2008). The kinase p38 alpha serves cell type-specific inflammatory functions in skin injury and coordinates pro- and anti-inflammatory gene expression. Nat. Immunol. *9*, 1019-1027.

Kim,N.W. (1997). Clinical implications of telomerase in cancer. Eur. J. Cancer *33*, 781-786.

Kim,Y.S. and Ho,S.B. (2010). Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. Curr. Gastroenterol. Rep. *12*, 319-330.

Kitada,T., Seki,S., Kawakita,N., Kuroki,T., and Monna,T. (1995). Telomere shortening in chronic liver diseases. Biochem. Biophys. Res. Commun. *211*, 33-39.

Kondo,M., Wagers,A.J., Manz,M.G., Prohaska,S.S., Scherer,D.C., Beilhack,G.F., Shizuru,J.A., and Weissman,I.L. (2003). Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. Annu. Rev. Immunol. *21*, 759-806.

Kontoyiannis,D., Boulougouris,G., Manoloukos,M., Armaka,M., Apostolaki,M., Pizarro,T., Kotlyarov,A., Forster,I., Flavell,R., Gaestel,M., Tsichlis,P., Cominelli,F., and Kollias,G. (2002). Genetic dissection of the cellular pathways and signaling mechanisms in modeled tumor necrosis factor-induced Crohn's-like inflammatory bowel disease. J. Exp. Med. *196*, 1563-1574.

Kontoyiannis,D., Kotlyarov,A., Carballo,E., Alexopoulou,L., Blackshear,P.J., Gaestel,M., Davis,R., Flavell,R., and Kollias,G. (2001). Interleukin-10 targets p38 MAPK to modulate ARE-dependent TNF mRNA translation and limit intestinal pathology. EMBO J. *20*, 3760-3770.

Kontoyiannis,D., Pasparakis,M., Pizarro,T.T., Cominelli,F., and Kollias,G. (1999). Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies. Immunity. *10*, 387-398.

Kotlyarov,A., Neininger,A., Schubert,C., Eckert,R., Birchmeier,C., Volk,H.D., and Gaestel,M. (1999). MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF-alpha biosynthesis. Nat. Cell Biol. *1*, 94-97.

Kotlyarov,A., Yannoni,Y., Fritz,S., Laass,K., Telliez,J.B., Pitman,D., Lin,L.L., and Gaestel,M. (2002). Distinct cellular functions of MK2. Mol. Cell Biol. *22*, 4827-4835.

Koury,M.J. and Ponka,P. (2004). New insights into erythropoiesis: the roles of folate, vitamin B12, and iron. Annu. Rev. Nutr. *24*, 105-131.

Koury,M.J., Sawyer,S.T., and Brandt,S.J. (2002). New insights into erythropoiesis. Curr. Opin. Hematol. *9*, 93-100.

Kuma,Y., Campbell,D.G., and Cuenda,A. (2004). Identification of glycogen synthase as a new substrate for stress-activated protein kinase 2b/p38beta. Biochem. J. *379*, 133-139.

Lai,A.Y., Lin,S.M., and Kondo,M. (2005). Heterogeneity of Flt3-expressing multipotent progenitors in mouse bone marrow. J. Immunol. *175*, 5016-5023.

Lamberts,S.W., van den Beld,A.W., and van der Lely,A.J. (1997). The endocrinology of aging. Science *278*, 419-424.

Lang,C.H., Hong-Brown,L., and Frost,R.A. (2005). Cytokine inhibition of JAK-STAT signaling: a new mechanism of growth hormone resistance. Pediatr. Nephrol. *20*, 306-312.

Lansdorp,P.M., Verwoerd,N.P., van de Rijke,F.M., Dragowska,V., Little,M.T., Dirks,R.W., Raap,A.K., and Tanke,H.J. (1996). Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. Hum. Mol. Genet. *5*, 685-691.

Lavoie,J.N., L'Allemain,G., Brunet,A., Muller,R., and Pouyssegur,J. (1996). Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. J. Biol. Chem. *271*, 20608-20616.

Lechel,A., Satyanarayana,A., Ju,Z., Plentz,R.R., Schaetzlein,S., Rudolph,C., Wilkens,L., Wiemann,S.U., Saretzki,G., Malek,N.P., Manns,M.P., Buer,J., and Rudolph,K.L. (2005). The cellular level of telomere dysfunction determines induction of senescence or apoptosis in vivo. EMBO Rep. *6*, 275-281.

Lichtman,M.A. and Rowe,J.M. (2004). The relationship of patient age to the pathobiology of the clonal myeloid diseases. Semin. Oncol. *31*, 185-197.

Lieschke,G.J., Grail,D., Hodgson,G., Metcalf,D., Stanley,E., Cheers,C., Fowler,K.J., Basu,S., Zhan,Y.F., and Dunn,A.R. (1994). Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. Blood *84*, 1737-1746.

