

Aus dem  
Institut für Translationale Pharmakologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Maria Grandoch

# **Klonale Hämatopoese in experimentell- induzierter Kolitis**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-  
Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Luca Stephan Rolauer**

aus Lünen

Düsseldorf, Oktober 2023

aus dem Institut für Translationale Pharmakologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. med. Maria Grandoch  
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Jörg Breikreutz  
Tag der mündlichen Prüfung: 07.03.2024

**Für meine Eltern Andrea und Knut,  
die mir die richtigen Werte für meinen Lebensweg mitgegeben haben.**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungen.....</b>	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Klonale Hämatopoese .....	1
1.1.1 CH und hämatologische Erkrankungen.....	3
1.1.2 CH und Stoffwechselerkrankungen.....	3
1.1.3 CH und kardiovaskuläre Erkrankungen .....	4
1.1.4 CH und chronisch-entzündliche Erkrankungen.....	5
1.2 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen .....	6
1.2.1 Ätiologie der CED.....	6
1.2.2 Die Schleimhautbarriere.....	7
1.2.3 Therapie der CED.....	7
1.2.4 Extraintestinale Manifestationen der CED.....	9
1.2.5 Die Rolle der circadianen Rhythmik in der Pathophysiologie der CED .....	10
1.3 CH und CED .....	11
1.3.1 Der Einfluss chronischer Entzündungen auf die Hämatopoese .....	11
1.3.2 Treiber-Gene chronisch-entzündlicher Erkrankungen .....	12
1.3.2.1 DNMT3A.....	13
1.3.2.2 TET2 .....	14
1.3.2.3 TP53.....	14
1.3.2.4 PPM1D .....	15
1.4 Ziele dieser Arbeit.....	15
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>18</b>
2.1 Arbeitsmittel.....	18
2.1.1 Feststoffe und Lösungen .....	18
2.1.2 Material.....	19
2.1.3 Geräte .....	20
2.1.4 Programme .....	20
2.1.5 Hersteller .....	21
2.2 Tierversuche im Mausmodell.....	21
2.2.1 Auswahl der Mausmodelle.....	21
2.2.2 Experimentell-induzierte chronische Kolitis.....	22



2.2.3	Myeloablativer Knochenmarkstransfer .....	24
2.2.4	Adoptiver Knochenmarkstransfer .....	25
2.2.5	Organpräparation.....	26
2.3	Histologie .....	27
2.3.1	Gewebeaufbereitung.....	27
2.3.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	27
2.3.3	Öl-Rot-O-Färbung .....	28
2.4	Durchflusszytometrie .....	28
2.4.1	Identifizierung der im Blut zirkulierenden Leukozyten .....	31
2.4.2	Identifizierung der zirkulierenden sowie knochenmarksresidenten Leukozyten .....	31
2.4.3	Identifizierung der knochenmarksresidenten, hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen .....	33
2.4.4	Identifizierung der klonalen Expansion im Blut .....	35
2.4.5	Identifizierung der klonalen Expansion im Knochenmark.....	37
2.4.6	Identifizierung der klonalen Expansion im Kolongewebe .....	39
2.5	Zellkultur.....	41
2.5.1	Isolation der Knochenmarksmonozyten und -neutrophilen .....	41
2.6	Molekularbiologische Techniken.....	41
2.6.1	Sanger Sequenzierung knochenmarksisolierter Immunzellen.....	41
2.6.2	RNS-Extraktion .....	42
2.6.3	Reverse Transkription .....	43
2.6.4	Quantitative Polymerase-Ketten Reaktion .....	43
2.6.5	ELISA von Inflammationsmarkern .....	44
2.7	Statistische Auswertung.....	44
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>45</b>
3.1	Experimentell-induzierte Kolitis in C57BL/6J und <i>ApoE</i> -defizienten Mäusen ...	45
3.1.1	Bewertung des Schweregrads anhand des Gewichtsverlaufs.....	45
3.1.2	Veränderung der Kolonmorphologie im Verlauf der chronischen Kolitis....	46
3.1.3	Beeinflussung der circadianen Rhythmik unter Einfluss einer chronischen Kolitis .....	47
3.2	Einfluss der chronischen Kolitis auf die Milz und Aorta.....	48
3.2.1	Milz .....	48
3.2.2	Aorta.....	49
3.3	Einfluss der chronischen Kolitis auf die Immunzellbildung.....	50

3.3.1	Zirkulierende Immunzellen .....	51
3.3.2	Knochenmarksresidente Immunzellen .....	52
3.3.3	Stamm- und Vorläuferzellen im Knochenmark .....	53
3.4	Wechselseitiger Einfluss einer chronischen Kolitis und der klonalen Hämatopoese .....	54
3.4.1	Einfluss der chronischen Kolitis auf die Entstehung somatischer <i>Ppm1d</i> Mutationen in reifen Knochenmarkszellen .....	54
3.4.2	Einfluss der chronischen Kolitis auf die klonale Expansion hämatologischer Treiber-Gene.....	55
3.4.2.1	Untersuchung im Modell des myeloablativen Knochenmarktransfers mit <i>Dnmt3a</i> und <i>Ppm1d</i> .....	56
3.4.2.2	Untersuchung im Modell des adoptiven Knochenmarktransfer mit <i>Tet2</i> 62	62
3.4.2.3	Untersuchung im Modell des adoptiven KMT mit <i>Tp53</i> .....	67
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>73</b>
4.1	Vergleichende Untersuchung einer experimentell-induzierten Kolitis in <i>C57BL/6J</i> und <i>ApoE</i> -defizienten Mäusen.....	73
4.2	Einfluss einer experimentell-induzierten Kolitis auf die myeloide Hämatopoese	77
4.3	Die Analyse der klonalen Expansion innerhalb akuter CED-Phasen .....	80
4.4	Die Analyse der CED im Zuge der klonalen Expansion.....	84
4.5	Offene Fragen und Ausblick .....	86
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>88</b>
<b>6</b>	<b>Summary .....</b>	<b>89</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>90</b>
<b>8</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>92</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>93</b>
<b>10</b>	<b>Originalarbeiten .....</b>	<b>105</b>
<b>11</b>	<b>Posterpräsentationen .....</b>	<b>106</b>
<b>12</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>107</b>
<b>13</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>108</b>
<b>14</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>109</b>

## Abkürzungen

5hmC	5-Hydroxymethylcytosin
5mC	5-Methylcytosin
ACUC	<i>Animal Care &amp; Use Committee</i>
AGM-Region	Aorto-gonadale-mesonephrische Region
AML	Akute myeloische Leukämie
AMPK	<i>Adenosine monophosphate-activated protein kinase</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
APOE	Apolipoprotein E
ARCH	<i>Age-related clonal hematopoiesis</i>
ASCVD	<i>Atherosclerotic cardiovascular disease</i>
ASXL1	<i>Additional sex combs-like 1</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated kinase</i>
BCR-ABL1	<i>Breakpoint cluster region-Abelson 1</i>
BMAL1	<i>Brain and muscle Arnt like protein 1</i>
BMI	<i>Body mass index</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CALR	Calcireticulin
CANTOS	<i>Canakinumab anti-inflammatory thrombosis outcomes</i>
CAS	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i>
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
CH	<i>Clonal hematopoiesis</i>
CHIP	<i>Clonal hematopoiesis of indeterminate potential</i>
CLOCK	<i>Circadian locomotor output cycles kaput</i>
CLP	<i>Common lymphoid progenitors</i>
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CMP	<i>Common myeloid progenitors</i>
CpG	Cytidin-Guanosin-Dinukleotid
CRP	C-reaktives Protein

---

CRY	<i>Cryptochrome</i>
CVD	<i>Cardiovascular disease</i>
CVRV	<i>Cardiovascular Research Center</i>
CXCR2	<i>CXC chemokine receptor 2</i>
DDR	<i>DNA damage-response proteins</i>
DNMT3A	<i>DNA methyltransferase 3 alpha</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSS	<i>Dextran sodium sulfate</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EIM	Extraintestinale Manifestation
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EZH2	<i>Enhancer of zeste homolog 2</i>
Fc	<i>Fragment crystallizable</i>
FLT3	<i>Fms-like tyrosine kinase 3</i>
FMO	<i>Fluorescence minus one</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
G-CSF	<i>Granulocyte-colony stimulating factor</i>
GIT	Gastrointestinaltrakt
GMP	<i>Granulocyte monocyte progenitors</i>
GPCR	<i>G-Protein-coupled receptor</i>
GOF	<i>Gain-of-function</i>
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
H&E	<i>Hematoxylin and eosin</i>
HHU	Heinrich-Heine-Universität
HSPC	<i>Hematopoietic stem and progenitor cells</i>
IBD	<i>Inflammatory bowel disease</i>
IEC	Intestinale Epithelzellen
IKZF1	<i>IKAROS family zinc finger 1</i>
IL	Interleukin
i.p.	Intraperitoneal
JAK2	<i>Janus kinase 2</i>