Lipski,P.S., Bennett,M.K., Kelly,P.J., and James,O.F. (1992). Ageing and duodenal morphometry. J. Clin. Pathol. *45*, 450-452.

Liu,Z. and Cao,W. (2009). p38 mitogen-activated protein kinase: a critical node linking insulin resistance and cardiovascular diseases in type 2 diabetes mellitus. Endocr. Metab Immune. Disord. Drug Targets. *9*, 38-46.

Lotem,J. and Sachs,L. (2002). Cytokine control of developmental programs in normal hematopoiesis and leukemia. Oncogene *21*, 3284-3294.

Ma,W., Lim,W., Gee,K., Aucoin,S., Nandan,D., Kozlowski,M., Diaz-Mitoma,F., and Kumar,A. (2001). The p38 mitogen-activated kinase pathway regulates the human interleukin-10 promoter via the activation of Sp1 transcription factor in lipopolysaccharide-stimulated human macrophages. J. Biol. Chem. *276*, 13664-13674.

Maes,M., Maiter,D., Thissen,J.P., Underwood,L.E., and Ketelslegers,J.M. (1991). Contributions of growth hormone receptor and postreceptor defects to growth hormone resistance in malnutrition. Trends Endocrinol. Metab *2*, 92-97.

Manke,I.A., Nguyen,A., Lim,D., Stewart,M.Q., Elia,A.E., and Yaffe,M.B. (2005). MAPKAP kinase-2 is a cell cycle checkpoint kinase that regulates the G2/M transition and S phase progression in response to UV irradiation. Mol. Cell *17*, 37-48.

Matsuda,T. and Hirano,T. (2000). IL-6. In Cytokine Reference, A Compendium of Cytokines and Other Mediators of Host Defense, J.J.Oppenheim and M.Feldman, eds. (New York: Academic Press).

Merad,M. and Manz,M.G. (2009). Dendritic cell homeostasis. Blood *113*, 3418-3427.

Misri,S., Pandita,S., Kumar,R., and Pandita,T.K. (2008). Telomeres, histone code, and DNA damage response. Cytogenet. Genome Res. *122*, 297-307.

Missios,P., von Figura,G., Guachalla,L.M., Gompf,A., Song,Z., Boehm,B.O., and Rudolph,K.L. (2010). Intestinal failure in telomere-dysfunctional mice limits survival and induces metabolic profiles of caloric-restricted and long lived animals. Unpublished Work.

Moller,N. and Jorgensen,J.O. (2009). Effects of growth hormone on glucose, lipid, and protein metabolism in human subjects. Endocr. Rev. *30*, 152-177.

Montecino-Rodriguez,E. and Dorshkind,K. (2006). Evolving patterns of lymphopoiesis from embryogenesis through senescence. Immunity. *24*, 659-662.

Morley,J.E. (2001). Decreased food intake with aging. J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci. *56 Spec No 2*, 81-88.

Mowe,M., Bohmer,T., and Kindt,E. (1994). Reduced nutritional status in an elderly population (> 70 y) is probable before disease and possibly contributes to the development of disease. Am. J. Clin. Nutr. *59*, 317-324.

Muller-Sieburg,C.E., Cho,R.H., Karlsson,L., Huang,J.F., and Sieburg,H.B. (2004). Myeloid-biased hematopoietic stem cells have extensive self-renewal capacity but generate diminished lymphoid progeny with impaired IL-7 responsiveness. Blood *103*, 4111-4118.

Nagasawa,T. (2006). Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. Nat. Rev. Immunol. *6*, 107-116.

Nalapareddy,K., Choudhury,A.R., Gompf,A., Ju,Z., Ravipati,S., Leucht,T., Lechel,A., and Rudolph,K.L. (2010). CHK2-independent induction of telomere dysfunction checkpoints in stem and progenitor cells. EMBO Rep. *11*, 619-625.

Neininger,A., Kontoyiannis,D., Kotlyarov,A., Winzen,R., Eckert,R., Volk,H.D., Holtmann,H., Kollias,G., and Gaestel,M. (2002). MK2 targets AU-rich elements and regulates biosynthesis of tumor necrosis factor and interleukin-6 independently at different post-transcriptional levels. J. Biol. Chem. *277*, 3065-3068.

Nervi,B., Link,D.C., and DiPersio,J.F. (2006). Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization. J. Cell Biochem. *99*, 690-705.

Nichols,W.S., Schneider,S., Chan,R.C., Farthing,C.F., and Daar,E.S. (1999). Increased CD4+ T-lymphocyte senescence fraction in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection. Scand. J. Immunol. *49*, 302-306.