---

KHK	Koronare Herzkrankheit
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma virus</i>
KVE	Kardiovaskuläre Ereignisse
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LPS	Lymphoproliferatives Syndrom
LT-HSC	<i>Long term hematopoietic stem cells</i>
Ly6	<i>Lymphocyte antigen 6 complex locus</i>
MACS	<i>Magnetic cell separation</i>
MC	Morbus Crohn
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
MDN	Myeloproliferative Neoplasien
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MEP	<i>Megakaryocytic-erythroid progenitors</i>
MG	Molekulargewicht
MIP-1	<i>Macrophage inflammatory protein-1</i>
MPL	<i>Myeloproliferative leukemia virus</i>
MPP	<i>Multipotent progenitor group</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
NET	<i>Neutrophil extracellular traps</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NLRP3	<i>Nucleotide-binding domain-like receptor protein 3</i>
NOD	<i>Nucleotide oligomerisation domain-like receptor</i>
ORO	<i>Oil Red O</i>
PAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
P-Wert	<i>Probability value</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEB	<i>Protein extraction buffer</i>
PER2	<i>Period circadian regulator 2</i>
PPM1D	<i>Protein Phosphatase, Mg<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup> dependent 1D</i>

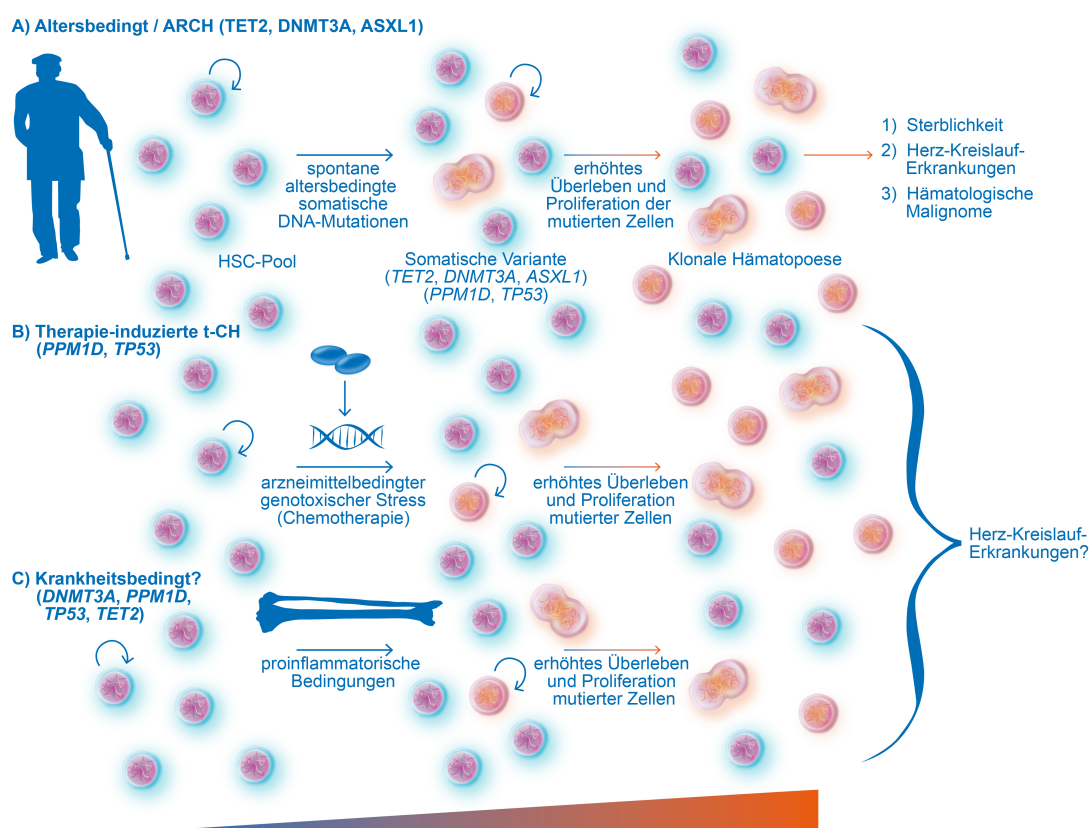
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
qRT-PCR	<i>Quantitative real-time reverse transcription PCR</i>
RBC	<i>Red blood cells</i>
RNS	Ribonukleinsäure
ROUT	<i>Robust regression and outlier removal</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
SD	<i>Standard deviation</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
ST-HSC	<i>Short term hematopoietic stem cells</i>
t-CH	<i>Therapy-related clonal hematopoiesis</i>
TET2	<i>Ten-eleven-translocation methylcytosine dioxygenase 2</i>
TLR	<i>TOLL-like receptor</i>
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor-alpha
TP53	<i>Tumor protein P53</i>
TRP53	<i>Transformation-related protein 53</i>
UV	Ultraviolett

# 1 Einleitung

## 1.1 Klonale Hämatopoese

Klonale Hämatopoese (*clonal hematopoiesis*, CH) beschreibt die Expansion von Subpopulationen einzelner Blutzellen im Kreislaufsystem und in peripheren, funktionellen Geweben, die mit dem Auftreten einer somatischen Mutation der Desoxyribonukleinsäure (DNS) verbunden sind<sup>1</sup>. Stark proliferierende Gewebe sind in diesem Zusammenhang besonders betroffen<sup>2,3</sup>. Die Entwicklung eines solchen Zellmosaiks stellt somit einen natürlichen Alterungsprozess dar. Im Unterschied zu den Tumorerkrankungen geht eine CH jedoch nicht zwangsläufig mit Veränderungen der Blutzellanzahl, wie es bei Neoplasien zu beobachten ist, einher<sup>4</sup>. Für dieses Phänomen wurde die Begrifflichkeit der klonalen Hämatopoese mit unbestimmtem Potential (*clonal hematopoiesis of indeterminate potential*, CHIP) etabliert, bei der die nicht hämatologisch assoziierten Krankheitsbilder in Folge der CH relevant sind<sup>5, 6</sup>. Genetische Veränderungen dieser Zellen können einen Einfluss auf die Konkurrenzfähigkeit im Zellverbund haben, was sich als Vorteil bezüglich Proliferation, Expansion und Überleben herausstellen kann und mit einem gehäuftem Auftreten hämatologischer und chronisch-entzündlicher Erkrankungen, sowie von Stoffwechselerkrankungen verbunden ist<sup>7</sup>. Da meist Gene mit einer suppressiven Wirkung auf die Zellexpansion eine Rolle in der Entwicklung der CH einnehmen, gehen Mutationen dieser Genen mit einem Vorteil gegenüber benachbarten Zellen einher<sup>8</sup>. Somit rücken vor allem Treiber-Gene hämatologischer Erkrankungen in den Vordergrund. Viele dieser altersabhängigen Mutationen können auf bekannte Gene zurückgeführt werden. Die pathophysiologische Rolle in verschiedenen Krankheitsbildern ist noch weitestgehend unerforscht. Ein Großteil bekannter CH-assoziiierter Mutationen fällt auf die epigenetischen Regulatoren der *DNA methyltransferase 3 alpha (DNMT3A)* und die *Ten-eleven-translocation methylcytosine dioxygenase 2 (TET2)*. Weitere Treiber-Gene sind unter anderem das *Additional sex combs-like 1 (ASXL1)*-, das *Janus kinase 2 (JAK2)*-, das *Protein Phosphatase, Mg<sup>2+</sup>/ Mn<sup>2+</sup> dependent 1D (PPM1D)*- und das *Tumor protein P53 (TP53)*-Gen<sup>9</sup>. Neben den eigentlichen ausdifferenzierten peripheren Zellen im Kreislaufsystem ist das hämatopoetisch aktive Milieu des Knochenmarks als Ursprung der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen (*hematopoietic stem and progenitor cells*, HSPC) in diesen Prozess involviert<sup>10</sup>. Als Ursprung der Hämatopoese können Mutationen in Stamm- und Vorläuferzellen eine immense Auswirkung sowohl auf das Blutbild als auch auf periphere Organe haben. Nach dem aktuellen Wissensstand wird die CH in drei verschiedene Arten gegliedert (Abb. 1): Die altersabhängige CH (*age-related CH*, ARCH) tritt vor allem in bereits identifizierten Genen wie *TET2* oder *DNMT3A* auf<sup>9</sup>. Die Form der therapieinduzierten CH (t-CH) lässt sich im Gegensatz dazu

überwiegend in Genen der sogenannten DNA-Schadensreaktionsproteine (*DNA damage-response proteins*, DDR) wie beispielsweise den Tumorsuppressorgenen *PPM1D* und *TP53* finden<sup>11</sup>. DDR-Mutationen zeichnen sich durch eine verringerte Empfindlichkeit gegenüber Bestrahlung und Chemotherapie aus und stellen einen begünstigenden Faktor für die t-CH in Patienten nach überstandener Tumorerkrankung dar<sup>9</sup>. Mit zunehmender Evidenz kristallisieren sich zudem weitere Faktoren als Ursache für die CH heraus. So können unter anderem chronische Inflammationsgeschehen einen erhöhten Selektionsdruck auf teilungsaktive Gewebe ausüben und die CH induzieren<sup>12,13</sup>, was als inflammatorisch- oder krankheitsinduzierte CH bezeichnet wird.