Niedernhofer,L.J., Garinis,G.A., Raams,A., Lalai,A.S., Robinson,A.R., Appeldoorn,E., Odijk,H., Oostendorp,R., Ahmad,A., van,L.W., Theil,A.F., Vermeulen,W., van der Horst,G.T., Meinecke,P., Kleijer,W.J., Vijg,J., Jaspers,N.G., and Hoeijmakers,J.H. (2006). A new progeroid syndrome reveals that genotoxic stress suppresses the somatotroph axis. Nature *444*, 1038-1043.

Nishimoto,N. (2010). Interleukin-6 as a therapeutic target in candidate inflammatory diseases. Clin. Pharmacol. Ther. *87*, 483-487.

Norrback,K.F. and Roos,G. (1997). Telomeres and telomerase in normal and malignant haematopoietic cells. Eur. J. Cancer *33*, 774-780.

Noursadeghi,M., Pepys,M.B., Gallimore,R., and Cohen,J. (2005). Relationship of granulocyte colony stimulating factor with other acute phase reactants in man. Clin. Exp. Immunol. *140*, 97-100.

O'Connor,J.C., McCusker,R.H., Strle,K., Johnson,R.W., Dantzer,R., and Kelley,K.W. (2008). Regulation of IGF-I function by proinflammatory cytokines: at the interface of immunology and endocrinology. Cell Immunol. *252*, 91-110.

O'Malley,D.P. (2007). Benign extramedullary myeloid proliferations. Mod. Pathol. *20*, 405-415.

O'Malley,D.P., Kim,Y.S., Perkins,S.L., Baldridge,L., Juliar,B.E., and Orazi,A. (2005). Morphologic and immunohistochemical evaluation of splenic hematopoietic proliferations in neoplastic and benign disorders. Mod. Pathol. *18*, 1550-1561.

Park,J.K., Ronkina,N., Hoft,A., Prohl,C., Menne,J., Gaestel,M., Haller,H., and Meier,M. (2008). Deletion of MK2 signalling in vivo inhibits small Hsp phosphorylation but not diabetic nephropathy. Nephrol. Dial. Transplant. *23*, 1844-1853.

Parlesak,A., Klein,B., Schecher,K., Bode,J.C., and Bode,C. (2003). Prevalence of small bowel bacterial overgrowth and its association with nutrition intake in nonhospitalized older adults. J. Am. Geriatr. Soc. *51*, 768-773.

Petit,I., Szyper-Kravitz,M., Nagler,A., Lahav,M., Peled,A., Habler,L., Ponomaryov,T., Taichman,R.S., Arenzana-Seisdedos,F., Fujii,N., Sandbank,J., Zipori,D., and Lapidot,T. (2002). G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. Nat. Immunol. *3*, 687-694.

Picardi,M., De,R.G., Selleri,C., Scarpato,N., Soscia,E., Martinelli,V., Ciancia,R., and Rotoli,B. (2003). Spleen enlargement following recombinant human granulocyte colony-stimulating factor administration for peripheral blood stem cell mobilization. Haematologica *88*, 794-800.

Pignolo,R.J., Suda,R.K., McMillan,E.A., Shen,J., Lee,S.H., Choi,Y., Wright,A.C., and Johnson,F.B. (2008). Defects in telomere maintenance molecules impair osteoblast differentiation and promote osteoporosis. Aging Cell *7*, 23-31.

Platzbecker,U., Prange-Krex,G., Bornhauser,M., Koch,R., Soucek,S., Aikele,P., Haack,A., Haag,C., Schuler,U., Berndt,A., Rutt,C., Ehninger,G., and Holig,K. (2001). Spleen enlargement in healthy donors during G-CSF mobilization of PBPCs. Transfusion *41*, 184-189.

Porter,E.M., Bevins,C.L., Ghosh,D., and Ganz,T. (2002). The multifaceted Paneth cell. Cell Mol. Life Sci. *59*, 156-170.

Rajaraman,S., Choi,J., Cheung,P., Beaudry,V., Moore,H., and Artandi,S.E. (2007). Telomere uncapping in progenitor cells with critical telomere shortening is coupled to S-phase progression in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *104*, 17747-17752.

Rausch,O. and Marshall,C.J. (1999). Cooperation of p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways during granulocyte colony-stimulating factor-induced hemopoietic cell proliferation. J. Biol. Chem. *274*, 4096-4105.

Reiling,N., Blumenthal,A., Flad,H.D., Ernst,M., and Ehlers,S. (2001). Mycobacteria-induced TNF-alpha and IL-10 formation by human macrophages is differentially regulated at the level of mitogen-activated protein kinase activity. J. Immunol. *167*, 3339-3345.

Reinhardt,H.C., Aslanian,A.S., Lees,J.A., and Yaffe,M.B. (2007). p53-deficient cells rely on ATM- and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage. Cancer Cell *11*, 175-189.

Reinhardt,H.C. and Yaffe,M.B. (2009). Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2. Curr. Opin. Cell Biol. *21*, 245-255.

Rennick,D.M., Fort,M.M., and Davidson,N.J. (1997). Studies with IL-10-/- mice: an overview. J. Leukoc. Biol. *61*, 389-396.

Riepe,S.P., Goldstein,J., and Alpers,D.H. (1980). Effect of secreted Bacteroides proteases on human intestinal brush border hydrolases. J. Clin. Invest *66*, 314-322.

Riha,K., Heacock,M.L., and Shippen,D.E. (2006). The role of the nonhomologous end-joining DNA double-strand break repair pathway in telomere biology. Annu. Rev. Genet. *40*, 237-277.

Risques,R.A., Lai,L.A., Brentnall,T.A., Li,L., Feng,Z., Gallaher,J., Mandelson,M.T., Potter,J.D., Bronner,M.P., and Rabinovitch,P.S. (2008). Ulcerative colitis is a disease of accelerated colon aging: evidence from telomere attrition and DNA damage. Gastroenterology *135*, 410-418.

Rodier,F., Coppe,J.P., Patil,C.K., Hoeijmakers,W.A., Munoz,D.P., Raza,S.R., Freund,A., Campeau,E., Davalos,A.R., and Campisi,J. (2009). Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. Nat. Cell Biol. *11*, 973-979.

Ronkina,N., Kotlyarov,A., Dittrich-Breiholz,O., Kracht,M., Hitti,E., Milarski,K., Askew,R., Marusic,S., Lin,L.L., Gaestel,M., and Telliez,J.B. (2007). The mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinases MK2 and MK3 cooperate in stimulation of tumor necrosis factor biosynthesis and stabilization of p38 MAPK. Mol. Cell Biol. *27*, 170-181.

Roux,P.P. and Blenis,J. (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. Microbiol. Mol. Biol. Rev. *68*, 320-344.

Rudolph,K.L., Chang,S., Lee,H.W., Blasco,M., Gottlieb,G.J., Greider,C., and DePinho,R.A. (1999). Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. Cell *96*, 701-712.

Rudolph,K.L., Hartmann,D., Illing,A., Ju,Z., Song,Z., Geiger,H., Gompf,A., Sperka,T., Tümpel,S., Guachalla,L.M., and Nalapareddy,K. (2010). Molecular Mechanisms of Adult Stem Cell Aging. (Basel: S. Karger).

Rufer,N., Brummendorf,T.H., Kolvraa,S., Bischoff,C., Christensen,K., Wadsworth,L., Schulzer,M., and Lansdorp,P.M. (1999). Telomere fluorescence measurements in granulocytes and T lymphocyte subsets point to a high turnover of hematopoietic stem cells and memory T cells in early childhood. J. Exp. Med. *190*, 157-167.

Russell,S.J. and Kahn,C.R. (2007). Endocrine regulation of ageing. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *8*, 681-691.

Ruzankina,Y., Schoppy,D.W., Asare,A., Clark,C.E., Vonderheide,R.H., and Brown,E.J. (2009). Tissue regenerative delays and synthetic lethality in adult mice after combined deletion of Atr and Trp53. Nat. Genet. *41*, 1144-1149.

San Miguel,S.M., Namdar-Attar,M., Noh,T., Frenkel,B., and Bab,I. (2005). ERK1/2-activated de novo Mapkapk2 synthesis is essential for osteogenic growth peptide mitogenic signaling in osteoblastic cells. J. Biol. Chem. *280*, 37495-37502.

Sancar,A., Lindsey-Boltz,L.A., Unsal-Kacmaz,K., and Linn,S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. Annu. Rev. Biochem. *73*, 39-85.

Sasaki-Suzuki,N., Arai,K., Ogata,T., Kasahara,K., Sakoda,H., Chida,K., Asano,T., Pessin,J.E., Hakuno,F., and Takahashi,S. (2009). Growth hormone inhibition of glucose uptake in adipocytes occurs without affecting GLUT4 translocation through an insulin receptor substrate-2-phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. J. Biol. Chem. *284*, 6061-6070.

Satyanarayana,A., Wiemann,S.U., Buer,J., Lauber,J., Dittmar,K.E., Wustefeld,T., Blasco,M.A., Manns,M.P., and Rudolph,K.L. (2003). Telomere shortening impairs organ regeneration by inhibiting cell cycle re-entry of a subpopulation of cells. EMBO J. *22*, 4003-4013.

Schaefer,F., Chen,Y., Tsao,T., Nouri,P., and Rabkin,R. (2001). Impaired JAK-STAT signal transduction contributes to growth hormone resistance in chronic uremia. J. Clin. Invest *108*, 467-475.