### Abbildung 1 Verschiedene Arten der klonalen Hämatopoese.

Die CH lässt sich je nach Ursache der mutationsbedingten Expansion in drei Arten aufteilen. Die (A) altersbedingte (ARCH) entsteht überwiegend durch spontane Mutationen, bei der (B) therapieinduzierten (t-CH) treten die Mutationen im Zuge eines vorausgehenden genotoxischen Stress auf und die (C) inflammatorisch-induzierte CH wird durch chronische Entzündungsgeschehen mit Einfluss auf die Mutationsinduktion charakterisiert. ARCH, altersbedingte CH (*age-related CH*); CH, klonale Hämatopoese (*Clonal hematopoiesis*); t-CH, therapieinduzierte CH. Erstellt unter Mithilfe von Frau Petra Pieres (Institut für Pharmakologie, Heinrich-Heine-Universität).



### 1.1.1 CH und hämatologische Erkrankungen

Bei der CH breitet sich die in einer einzelnen hämatopoetischen Stammzelle erworbene Mutation über das hämatopoetische System im gesamten Organismus aus. Die Proliferation von HSPC, ein eigentlich physiologischer Ablauf innerhalb der Blutbildung, kann bei Teilung einer abnormalen Zelle das Auftreten von Tumorerkrankungen begünstigen<sup>4</sup>. Dieser Prozess gilt als Hauptfaktor in der Entwicklung hämatologischer Erkrankungen und umfasst Krankheitsbilder wie das myelodysplastische Syndrom (MDS), die akute myeloische Leukämie (AML), myeloproliferative Neoplasien (MPN) und das lymphoproliferative Syndrom (LPS)<sup>4</sup>. Der Begriff der CH wurde erstmals im Zusammenhang mit dem Auftreten hämatologischer Erkrankungen erwähnt<sup>14</sup>. Im Gegensatz zu vorgenannten Erkrankungen zeichnet sich die CH dadurch aus, dass die somatischen Mutationen im Kreislaufsystem vorhanden sind, jedoch die klinischen Merkmale einer hämatologischen Malignität, wie beispielsweise die erhöhte Anzahl einzelner Zellfraktionen, nicht detektiert werden können<sup>1</sup>. Die Gemeinsamkeit der genannten Krankheitsbilder liegt allein im Auftreten von Mutationen in einem Treiber-Gen. Mutationen in diesen Genen führen in den meisten Fällen entweder zu einer verstärkten Expression von Proteinen, die sich vorteilhaft auf Proliferation, DNS-Reparatur und Signalkaskaden der betroffenen Zelle auswirken oder verminderten Expression von Proteinen mit suppressiven Eigenschaften<sup>15</sup>. Wichtige Vertreter in der aktuellen Forschung sind beispielsweise TP53, *Kirsten rat sarcoma virus* (KRAS) und *Fms like tyrosine kinase 3* (FLT3) bei der AML<sup>16,17</sup>, JAK2, *Calcireticulin* (CALR) und *Myeloproliferative leukemia virus* (MPL) bei der MPN<sup>18</sup> sowie *Breakpoint cluster region-Abelson 1* (BCR-ABL1), JAK2 und *IKAROS Family Zinc Finger 1* (IKZF1) bei der chronisch myeloischen Leukämie (CML)<sup>19</sup>. Zum jetzigen Zeitpunkt stellt der Einsatz von Zytostatika mit gezieltem Einfluss auf das abnormale Zellwachstum dieser Zellen einen generellen Schwerpunkt bei der Behandlung dieser Krankheiten dar. Durch die aggressive Expansion haben nicht alle Treiber-Gene eine Relevanz in der CH. Es kommt aber, je nach betroffener Zellpopulation, zu Überschneidungen hämatologischer Erkrankungen und der CH mit ungewissen klinischen Prognosen. Im Bereich der Forschung zur CHIP wird der Schwerpunkt auf die nicht-hämatologischen Erkrankungen wie beispielsweise Stoffwechsel-, kardiovaskuläre und chronisch-entzündliche Erkrankungen gelegt. Der aktuelle Wissensstand zu den CHIP-assoziierten Phänomenen wird in den folgenden Absätzen erörtert.

### 1.1.2 CH und Stoffwechselerkrankungen

Neuere Forschungsansätze implizieren neben den hämatologischen Erkrankungen eine Verknüpfung zu metabolischen Störungen wie beispielsweise *Diabetes mellitus Typ 2*<sup>20</sup>,

Adipositas<sup>21</sup> und der *Steatosis hepatis*<sup>22</sup>, umgangssprachlich, nichtalkoholische Fettleberstörung genannt. Hyperglykämische Phasen senken die Aktivität der *Adenosine monophosphate-activated protein kinase* (AMPK), die zur direkten Phosphorylierung der katalytischen Domäne des *TET2*-Gens führt und darüber dessen Aktivität hemmt<sup>23</sup>. Neben dem direkten Einfluss der Glukose auf die *TET2*-Aktivität können auch Störungen in metabolischen Wegen innerhalb der Mitochondrien, wie beispielsweise der Regulation von Substraten innerhalb des Citratzyklus, eine CHIP induzieren<sup>24</sup>. Angesichts der zunehmenden CHIP-Relevanz und dem überschaubaren Wissen im Zuge von Stoffwechselerkrankungen ist weitere Forschung in diesem Bereich notwendig.

### 1.1.3 CH und kardiovaskuläre Erkrankungen

Trotz stetig verbesserten Diagnoseverfahren und Möglichkeiten zur medikamentösen Behandlung stellen kardiovaskuläre Erkrankungen (*cardiovascular disease*, CVD) immer noch mit zirka einem Drittel die weltweit häufigste Todesursache dar<sup>25,26</sup>. Zu den Erkrankungen, die das Herz-Kreislaufsystem betreffen, gehören die koronare Herzkrankheit (KHK), die periphere arterielle Verschlusskrankheit (PAVK), Hypertonie und Herzrhythmusstörungen. Sie alle, erhöhen das Mortalitätsrisiko durch einen Myokardinfarkt, eine transitorische ischämische Attacke oder einen Schlaganfall<sup>27</sup>. Begünstigende Faktoren stellen neben der Familienanamnese vor allem ein ungesunder Lebensstil aus Bewegungsmangel, ungesunder Ernährung, Stress sowie der Konsum von Genussmitteln, wie beispielsweise Alkohol oder Nikotin, dar. Trotz zahlreicher Interventionsoptionen und bekannter Risikofaktoren können bei weitem nicht alle Patienten erfolgreich therapiert werden. Auch in diesem Zusammenhang ist die CH ein neuer Ansatzpunkt zur personalisierten Diagnose und Therapie von Patienten, in denen die klassischen Risikofaktoren nicht vorhanden sind, die aber trotzdem die klinischen Bilder der CVD widerspiegeln. Der Großteil der gegenwärtigen Studien und experimentellen Untersuchungen zur CH befasst sich primär mit der Entwicklung maligner hämatologischer Erkrankungen. Eine Relevanz in Bezug auf das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse wurde anhand einer humanen Assoziationsstudie deutlich, die eine Korrelation zwischen klonaler Expansion in Treiber-Genen und kardiovaskulären Ereignissen (KVE) fand. Unabhängig des hämatologischen Risikos steht die CH in direktem Zusammenhang mit einer signifikant erhöhten Mortalität, bedingt durch Myokardinfarkte oder Schlaganfälle<sup>28,29</sup>. Das Vorhandensein von CHIP in peripheren Blutzellen ist demnach mit einem fast verdoppelten Risiko für eine KHK in Menschen sowie mit einer beschleunigten Entwicklung von Atherosklerose in Mäusen verbunden<sup>28</sup>. Der genaue Mechanismus dahinter ist noch nicht abschließend geklärt, aber potenzielle Ursachen wurden in

neueren, epidemiologischen Studien untersucht<sup>30</sup>. Das Erste dazu untersuchte Gen ist *Tet2*, welches die Formation von Makrophagenpools in atherosklerotischen Plaques begünstigt<sup>31</sup>. Diese arteriellen Plaques wiesen zusätzlich eine erhöhte Konzentration des proinflammatorischen Zytokins Interleukin (IL)-1 $\beta$  und P-Selectin auf, welches Relevanz in der Adhäsion weiterer Monozyten hat<sup>31</sup>. Ein Funktionsverlust von *Tet2* durch eine somatische Mutation im Knochenmark steht somit in einem kausalen Zusammenhang mit dem Auftreten von CVD über einen proatherogenen Status. Die Folge sind chronische Entzündungen. Es muss erwähnt werden, dass der genaue Mechanismus in der Entwicklung dieser Mutationen unbekannt ist. Der generelle Beitrag der CH zum erhöhten CVD-Risiko zeigt aber die hohe Bedeutung zur Identifizierung betroffener Patienten, um frühzeitig therapeutische Interventionen ergreifen zu können.

#### 1.1.4 CH und chronisch-entzündliche Erkrankungen

Die proinflammatorischen Eigenschaften einiger CHIP-assoziiierter Mutationen wurden bereits im Abschnitt zur CVD erläutert. Jedoch gibt es neben der Atherosklerose als chronisch-entzündliche Erkrankung des Herz-Kreislaufsystems auch weitere Erkrankungen, die dazu untersucht wurden.

Chronisch-entzündliche Erkrankungen beruhen auf einer fehlerhaften Reaktion des Immunsystems auf physiologische Strukturen und umfassen neben vereinzelt Infektionskrankheiten im weitesten Sinne Erkrankungen mit einer Dysregulation in der Autoimmunreaktion und können neben dem kardiovaskulären System einen Großteil der menschlichen Organe und Kompartimente betreffen. Dazu zählen vor allem die Atemwege (Asthma bronchiale), das Verdauungssystem (Kolitis ulzerosa, Morbus Crohn), die Gelenke (Rheumatoide Arthritis) und die Haut (Neurodermitis, Psoriasis). Die Gemeinsamkeiten dieser Erkrankungen liegen darin, dass körpereigene Strukturen vom Immunsystem als fremd erkannt werden und Autoantikörper eine entsprechende Immunreaktion hervorrufen.

Mit steigender Evidenz im Bereich der Forschung zur CH gewinnen chronisch-entzündliche Konditionen durch ihren Beitrag zur Entwicklung und Progression der klonalen Expansion an Beachtung. Das Vorkommen proinflammatorischer Zytokine innerhalb chronisch entzündlicher Erkrankungen gilt neben dem Altern als hauptsächlicher Risikofaktor für die Entwicklung der CHIP<sup>32</sup>. Der Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha) begünstigt beispielsweise eine Verschiebung in der myeloiden Differenzierung und eine verstärkte Resistenz gegenüber apoptotischen Signalwegen, so dass eine erhöhte Exposition des proinflammatorischen Zytokins den Selektionsdruck für CHIP-induzierbare Mutationen fördert<sup>32</sup>.

## 1.2 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen

### 1.2.1 Ätiologie der CED

Die chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) gehören zur Gruppe der chronisch-inflammatorischen Autoimmunerkrankungen, welche vor allem den Gastrointestinaltrakt (GIT) betreffen. Basierend auf der Lokalisation und den pathophysiologischen Mechanismen unterscheidet man zwei Arten von CED, Kolitis ulzerosa und Morbus Crohn (MC).

Die Kolitis betrifft überwiegend nicht perforierend Kolon und Rektum, wohingegen MC sich mit unregelmäßiger Streuung über den gesamten Verdauungstrakt und dem vermehrten Auftreten von Stenosen, Fisteln, Abszessen und möglicher Perforation der Darmwand manifestiert. Erste Beschreibungen zur Ätiologie der CED gehen bis in die Antike zurück. Sie fokussierten sich bis Mitte des 20. Jahrhunderts auf Infektionserkrankungen als Hauptursache des entzündlichen Geschehens<sup>33</sup>. Die nicht primär infektionsbedingte Kausalität konnte erstmals in einer randomisierten-kontrollierten Studie zum Verlauf und Vergleich wiederkehrender Gemeinsamkeiten der Kolitis belegt werden<sup>34</sup>.

Studien zum Auftreten beider Krankheitsbilder zeigen eine erhöhte Prävalenz in den Industrieländern von Europa und Nordamerika und einen deutlichen Anstieg der Inzidenz über die vergangenen Jahrzehnte<sup>35</sup>. Diese Beobachtung lässt sich auf eine Verknüpfung von Umwelteinflüssen und Lebensstil auf die Entwicklung der CED zurückführen. Beeinflussende Faktoren sind, neben der Familienanamnese, unter anderem Rauchen, die Einnahme von Antibiotika und häusliche Hygienestandards<sup>36</sup>. Die genetische Veranlagung spielt zudem bei MC eine bedeutendere Rolle als bei der Kolitis<sup>37</sup>. Die klinischen Bilder der CED charakterisieren sich durch eine langanhaltende Entzündung des gastrointestinalen Systems und einen üblichen chronisch rezidivierendem Verlauf, symptomatisch als wässrig-blutige Diarrhoe, begleitet von Abdominalschmerzen und Übelkeit. Eine verminderte Rückresorption von Wasser und Elektrolyten in ascendierenden Teilen des Kolons und der akute inflammatorische Schub gehen zusätzlich mit einem Verlust an Körpergewicht einher<sup>38</sup>.

Beide Erkrankungsbilder sind nicht heilbar. Sie beinhalten eine erhebliche Einschränkung der Lebensqualität betroffener Patienten. Verschlechtert wird diese zusätzlich durch sich im Krankheitsverlauf manifestierende Komorbiditäten, im Speziellen psychiatrische Erkrankungen in Form emotionaler Traumata<sup>39</sup>. Als Ursache dieses pathophysiologischen Zustands wird eine überschießende Reaktion des intestinalen Immunsystems als Folge einer gestörten Schleimhautbarriere postuliert, wengleich die zugrundeliegenden Mechanismen weiterhin unbekannt sind<sup>40</sup>.

### 1.2.2 Die Schleimhautbarriere

Beide Formen der CED bilden charakteristische pathologische Veränderungen in der intestinalen Gewebestruktur aus<sup>41</sup>. Die Darmschleimhaut zeichnet sich durch ein dreischichtiges System aus, das aus Schleimhautbarrieren besteht.

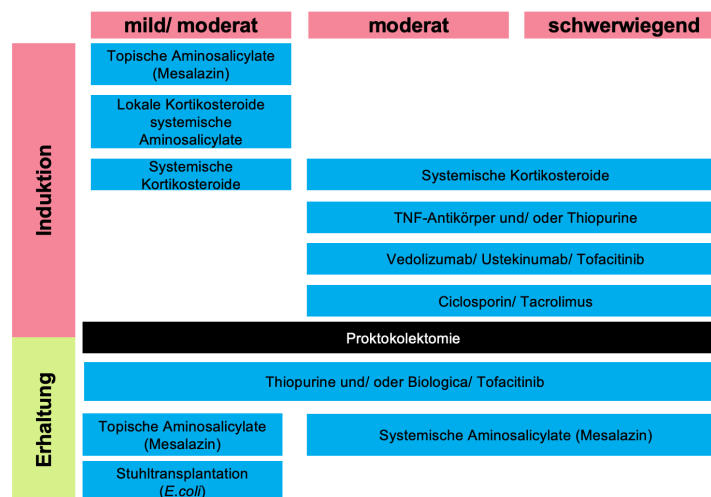
Die erste, zum intestinalen Lumen gerichtete Schicht bildet, bestehend aus Muzinen, Phospholipiden und antimikrobiellen Peptiden, der Mukus. Dieser wird vom darunterliegenden Epithel sezerniert, welches ebenfalls die absorbierenden Prozesse ausübt. Die Submukosa zeichnet sich durch eine hohe Dichte an Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Granulozyten und Makrophagen, und der adaptiven Immunität, bestehend aus T- und B-Lymphozyten, aus. Die Immunabwehr beginnt bereits auf der Ebene des Epithels, das bakterielle und virale Bestandteile bereits durch extrazellulär exprimierte *TOLL-like*-Rezeptoren (TLR) sowie intrazelluläre *Nucleotide oligomerisation domain* (NOD)-like Rezeptoren erkennt<sup>42</sup>.

Neuere Ansätze zur Erklärung der Unterschiede in Lokalisation von Kolitis ulzerosa und MC legen den Fokus auf die vom Epithel gebildeten Defensine, die eine breite antimikrobielle Wirksamkeit besitzen. Untersuchungen von Paneth-Zellen des Dünndarms ergaben eine lokal verminderte Expression von  $\alpha$ -Defensinen und eine damit einhergehende abgeschwächte Immunabwehr der Dünndarmmukosa<sup>43,44</sup>. Diese legen das Problem der lokalen Inflammation nahe, welche sich zur systemischen Dysregulation bei der ulzerativen Kolitis abgrenzen lässt. Veränderungen der Kolonmuzinschicht infolge einer verminderten Becherzellanzahl sorgen für eine strukturell veränderte beziehungsweise verminderte Mukusschicht im Zuge der Kolitis<sup>45</sup>. Dieser Effekt kann durch Mukus-degradierende Bakterienstämme, die infolge ballaststoffarmer, westlicher Diäten begünstigt werden, verstärkt werden und erklärt die Verbreitung innerhalb der industriell geprägten geographischen Räume<sup>46</sup>.

### 1.2.3 Therapie der CED

Eine frühe Diagnosestellung stellt maßgebliche Relevanz in der erfolgreichen Behandlung der CED dar. Die Therapie erfolgt rein symptomatisch zur Linderung der Beschwerden mit systemisch oder lokal angewandten Arzneimitteln oder chirurgischen Verfahren. Oberstes Therapieziel ist eine steroidfreie klinische Remission und langfristige Aufrechterhaltung dieser<sup>47</sup>. Im Folgenden wird, da Gegenstand dieser Arbeit, nur die leitlinienkonforme Therapie der Kolitis ulzerosa erörtert. MC wird leicht abweichend, jedoch weitestgehend vergleichbar behandelt.