Schaetzlein,S., Kodandaramireddy,N.R., Ju,Z., Lechel,A., Stepczynska,A., Lilli,D.R., Clark,A.B., Rudolph,C., Kuhnel,F., Wei,K., Schlegelberger,B., Schirmacher,P., Kunkel,T.A., Greenberg,R.A., Edelmann,W., and Rudolph,K.L. (2007). Exonuclease-1 deletion impairs DNA damage signaling and prolongs lifespan of telomere-dysfunctional mice. Cell *130*, 863-877.

Schonhoff,S.E., Giel-Moloney,M., and Leiter,A.B. (2004). Minireview: Development and differentiation of gut endocrine cells. Endocrinology *145*, 2639-2644.

Schottelius,A.J., Zugel,U., Docke,W.D., Zollner,T.M., Rose,L., Mengel,A., Buchmann,B., Becker,A., Grutz,G., Naundorf,S., Friedrich,A., Gaestel,M., and Asadullah,K. (2010). The role of mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 in the p38/TNF-alpha pathway of systemic and cutaneous inflammation. J. Invest Dermatol. *130*, 481-491.

Schwermann,J., Rathinam,C., Schubert,M., Schumacher,S., Noyan,F., Koseki,H., Kotlyarov,A., Klein,C., and Gaestel,M. (2009). MAPKAP kinase MK2 maintains self-renewal capacity of haematopoietic stem cells. EMBO J. *28*, 1392-1406.

Sharpless,N.E. and DePinho,R.A. (2004). Telomeres, stem cells, senescence, and cancer. J. Clin. Invest *113*, 160-168.

Sharpless,N.E. and DePinho,R.A. (2007). How stem cells age and why this makes us grow old. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *8*, 703-713.

Shay,J.W. and Bacchetti,S. (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. Eur. J. Cancer *33*, 787-791.

Shay,J.W., Wright,W.E., and Werbin,H. (1991). Defining the molecular mechanisms of human cell immortalization. Biochim. Biophys. Acta *1072*, 1-7.

She,Q.B., Ma,W.Y., and Dong,Z. (2002). Role of MAP kinases in UVB-induced phosphorylation of p53 at serine 20. Oncogene *21*, 1580-1589.

Singh,S., Powell,D.W., Rane,M.J., Millard,T.H., Trent,J.O., Pierce,W.M., Klein,J.B., Machesky,L.M., and McLeish,K.R. (2003). Identification of the p16-Arc subunit of the Arp 2/3 complex as a substrate of MAPK-activated protein kinase 2 by proteomic analysis. J. Biol. Chem. *278*, 36410-36417.

Slijepcevic,P. (2006). The role of DNA damage response proteins at telomeres--an "integrative" model. DNA Repair (Amst) *5*, 1299-1306.

Stokoe,D., Campbell,D.G., Nakielny,S., Hidaka,H., Leevers,S.J., Marshall,C., and Cohen,P. (1992). MAPKAP kinase-2; a novel protein kinase activated by mitogen-activated protein kinase. EMBO J. *11*, 3985-3994.

Stroncek,D., Shawker,T., Follmann,D., and Leitman,S.F. (2003). G-CSF-induced spleen size changes in peripheral blood progenitor cell donors. Transfusion *43*, 609-613.

Sturlan,S., Oberhuber,G., Beinhauer,B.G., Tichy,B., Kappel,S., Wang,J., and Rogy,M.A. (2001). Interleukin-10-deficient mice and inflammatory bowel disease associated cancer development. Carcinogenesis *22*, 665-671.

Takai,H., Smogorzewska,A., and de,L.T. (2003). DNA damage foci at dysfunctional telomeres. Curr. Biol. *13*, 1549-1556.

Takenaka,K., Moriguchi,T., and Nishida,E. (1998). Activation of the protein kinase p38 in the spindle assembly checkpoint and mitotic arrest. Science *280*, 599-602.

Tamura,K., Sudo,T., Senftleben,U., Dadak,A.M., Johnson,R., and Karin,M. (2000). Requirement for p38alpha in erythropoietin expression: a role for stress kinases in erythropoiesis. Cell *102*, 221-231.

Tang,J., Yang,X., and Liu,X. (2008). Phosphorylation of Plk1 at Ser326 regulates its functions during mitotic progression. Oncogene *27*, 6635-6645.

Taylor,P.R., Martinez-Pomares,L., Stacey,M., Lin,H.H., Brown,G.D., and Gordon,S. (2005). Macrophage receptors and immune recognition. Annu. Rev. Immunol. *23*, 901-944.

Thomas,D., Vadas,M., and Lopez,A. (2004). Regulation of haematopoiesis by growth factors - emerging insights and therapies. Expert. Opin. Biol. Ther. *4*, 869-879.