Zum Einsatz kommen zur Behandlung bereits seit Jahrzehnten die antiinflammatorisch wirkenden Substanzen Sulfasalazin<sup>48</sup>, Kortikosteroide<sup>49</sup>, Azathioprin<sup>50</sup> und Antimetabolite, wie Mercaptopurin<sup>51</sup>. Nach der geltenden S3-Leitlinie wird, je nach Schweregrad, die Behandlung in einer Schubtherapie mit topischen Aminosalicylaten (Mesalazin) in Form von Suppositorien oder Klysmen initiiert und bei unzureichender Wirksamkeit auf die systemische Behandlung mit Kortikosteroiden ausgeweitet<sup>47</sup> (Abb. 2). Bei fehlendem Ansprechen auf Kortikosteroide, Kontraindikationen gegen diese Wirkstoffe oder Intoleranzen wird eine Therapie mit TNF-alpha-Antikörpern (Infliximab) oder ein *off-label use* von Calcineurin-Inhibitoren (Ciclosporin/Tacrolimus) empfohlen. Neuere Wirkstoffe mit geringerem Erfahrungsschatz, wie der  $\alpha 4\beta 7$ -Integrin-Antikörper Vedolizumab<sup>52</sup>, der IL12- und 13-Antikörper Ustekinumab<sup>53</sup> und JAK-Inhibitor Tofacitinib<sup>54</sup> können ebenfalls in Betracht gezogen werden. Durch das begrenzte Vorhandensein der Kolitis auf den Dick- und Enddarm kann, neben den medikamentösen Interventionen, bei besonders schweren Verlaufsformen eine Proktokolektomie mit ileonaler Pouchanlage als operatives Verfahren erwogen werden<sup>55</sup>. In Folge auf die Schubtherapie wird bei unkomplizierten Verläufen Mesalazin in lokaler Applikation zur langfristigen Remissionserhaltungstherapie als Mittel der Wahl über einen Zeitraum von mindestens zwei Jahren eingesetzt. Alternativ findet in der Erhaltungstherapie der apathogene *Escherichia coli* Nissle-Stamm in Kapselform Verwendung. Er weist eine vergleichbare Effektivität auf<sup>56</sup>. Die Verwendung von Biologika und neueren Wirkstoffen der Induktionstherapie wird auf Grundlage des ungünstigeren Nebenwirkungsprofils in Abhängigkeit des entsprechenden Einzelfalls beurteilt. Trotz immenser Fortschritte im Bereich der Entwicklung neuer Therapieansätze zur Behandlung der CED ist eine kurative Therapie nicht in Sicht. Es bedarf eines verbesserten Verständnisses der Pathologie, um einen langfristigen therapeutischen Erfolg bei diesem chronischen Erkrankungsbild zu erreichen.



**Abbildung 2 Modifizierte S3-Leitlinie zur Behandlung der Kolitis ulcerosa<sup>47</sup>.**

Die Behandlung der Kolitis ulcerosa richtet sich nach dem Schweregrad und dem Vorhandensein akuter Schubphasen oder der Remission. In Abhängigkeit der Schwere wird zwischen einer lokalen Gabe antientzündlicher Wirkstoffe oder der systemischen Applikation differenziert. Die Therapie umfasst die Wirkgruppen der Aminosalicylate, Glucocorticoiden, Biologicals, Tyrosinkinase-Inhibitoren und Immunmodulatoren bis hin zum operativen Verfahren der Proktokolektomie. Modifiziert nach S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) zur Behandlung der Kolitis ulcerosa<sup>47</sup>. TNF, Tumornekrosefaktor

#### 1.2.4 Extraintestinale Manifestationen der CED

Die systemische Dysregulation innerhalb des Erkrankungsbildes der Kolitis ulcerosa äußert sich neben der Inflammation des GIT auch in Entzündungen weiterer Organsysteme<sup>57</sup>. Auf Grundlage ähnlicher pathogenetischer Mechanismen liegt ein entsprechender Zusammenhang nahe, welcher das klinische Gesamtbild zusätzlich beeinflusst. Das Vorkommen extraintestinaler Manifestationen (EIM) steigt mit der Dauer der Erkrankung und ist zusätzlich bei bereits vorhandener EIM erhöht.

Ungefähr die Hälfte aller CED Patienten entwickelt im Verlauf eine EIM<sup>58,59</sup>. Der Großteil dieser Erkrankungen betrifft die quergestreifte Skelettmuskulatur und die Gelenke des Bewegungsapparates, die sich in zunehmend auftretenden Arthralgien<sup>60</sup>, peripheren Arthropathien<sup>61</sup> und Spondylarthropathien äußern<sup>62</sup>. Des Weiteren kommt es gehäuft zu lokalen Manifestationen verschiedener Organe unter Beteiligung der Haut in Form verschiedener spezifischer und reaktiver Läsionen<sup>63,64</sup>, ophthalmologischer Befunde<sup>65</sup> und Reaktionen auf das hepatobiliäre System, die sich als eine primär sklerosierende Cholangitis (PSC) äußern können<sup>66</sup>. Aufgrund der Malabsorption mit einer verminderten Aufnahme von Eisen, Vitamin-B12 oder Folsäure kommt es im Krankheitsverlauf zu systemischen Komplikationen einer Anämie<sup>67,68</sup>. Wichtig zur Beurteilung der EIM ist die differentialdiagnostische Abgrenzung möglicher medikamentös induzierter Manifestationen, vor allem der Glukokortikoide, unabhängig von der

CED-Grunderkrankung. Den induzierten Folgeerkrankungen kommt auch Relevanz innerhalb der Induktions- und Remissionstherapie zu, da sich eine vorzeitige Behandlung mit Biologicals, wie Infliximab beziehungsweise dem *small molecule* Tofacitinib, in einem positiven Zusatznutzen äußert und der konventionellen Therapie in diesem Fall überlegen ist<sup>69</sup>.

### 1.2.5 Die Rolle der circadianen Rhythmik in der Pathophysiologie der CED

Die physiologische innere Uhr gewinnt zunehmend an Stellenwert in der Beurteilung inflammatorischer Vorgänge<sup>70</sup>. Die circadiane Rhythmik kann als biologische Uhr angesehen werden, die neben dem Schlaf-Wach Zyklus auch weitere physiologische Prozesse, wie den Stoffwechsel oder die Hormonproduktion, reguliert<sup>71</sup>. Störungen dieses Gleichgewichts erhöhen das Auftreten von entzündlichen Prozessen über verstärkte Expression proinflammatorischer Zytokine und können das klinische Erscheinungsbild chronischer Erkrankungen zusätzlich verschlechtern<sup>72</sup>.

Das circadiane System folgt dem Aufbau einer hierarchischen Struktur, bestehend aus einer zentralen Uhr im suprachiasmatischen Kern im Gehirn, welcher einer lichtabhängigen Steuerung unterliegt, sowie einer peripheren Uhr, die sich in sämtlichen Körperzellen befindet. Dieses System wird von einer molekularen Rückkopplungsschleife, bestehend aus einem Heterodimer, dem *circadian locomotor output cycles kaput* (CLOCK) und *brain and muscle Arnt like protein-1* (BMAL1), mit Einfluss auf verschiedene Zielpromoter innerhalb tageszeitabhängiger Vorgänge und den Inhibitoren dieses Heterodimers, dem *cryptochrome* (CRY) und *period circadian regulator* (PER), mit erhöhter zytoplasmatischer Konzentration in nächtlichen Ruhephasen, angetrieben<sup>73</sup>. Eine Störung dieses Systems steht bereits aus humanen Daten in einem direkten Zusammenhang mit einer initialen CED-Manifestation und hat das Potential als Marker des Entzündungsgeschehen zu agieren<sup>74</sup>.



## 1.3 CH und CED

### 1.3.1 Der Einfluss chronischer Entzündungen auf die Hämatopoese

Wie bereits erwähnt, ist die Hauptursache des Auftretens somatisch assoziierter Mutationen innerhalb des Phänomens der CH das Altern<sup>9</sup>. Zusätzlich zu den genetischen Faktoren des normalen Alterns gelten bestimmte Umweltfaktoren als Risiko und tragen zur Expansion mutierter Zellen bei.

Die zunehmende Umweltbelastung bei fortgeschrittener Lebenszeit begünstigt chronisch niederschwellige Entzündungen. Eine solche niederschwellige Entzündung kann bereits in früheren Lebensperioden durch Umweltstress auftreten und wird in der Literatur zunehmend als Entzündungsaltern (*Inflammaging*) bezeichnet, was als durch Entzündungen hervorgerufene beschleunigte physiologische Alterung charakterisiert werden kann<sup>75</sup>. Das Entzündungsaltern stellt ein neues Forschungsfeld dar und ist auf eine Vielzahl von Krankheitsbildern übertragbar. Das mittlere Alter der Erstdiagnose einer CED findet im dreißigsten Lebensjahr und somit im jungen Erwachsenenalter statt<sup>76</sup>. Ein durch chronische Entzündung geförderter Selektionsdruck für die Entwicklung somatischer DNS-Mutationen im hämatopoetischen System legt somit einen Einfluss der Kolitis darauf nahe<sup>32</sup>.

Veränderungen im hämatopoetischen Milieu der Knochenmarksnische dienen als vielversprechender Ansatzpunkt zur Beurteilung einer möglichen Induktion somatischer Mutationen mit anschließender klonaler Expansion in knochenmarksresidenten Zellen aufgrund einer rezidivierenden Entzündung. Hämatopoetische Stammzellnischen befinden sich im Laufe der körperlichen Entwicklung in verschiedenen Kompartimenten, welche die aorto-gonadale-mesonephrische Region (AGM-Region), den Eidottersack, die Plazenta und fetale Leber innerhalb der embryonalen Entwicklung sowie nachfolgend die Milz und das Knochenmark postnatal umfassen<sup>77</sup>. Als hämatopoetisch aktives Kompartiment weist das Knochenmark in diesem Kontext eine hohe Konzentration an residenten Stamm- sowie Vorläuferzellen auf. Nischen sind Mikroumgebungen innerhalb eines lokalen Gewebes, welche zur Aufrechterhaltung und Regulierung von hämatopoetischen Stammzellen notwendig sind<sup>78</sup>. Als primärer Speicher und Produktionsstätte von Stammzellen bildet die Knochenmarksnische eine komplexe Mikroumgebung und verfügt über eine für diese wichtige Komposition<sup>79</sup>. Aufgrund der räumlichen Nähe zu Blutgefäßen innerhalb des Knochenmarks wird angenommen, dass die HSPCs sich in einer perivaskulären Nische bestehend aus Endothel- und mesenchymalen Stromazellen befinden<sup>80, 81</sup>. Als Vorstufe myeloider Zellpopulationen können Veränderungen der HSPC eine Auswirkung auf die Zusammensetzung der Leukozyten in peripheren Geweben haben. Demnach kommt besonders den Komponenten des angeborenen Immunsystems der myeloiden

Zellen im Kreislaufsystem eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der CED zu<sup>82</sup>. Neutrophile Granulozyten stellen die mengenmäßig größte Population der Leukozyten im Kreislaufsystem dar. Mit einer täglichen Neubildung von zirka  $10^{11}$  Zellen gelten sie als erste Abwehrlinie des Immunsystems<sup>83</sup>. Ihre Hauptwirkung liegt in der Erkennung mikrobieller Strukturen und entsprechender Auflösung dieser durch Phagozytose, Degranulation oder der Freisetzung von *Neutrophil extracellular traps* (NET) aus dem Zellkern<sup>84</sup>. Neuere Forschungsansätze lassen den Neutrophilen auch eine Rolle als Effektoren innerhalb der Regulation verschiedener immunregulatorischer Verfahren unter pathophysiologischen Zuständen zukommen und zeigen die Heterogenität und strukturelle Plastizität dieser Population auf<sup>85</sup>. Die multifaktoriellen Charakteristika der Neutrophilen betonen ihre bedeutende Relevanz in dem Verlauf und der Prognose chronischer Erkrankungen.

Daneben wirken sich Veränderungen innerhalb der Monozyten als wichtige myeloide Immunzellfraktion ebenfalls auf chronische Entzündungen aus. Monozyten können je nach Funktion in unterschiedliche Gruppen unterteilt werden<sup>86</sup>. Die Unterteilung erfolgt entsprechend des Ly6C-Oberflächenantigens in inflammatorische Ly6C<sup>high</sup>-Monozyten, deren Funktion darin liegt, im Zuge der Immunabwehr in verletzte Gewebe oder Infektionsherde zu migrieren<sup>87, 88</sup>. Im Gegensatz dazu kommt den Ly6C<sup>low</sup>-Monozyten die Aufgabe der Entzündungsauflösung und Initiierung von Reparaturmechanismen nach akuter Schädigung zu<sup>87</sup>. Neben den zellulären Veränderungen treten auch modellierte Zytokin- und Chemokinprofile auf<sup>89</sup>. So weisen CED-Patienten erhöhte Level proinflammatorischer Marker wie dem C-reaktiven Protein (CRP), IL-6 und TNF-alpha auf, die zu endothelialer Dysfunktion führen können<sup>90</sup>. Die humorale Zusammensetzung kann neben dem lokalen Effekt auf benachbarte Strukturen, auch eine Reaktion in anderen Gewebe über einen systemischen Weg haben und somit einen Treiber pathologischer Prozesse darstellen und EIM begünstigen<sup>57</sup>. Inwiefern Störungen der Homöostase der Knochenmarksnische durch CED die Entwicklung einer CHIP begünstigen, ist zum jetzigen Zeitpunkt noch unklar<sup>91</sup>.

### 1.3.2 Treiber-Gene chronisch-entzündlicher Erkrankungen

Es sind bereits mehrere Gene als Treiber der CH in unterschiedlichen Erkrankungsbildern beschrieben. Als die Häufigsten darunter gelten Gene wie beispielsweise *TET2*, *TP53* oder *DNMT3A*<sup>9</sup>. Eine erste epidemiologische Studie befasste sich bereits mit dem gemeinsamen Vorkommen von CHIP und CED. Bezüglich der CH in Treibergen und Kolitis wurde in dem genetischen Material einer Kohorte von 187 Kolitis-Patienten eine erhöhte Inzidenz somatischer

Mutationen gefunden, die im Speziellen auf Mutationen hämatopoetischer Zellen in den Genen *DNMT3A* und *PPM1D* zurückzuführen sind<sup>92</sup>. Die klonale Expansion von *Dnmt3a* geht, bereits aus experimentellen Studien im Mausmodell zu kardiovaskulären Erkrankungen, mit verstärktem kardialen Remodeling und renaler Fibrose einher<sup>93</sup>. Aus den humanen Daten im Zuge der ulzerativen Kolitis rückt *PPM1D* jedoch als interessanter, weitestgehend unerforschter Vertreter in den Fokus. *PPM1D* stellt derzeit zwar kein Gen mit einer aggressiven Expansion dar, tritt jedoch vermehrt in Patienten mit Kolitis auf. Ursache sowie daraus resultierende Folgen sind noch unerforscht<sup>92</sup>.

Zudem kommt der erhöhten Inzidenz hämatologischer Erkrankungen bei gemeinsamem Auftreten eine entsprechende Relevanz zu, da sowohl die CH als auch die CED präkanzerogene Vorstufen ausbilden. Die CH kann bereits nachweislich als biologische Verknüpfung des erhöhten Auftretens hämatologischer Malignome angesehen werden und zeigt die Bedeutung zum *Screening* dieser auf<sup>94</sup>. Die vorhandenen Daten geben einen Hinweis zu einer möglichen Wechselwirkung der CED als chronisch entzündliche Erkrankung und zum Einfluss auf die geförderte CHIP in Treiber-Genen.

Wie es zu diesen Mutationen kommt oder welche Folgen diese unabhängig des hämatologischen Risikos für das klinische Patientenbild haben ist unbekannt. Das chronisch rezidivierende Auftreten innerhalb der Kolitis legt die Vermutung nahe, dass es einen maßgeblichen Effekt auf die Induktion sowie Expansion mutierter Klone haben könnte. Die Mechanismen und generellen Zusammenhängen sind noch unbekannt, so dass der Forschung in diesem Bereich ein großer Stellenwert zukommt. In den folgenden Unterabschnitten wird die genaue physiologische Funktion der Treiber-Gene mit bereits bekannter Relevanz im Zuge der CHIP näher dargelegt und wie diese im Tiermodell dargestellt werden können.

### 1.3.2.1 DNMT3A

Mutationen des epigenetischen Regulator-Gens *DNMT3A* stellen gemeinsam mit *TET2* mehr als 70% der auftretenden Mutationen im Zusammenhang der altersabhängigen CH dar und steigen mit zunehmendem Lebensalter stetig<sup>9</sup>. *DNMT3A* ist verantwortlich für die *de novo*-Übertragung von Methylgruppen auf die Cytidin-Guanosin-Dinukleotide (CpG) der DNS und hat dementsprechend über Inaktivierung Einfluss auf die Expression weiterer Gene und nachfolgender zellulärer Mechanismen<sup>95</sup>. Betroffene Prozesse dieser epigenetischen Modifikation umfassen die Zelldifferenzierung, Regulation der Transkription sowie Genomstabilität<sup>96</sup> und begünstigen bei Entartung die Entwicklung hämatologischer

Erkrankungen, im Speziellen der AML<sup>97</sup>. Der Großteil der im Menschen gefundenen Mutationen begrenzt sich auf eine heterozygote Punktmutation innerhalb der katalytischen Domäne am *DNMT3A*-Rest R882H, welche mit einem Verlust der Enzymaktivität einhergeht<sup>98</sup>. Im murinen Modell befindet sich eine entsprechende Mutation an Position R878H und bewirkt ebenfalls eine Hypomethylierung der DNS<sup>99, 100</sup>.

### 1.3.2.2 TET2

Das Gen *TET2* codiert für eine Methylcytosin-Dioxygenase, die als Tumorsuppressor die Umsetzung von Methylcytosin (5mC) zu 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC) katalysiert<sup>101</sup>. Die sterische Modifikation macht betroffene DNS-Abschnitte entsprechend unzugänglich für die Transkription und bewirkt allen voran eine verminderte Genexpression. Mutationen von *TET2* bewirken einen *knock-out* des Gens, der zu einer reduzierten katalytischen Enzymaktivität führt und die Entwicklung myeloider Malignome begünstigt<sup>102, 103</sup>. Experimentelle Verwendung findet eine Mauslinie, die eine Mutation zwischen Exon 8 bis 11 trägt, welche zur Deletion der katalytischen Domäne führen<sup>104</sup>.