Thomas,G.M., Haavik,J., and Cohen,P. (1997). A stress-activated kinase cascade can mediate the activation of tyrosine hydroxylase in chromaffin cells. Biochem. Soc. Trans. *25*, S571.

Thornton,T.M. and Rincon,M. (2009). Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival. Int. J. Biol. Sci. *5*, 44-51.

Tonshoff,B., Eden,S., Weiser,E., Carlsson,B., Robinson,I.C., Blum,W.F., and Mehls,O. (1994). Reduced hepatic growth hormone (GH) receptor gene expression and increased plasma GH binding protein in experimental uremia. Kidney Int. *45*, 1085-1092.

Toska,K., Kleppe,R., Cohen,P., and Haavik,J. (2002). Phosphorylation of tyrosine hydroxylase in isolated mice adrenal glands. Ann. N. Y. Acad. Sci. *971*, 66-68.

Trbojevic-Stankovic,J.B., Milicevic,N.M., Milosevic,D.P., Despotovic,N., Davidovic,M., Erceg,P., Bojic,B., Bojic,D., Svorcan,P., Protic,M., Dapcevic,B., Miljkovic,M.D., and Milicevic,Z. (2010). Morphometric study of healthy jejunal and ileal mucosa in adult and aged subjects. Histol. Histopathol. *25*, 153-158.

Tudor,C., Marchese,F.P., Hitti,E., Aubareda,A., Rawlinson,L., Gaestel,M., Blackshear,P.J., Clark,A.R., Saklatvala,J., and Dean,J.L. (2009). The p38 MAPK pathway inhibits tristetraprolin-directed decay of interleukin-10 and pro-inflammatory mediator mRNAs in murine macrophages. FEBS Lett. *583*, 1933-1938.

Turban,S., Beardmore,V.A., Carr,J.M., Sakamoto,K., Hajduch,E., Arthur,J.S., and Hundal,H.S. (2005). Insulin-stimulated glucose uptake does not require p38 mitogen-activated protein kinase in adipose tissue or skeletal muscle. Diabetes *54*, 3161-3168.

Uddin,S., Ah-Kang,J., Ulaszek,J., Mahmud,D., and Wickrema,A. (2004). Differentiation stage-specific activation of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms in primary human erythroid cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *101*, 147-152.

Valdes,A.M., Richards,J.B., Gardner,J.P., Swaminathan,R., Kimura,M., Xiaobin,L., Aviv,A., and Spector,T.D. (2007). Telomere length in leukocytes correlates with bone mineral density and is shorter in women with osteoporosis. Osteoporos. Int. *18*, 1203-1210.

van der Flier,L.G. and Clevers,H. (2009). Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. Annu. Rev. Physiol *71*, 241-260.

Vulliamy,T., Marrone,A., Dokal,I., and Mason,P.J. (2002). Association between aplastic anaemia and mutations in telomerase RNA. Lancet *359*, 2168-2170.

Vulliamy,T., Marrone,A., Goldman,F., Dearlove,A., Bessler,M., Mason,P.J., and Dokal,I. (2001). The RNA component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenita. Nature *413*, 432-435.

Vulliamy,T.J., Marrone,A., Knight,S.W., Walne,A., Mason,P.J., and Dokal,I. (2006). Mutations in dyskeratosis congenita: their impact on telomere length and the diversity of clinical presentation. Blood *107*, 2680-2685.

Vulliamy,T.J., Walne,A., Baskaradas,A., Mason,P.J., Marrone,A., and Dokal,I. (2005). Mutations in the reverse transcriptase component of telomerase (TERT) in patients with bone marrow failure. Blood Cells Mol. Dis. *34*, 257-263.

Warren,L.A. and Rossi,D.J. (2009). Stem cells and aging in the hematopoietic system. Mech. Ageing Dev. *130*, 46-53.

Weber,H.O., Ludwig,R.L., Morrison,D., Kotlyarov,A., Gaestel,M., and Vousden,K.H. (2005). HDM2 phosphorylation by MAPKAP kinase 2. Oncogene *24*, 1965-1972.

Welte,K., Gabrilove,J., Bronchud,M.H., Platzer,E., and Morstyn,G. (1996). Filgrastim (r-metHuG-CSF): the first 10 years. Blood *88*, 1907-1929.

Werz,O., Klemm,J., Samuelsson,B., and Radmark,O. (2000). 5-lipoxygenase is phosphorylated by p38 kinase-dependent MAPKAP kinases. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *97*, 5261-5266.

Werz,O., Szellas,D., Steinhilber,D., and Radmark,O. (2002). Arachidonic acid promotes phosphorylation of 5-lipoxygenase at Ser-271 by MAPK-activated protein kinase 2 (MK2). J. Biol. Chem. *277*, 14793-14800.