### 1.3.2.3 TP53

Neben *DNMT3A* und *TET2* im Zuge der altersabhängigen CH, können Mutationen in Genen, die für DDR-Proteine kodieren, eine therapieinduzierte CH fördern<sup>105</sup>. Dem Tumorphprotein P53, auch bezeichnet als *transformation-related protein 53* (TRP53), kommt besondere Relevanz innerhalb der DNS-Reparatur und Apoptose nach Schädigung zu<sup>106</sup>. Vermehrte p53-Phosphorylierung durch die *Ataxia telangiectasia mutated* (ATM)-Kinase nach Erkennung einer DNS-Schädigung durch eine externe Noxe, wie beispielsweise Ultraviolette (UV)-Strahlung, ermöglicht nach Aktivierung einen Zellzyklusstopp am G1/S Regulationspunkt und die Möglichkeit über DNS-Reparaturproteine eine Entartung zu verhindern und gegebenenfalls die Apoptose betroffener Zellen zu induzieren<sup>107</sup>. Ein mutationsbedingter Funktionsverlust resultiert in genomischer Instabilität und fördert die Ausbildung hämatologischer Erkrankungen<sup>108</sup>. Die verschiedenen Mutationsvarianten führen zu einem Funktionsverlust der DNS-Bindungsdomäne des Gens im hämatopoetischen System. Die heterozygote R270H *Missense* Mutation an Exon 8 führt zu einem dominant-negativen Effekt gegenüber dem unbeeinflussten Protein<sup>109, 110</sup>.

### 1.3.2.4 PPM1D

Analog zum *TP53* finden sich Mutationen im für eine Proteinphosphatase kodierenden Gen *PPM1D* überwiegend im Blut von Patienten, die eine Tumorerkrankung überstanden haben<sup>105</sup>. Die Serin/Threonin-Protease PPM1D agiert als negativer Regulator in umweltstressbedingten Zellwegen und wird p53-abhängig induziert<sup>111</sup>. Mutationen am Exon 6 von *Ppm1d* treten typischerweise als *Nonsense*- oder *Frameshift*-Mutationen auf und resultieren in einem *Gain-of-function* (GOF) für die betroffene Zelle<sup>112</sup>. Die Mutationen begünstigen die Proteininstabilität, erhöhen die Phosphatase-Aktivität und führen über eine entsprechende Funktionsverstärkung über den p38-p53 Signalweg zu verminderter TP53 Expression, die sich, wie bereits erwähnt, präkanzerogen auswirkt<sup>113</sup>. Experimentell findet eine Mauslinie Verwendung, die mittels *ex-vivo* Lentivirus-Transduktion des isolierten Knochenmarks transgener *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated* (Cas9) Mäuse und anschließender Transplantation in C57/BL6J-Mäuse generiert wurde<sup>114</sup>. Die so generierte Linie besitzt, analog zum humanen Vorkommen, eine identische homozygote Mutation auf Exon 6.

## 1.4 Ziele dieser Arbeit

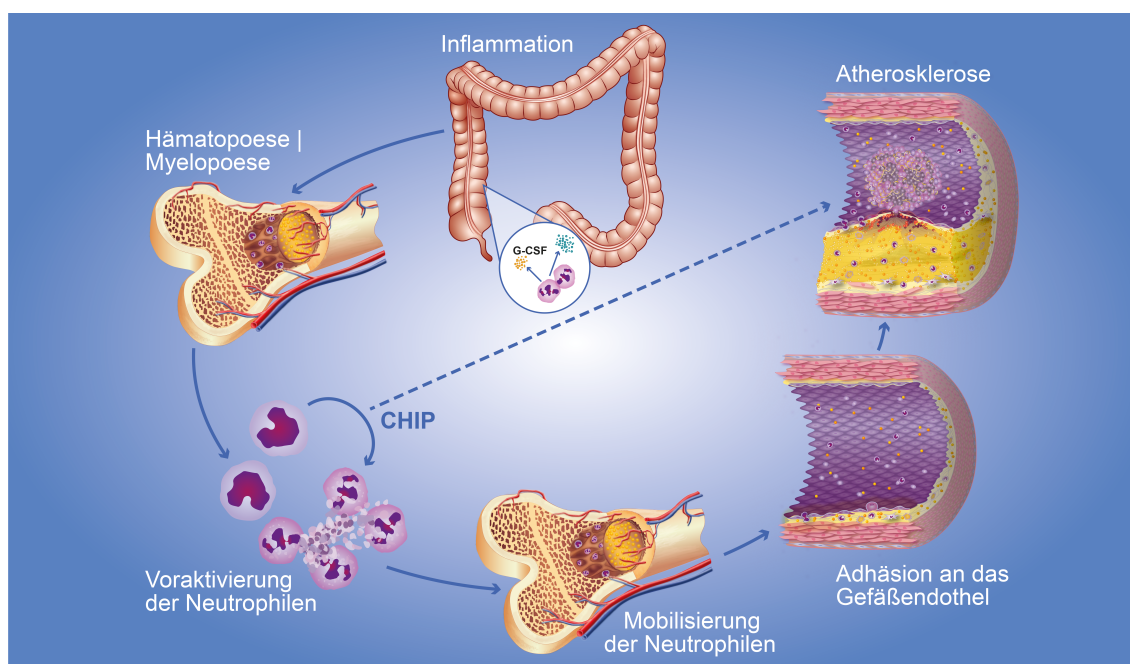
Bereits aus humanen Studiendaten geht ein erhöhtes Risiko für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse, wie Schlaganfällen, Myokardinfarkten oder früher Atherosklerose im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden, im Zusammenhang mit chronisch entzündlichen Erkrankungen wie der Kolitis ulzerosa, hervor<sup>115</sup>. Unklar ist der genaue Zusammenhang, da die klassischen Risikofaktoren atherosklerotischer kardiovaskulärer Erkrankungen wie ein hoher *Body mass index* (BMI), Hyperlipidämie, Diabetes mellitus und/ oder Hypertonie eine niedrige Prävalenz in diesen Patientenpopulationen aufweisen<sup>116</sup>. Postuliert wird ein erhöhtes Atherosklerose Risiko über die lokale und systemische Inflammation, Mikrobiomabnormalitäten, endotheliale Dysfunktion, Thrombosen, Lipiddysfunktion sowie die Anwendung von Kortikosteroiden in der Behandlung der CED<sup>117</sup>.

Die Grundlage dieser Arbeit bilden noch unpublizierte Vorarbeiten am Institut für Translationale Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, welche sich bereits mit dem Einfluss der CED auf die Entwicklung und Progression der Atherosklerose im Apolipoprotein E (*ApoE*<sup>-/-</sup>) *knock-out* Mausmodell beschäftigt haben. Demonstriert wurde im etablierten Modell der akzelerierten Atherosklerose mit *ApoE*-defizienten Mäusen der systemische Einfluss einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung auf die Entwicklung und Progression atherosklerotischer Plaque-Ablagerungen innerhalb der Aorta. Spezielle Beachtung kam der

Population der neutrophilen Granulozyten zu, welche als Teil des angeborenen Immunsystems eine wichtige Rolle in der Entstehung der Atherosklerose einnehmen<sup>118</sup>. Neben dem Anteil zirkulierender Neutrophile im systemischen Blutkreislauf kam es auch zur Zunahme stimulierender Faktoren wie dem Granulozyten-Kolonie stimulierendem Faktor (*Granulocyte-colony stimulating factor*, G-CSF), der einen essentiellen Regulator innerhalb der Chemotaxis und Neubildung knochenmarksresidenter Granulozyten in das Blutkreislaufsystem darstellt<sup>119</sup>. Die Mobilisierung der Neutrophilen aus dem Knochenmark konnte in diesem Zuge als Hauptursache für die verstärkte Atherosklerose Progression unter einer chronischen Kolitis ausgemacht werden. Aufgrund der gewonnenen Ergebnisse lässt sich postulieren, dass es durch die wiederkehrende Entzündung in Form der akuten Kolutisschübe im Zeitverlauf zu einer Voraktivierung myeloider Immunzellen am Ursprungsort innerhalb des Knochenmarks kommt. Diese voraktivierten Immunzellen begünstigen einen proinflammatorischen Effekt, welcher sich nicht nur auf das intestinale Gewebe, sondern den gesamten peripheren, systemischen Kreislauf auswirkt und damit auch die Ausbildung von Plaques im Gefäßsystem fördert (Abb. 3). Wie die Voraktivierung der Neutrophilen im Knochenmark abläuft, ist zum Zeitpunkt der aktuellen Untersuchungen noch unbekannt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Frage zu beantworten, ob es im chronischen Verlauf der CED zu funktionellen Veränderungen auf Ebene der hämatopoetischen Stammzellen kommt. Des Weiteren wurde untersucht, ob die chronische Entzündung einen direkten Einfluss auf das periphere Blutbild, im Speziellen die Voraktivierung der myeloiden Immunzelllinie, hat und Entwicklung und Progression einer CHIP begünstigt. Die Fragestellung basiert auf den geschilderten Vorarbeiten, inwiefern erworbene Mutationen als Ergebnis der chronischen Entzündung das hämatopoetische Milieu modifizieren können. Der wechselseitige Einfluss der CHIP auf die CED und die beobachtete akzelerierte Atherosklerose mitsamt den damit einhergehenden phänotypischen Veränderungen verschiedener Gewebestrukturen, im Besonderen des Knochenmarks und des intestinalen Gewebes, bilden somit den Forschungsschwerpunkt der Untersuchungen. Ein Verständnis der engen Interorgan-Kommunikation zwischen dem Knochenmark als Ursprung der verschiedenen Immunzellen und peripheren Geweben, wie dem kardiovaskulären und intestinalen System, bietet mögliche neue therapeutische Zielstrukturen bei chronisch entzündlichen Erkrankungen. Der genetische Nachweis somatischer Mutationen könnte neben der Beurteilung des klinischen Bildes dieser Erkrankungen zukünftig, auch als potenzieller diagnostischer Biomarker, beziehungsweise selbstständiger Risikofaktor dienen. Dieser könnte denselben klinischen vorhersagenden Stellenwert haben wie die konventionellen Faktoren, beispielsweise der Blutdruck, Blutlipidkonzentration, metabolische Erkrankungen oder Rauchen. Zudem bahnt ein tieferes,

mechanistisches Verständnis der CH in der Pathogenese den Weg für zukünftige individuelle therapeutische Strategien, die diese pathologischen Genmutationen als pharmakologischen Angriffspunkt nutzen können. Die CH bekannter Treiber-Gene stellt somit einen interessanten Ansatzpunkt zur Ermittlung neuer therapeutischer Zielstrukturen nicht nur bezüglich hämatologischer Erkrankungen, sondern auch im Kontext chronisch-entzündlicher Funktionsstörungen dar. Durch die vorhandenen Daten zum negativen Einfluss der CH auf die Prognose kardiovaskulärer Erkrankungen wird vermutet, dass chronische entzündliche Erkrankungen eine essenzielle Rolle in der Entwicklung der CH einnehmen können.