Wilmer,W.A., Dixon,C.L., and Hebert,C. (2001). Chronic exposure of human mesangial cells to high glucose environments activates the p38 MAPK pathway. Kidney Int. *60*, 858-871.

Wilson,A. and Trumpp,A. (2006). Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. Nat. Rev. Immunol. *6*, 93-106.

Winzen,R., Kracht,M., Ritter,B., Wilhelm,A., Chen,C.Y., Shyu,A.B., Muller,M., Gaestel,M., Resch,K., and Holtmann,H. (1999). The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism. EMBO J. *18*, 4969-4980.

Wood,C.D., Thornton,T.M., Sabio,G., Davis,R.A., and Rincon,M. (2009). Nuclear localization of p38 MAPK in response to DNA damage. Int. J. Biol. Sci. *5*, 428-437.

Wright,W.E. and Shay,J.W. (1992). The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization. Exp. Gerontol. *27*, 383-389.

Wu,G.S. (2004). The functional interactions between the p53 and MAPK signaling pathways. Cancer Biol. Ther. *3*, 156-161.

Wu,J.J., Roth,R.J., Anderson,E.J., Hong,E.G., Lee,M.K., Choi,C.S., Neufer,P.D., Shulman,G.I., Kim,J.K., and Bennett,A.M. (2006). Mice lacking MAP kinase phosphatase-1 have enhanced MAP kinase activity and resistance to diet-induced obesity. Cell Metab *4*, 61-73.

Xiong,Y., Collins,Q.F., An,J., Lupo E Jr, Liu,H.Y., Liu,D., Robidoux,J., Liu,Z., and Cao,W. (2007). p38 mitogen-activated protein kinase plays an inhibitory role in hepatic lipogenesis. J. Biol. Chem. *282*, 4975-4982.

Yamaguchi,H., Calado,R.T., Ly,H., Kajigaya,S., Baerlocher,G.M., Chanock,S.J., Lansdorp,P.M., and Young,N.S. (2005). Mutations in TERT, the gene for telomerase reverse transcriptase, in aplastic anemia. N. Engl. J. Med. *352*, 1413-1424.

Yamanishi,T., Yamamoto,Y., Hatakeyama,T., Yamaguchi,K., and Oda,T. (2007). CEL-I, an invertebrate N-acetylgalactosamine-specific C-type lectin, induces TNF-alpha and G-CSF production by mouse macrophage cell line RAW264.7 cells. J. Biochem. *142*, 587-595.

Yang,L., Bryder,D., Adolfsson,J., Nygren,J., Mansson,R., Sigvardsson,M., and Jacobsen,S.E. (2005). Identification of Lin(-)Sca1(+)kit(+)CD34(+)Flt3- short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients. Blood *105*, 2717-2723.

Yannoni,Y.M., Gaestel,M., and Lin,L.L. (2004). P66(ShcA) interacts with MAPKAP kinase 2 and regulates its activity. FEBS Lett. *564*, 205-211.

Yu,X., Riley,T., and Levine,A.J. (2009). The regulation of the endosomal compartment by p53 the tumor suppressor gene. FEBS J. *276*, 2201-2212.

Yuan,J., Xu,B.Z., Qi,S.T., Tong,J.S., Wei,L., Li,M., Ouyang,Y.C., Hou,Y., Schatten,H., and Sun,Q.Y. (2010). MAPK-activated protein kinase 2 is required for mouse meiotic spindle assembly and kinetochore-microtubule attachment. PLoS. One. *5*, e11247.

Yuan,X., Ishibashi,S., Hatakeyama,S., Saito,M., Nakayama,J., Nikaido,R., Haruyama,T., Watanabe,Y., Iwata,H., Iida,M., Sugimura,H., Yamada,N., and Ishikawa,F. (1999). Presence of telomeric G-strand tails in the telomerase catalytic subunit TERT knockout mice. Genes Cells *4*, 563-572.

Zaru,R., Ronkina,N., Gaestel,M., Arthur,J.S., and Watts,C. (2007). The MAPK-activated kinase Rsk controls an acute Toll-like receptor signaling response in dendritic cells and is activated through two distinct pathways. Nat. Immunol. *8*, 1227-1235.

Zender,L. and Rudolph,K.L. (2009). Keeping your senescent cells under control. Aging (Albany. NY) *1*, 438-441.

Zhu,J. and Emerson,S.G. (2002). Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. Oncogene *21*, 3295-3313.

Zijlmans,J.M., Martens,U.M., Poon,S.S., Raap,A.K., Tanke,H.J., Ward,R.K., and Lansdorp,P.M. (1997). Telomeres in the mouse have large inter-chromosomal variations in the number of T2AG3 repeats. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *94*, 7423-7428.

Zou,Y., Sfeir,A., Gryaznov,S.M., Shay,J.W., and Wright,W.E. (2004). Does a sentinel or a subset of short telomeres determine replicative senescence? Mol. Biol. Cell *15*, 3709-3718.

7. Publikationsliste

Artikel

Ju,Z., Jiang,H., Jaworski,M., Rathinam,C., Gompf,A., Klein,C., Trumpp,A., and Rudolph,K.L. (2007). Telomere dysfunction induces environmental alterations limiting hematopoietic stem cell function and engraftment. Nat. Med. *13*, 742-747.

Missios,P., von Figura,G., Guachalla,L.M., Gompf,A., Song,Z., Boehm,B.O., and Rudolph,K.L. (2010). Intestinal failure in telomere-dysfunctional mice limits survival and induces metabolic profiles of caloric-restricted and long lived animals. Unpublished Work.

Nalapareddy,K., Choudhury,A.R., Gompf,A., Ju,Z., Ravipati,S., Leucht,T., Lechel,A., and Rudolph,K.L. (2010). CHK2-independent induction of telomere dysfunction checkpoints in stem and progenitor cells. EMBO Rep. *11*, 619-625.

Sindrilaru,A., Peters,T., Schymeinsky,J., Oreshkova,T., Wang,H., Gompf,A., Mannella,F., Wlaschek,M., Sunderkotter,C., Rudolph,K.L., Walzog,B., Bustelo,X.R., Fischer,K.D., and Scharffetter-Kochanek,K. (2009). Wound healing defect of Vav3-/- mice due to impaired {beta}2-integrin-dependent macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils. Blood *113*, 5266-5276.

Buchkapitel

Gompf,A. (2010). Aging and Hematopoietic Malignancies. In Molecular Mechanisms of Adult Stem Cell Aging, K.L.Rudolph, ed. (Basel: S. Karger).

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. K. L. Rudolph für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Doktorarbeit in seiner Gruppe, die Überlassung des Themas und der Betreuung der Arbeit bedanken.
Prof. Dr. M. P. Manns danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in der Abteilung Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie der Medizinischen Hochschule Hannover im ersten Jahr meiner Doktorarbeit. Für die herzliche Aufnahme ins MD/PhD-Programm Molekulare Medizin der Medizinischen Hochschule Hannover sowie für die Organisation sowohl von Seminaren als auch von Freizeitaktivitäten möchte ich mich ganz besonders bei Dr. Susanne Kruse und Marlies Daniel vom MD/PhD-Büro bedanken. Den Kooperationspartnern Prof. Dr. M. Gaestel und Dr. A. Kotlyarov an der Medizinischen Hochschule Hannover danke ich für die Überlassung der *MK2*-Knockout-Maus.
Für die Unterstützung mit Gerät und Material vor allem in der Anfangszeit nach dem Umzug der Gruppe Rudolph von Hannover nach Ulm möchte ich mich bei der Gruppe von Prof. Dr. T. Wirth und der Gruppe von Prof. Dr. H. R. Rodewald bedanken. Ein herzlicher Dank für die Erleichterung des Laboraufbaus geht an dieser Stelle auch an unsere in Ulm zu uns gestoßene Sekretärin Fe Bauer.
Ich danke allen MitarbeiterInnen der Arbeitsgruppe Rudolph für die methodischen Ratschläge und die Hilfe bei Experimenten, vor allem Dr. Zhenju Ju für meine Ausbildung in hämatopoetischen Methoden, Dr. Yvonne Begus-Nahrmann für die tatkräftige Hilfe bei der Aufbereitung von Organen und die abendliche Motivierung, Dr. Luis Guachalla, Dr. Guido von Figura und Pavlos Missios für die Mitarbeit an der Untersuchung metabolischer Parameter. Ganz spezieller Dank gilt auch Dr. Daniel Hartmann für das Verbreiten guter Laune und Dr. André Lechel für seine unendliche Geduld. Dr. Yvonne Begus-Nahrmann, Dr. Anett Illing, Dr. Tobias Sperka und Dr. Martin Burkhalter möchte ich für das Korrekturlesen meiner Dissertation ganz herzlich danken. Ein großes Dankeschön geht auch an alle Technischen Assistentinnen, ganz besonders aber an Elvira Peit für ihre unermüdliche Hilfe, ohne die so mancher Tag zur Nacht geworden wäre.
Zuletzt möchte ich meiner Mutter Christine danken, die mir mit ihrer aufopferungsvollen Unterstützung diesen Bildungsweg erst ermöglicht hat, sowie meinem Bruder Andreas, seiner Frau Cathérine und meinem Freund Michael für die Zerstreuung.