**Abbildung 3 Zusammenhang zwischen der chronisch-entzündlichen Darmerkrankung (CED) und der Entwicklung/ Progression der Atherosklerose.**

Die rezidivierende, kolitisbedingte Entzündung im intestinalen Gewebe fördert über Ausschüttung des Granulozyten-Kolonie stimulierenden Faktors (G-CSF) die myeloide Hämatopoese. Voraktivierte neutrophile Granulozyten werden als Reaktion auf das lokale Entzündungsgeschehen vermehrt aus dem Knochenmark mobilisiert und fördern über Adhäsion ans Endothel die Ausbildung atherosklerotischer Läsionen. Wachsende Plaques in späten atherosklerotischen Stadien begünstigen eine Ruptur, die mit einem verstärkten Risiko eines kardiovaskulären Ereignisses (KVE) einhergeht. CHIP, Klonale Hämatopoese mit unbestimmtem Potential (*clonal hematopoiesis of indeterminate potential*). Erstellt unter Mithilfe von Frau Petra Pieres (Institut für Pharmakologie, Heinrich-Heine-Universität).

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Arbeitsmittel

#### 2.1.1 Feststoffe und Lösungen

**Tabelle 1** Verwendete Reagenzien

Lösungen	Bestandteile	Hersteller
1% HCl	1% HCl	Carl Roth GmbH + Co. KG
4% Formaldehydlösung	4% Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH + Co. KG
Agarose-Gel	1 g Agarose in 100 ml TBE-Puffer	Sigma-Aldrich
Cotrim Ampullen 480 mg/5 ml	Sulfamethoxazol 400 mg Trimethorim 80 mg	Ratiopharm GmbH
DSS-Lösung	DSS (36-50 kDa; Ch.B. S2839) in Leitungswasser	MP Biomedicals
EDTA-Lösung	100 mM EDTA 0,9% NaCl Lösung	Merck KGaA Carl Roth GmbH + Co. KG
Eosin-Lösung	1% Eosin Y Dinatrium-Salz 0,05% Essigsäure	Sigma-Aldrich
Erythrozyten-Lyse-Puffer	155 mM NH <sub>4</sub> Cl 10 mM KHCO <sub>3</sub> 0,1 mM EDTA	Sigma-Aldrich
Hämalaun-Lösung	4,4 g/l Hämatoxylin krist. 28 g/l Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> *18 H <sub>2</sub> O 1 g/l C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> *18 H <sub>2</sub> O	Merck KGaA
Isofluran	Isofluran	Piramal Critical Care Deutschland GmbH
Kolonvorverdaumedium	PBS 5 mM EDTA 14 mM HEPES 10% FBS	Thermo Fisher Scientific Inc. Sigma-Aldrich
Kolonverdaumedium	RPMI (+ 25 mM HEPES, L-Glutamin) Collagenase Typ III (300 UI/ml)	Fisher Scientific Sigma-Aldrich
Öl-Rot-O-Färbelösung (ORO)	35 ml 0,5% <i>Solvent Red 27</i> (in Methanol) 10 ml 1M NaOH	Merck KGaA



PBS-Puffer	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 8,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2 H <sub>2</sub> O pH 7,4	Thermo Fisher Scientific Inc.
PEB-Puffer	2 mM EDTA-Lösung 0,5% BSA in PBS-Puffer	Merck KGaA Sigma-Aldrich Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>peqGOLD TriFast™</i>	Phenol & Guanidinisothiocyanat	Avantor Inc.
Roticlear®	Aliphatische Kohlenwasserstoffe	Carl Roth GmbH + Co. KG
Roti®Mount-Eindeckmedium	Aliphatische Kohlenwasserstoffe	Carl Roth GmbH + Co. KG
RPMI 1640 Medium	Siehe Herstellerangaben + 0,5 g FCS und 0,1 mM EDTA	Thermo Fisher Scientific Inc.

## 2.1.2 Material

**Tabelle 2 Material**

Bezeichnung	Hersteller
70 µm Nylonfilter	Greiner Bio-One
CD115 MicroBead Kit Maus (Nr. 130-096-354)	Miltenyi Biotec
DNeasy Blut & Gewebe Kit (Nr. 69504)	Qiagen GmbH
EDTA-beschichtete Microvette	Sarstedt AG & Co. KG
IL-6 Mouse ELISA Kit (Nr. KMC0061)	Thermo Fisher Scientific Inc.
iScript™ cDNA-Synthesis Kit	Bio-Rad Laboratories Inc.
Neutrophil Isolationskit Maus (Nr. 130-097-658)	Miltenyi Biotec
SensiFAST™ SYBR® NoROX Kit	Meridian Bioscience
TNF alpha Mouse ELISA Kit (Nr. BMS607-3)	Thermo Fisher Scientific Inc.
Q5 Hot Start High Fidelity DNA Polymerase	Qiagen GmbH
Qiagen RNeasy Minikit	Qiagen GmbH
QIAquick PCR & Gel Cleanup Kit (Nr. 28506)	Qiagen GmbH
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen GmbH

### 2.1.3 Geräte

**Tabelle 3 Geräte**

Bezeichnung	Gerät	Hersteller
Aurora	Durchflusszytometer	Cytek Biosciences
AxioCam MRc Kamera	Kamera	Carl Zeiss Mikroskopie
Axio Imager.M2	Mikroskop	Carl Zeiss Mikroskopie
BioRad CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System C1000 Touch Thermal Cycler	qPCR-Detektion	Bio-Rad Laboratories Inc.
BD LSRFortessa	Durchflusszytometer	BD Bioscience
Canon Power Shot G10	Digitalkamera	Canon Deutschland GmbH
EG1150	Paraffin-Einbettstation	Leica Biosystems
NanoDrop <sup>TM</sup> -1000	DNA/ RNA-Spektrometer	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Rad Source	X-Ray Bestraher	Rad Source Technologies
RM2255	Rotationsmikrotom	Leica Biosystems
Schüttler Orbital Digital	Orbital Schüttler	Carl Roth GmbH + Co. KG
SpectraMax iD3	Spektrophometer	Molecular Devices
Stemi 2000 EDU-Mikroskop-Set	Stereomikroskop	Carl Zeiss Mikroskopie
StepOnePlus <sup>TM</sup>	qPCR	Life Technologies
Tissue-Tek VIP	Gewebeentwässerung	Sakura Finetek

### 2.1.4 Programme

**Tabelle 4 Programme**

Bezeichnung	Programm	Hersteller
FlowJo	Durchflusszytometrie	BD Biosciences
ImageJ	Bildbearbeitung	National Institute of Health
GraphPad Prism 9	Statistische Analyse	Graphpad Software
SnapGene Viewer	Sequenz Analyse	Dotmatics

## 2.1.5 Hersteller

**Tabelle 5 Herstellerverzeichnis**

Hersteller	Hauptsitz
BioLegend	San Diego, California, USA
Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, D (Deutschland)
Greiner Bio-One	Frankfurt, D
Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, D
MP Biomedicals	Santa Ana, CA, USA
Qiagen	Hilden, D
Sigma-Aldrich	St.Louis, MO, USA
Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA

## 2.2 Tierversuche im Mausmodell

Die Versuche der Arbeit wurden im murinen Modell mit C57BL/6J- und *ApoE*-defizienten Mäusen durchgeführt. Die entsprechenden Tierversuche wurden gemäß § 8 des Tierschutzgesetzes vom 18. Mai 2006 durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV NRW) unter dem Titel „Untersuchung des Einflusses der chronisch-entzündlichen Darmerkrankung auf die klonale Hämatopoese“ genehmigt. Das dazugehörige Aktenzeichen lautet 81-02.04.2020.A161.

Die in den Vereinigten Staaten von Amerika (*United States of America*, USA) durchgeführten Versuche wurden von der zuständigen Behörde vor Ort, dem *Animal Care & Use Committee* (ACUC), entsprechend den notwendigen Voraussetzungen zur Durchführung von Tierversuchen unter dem Titel *Effects of clonal expansion of hematopoietic cells carrying somatic mutations in various disease* und der Protokollnummer 4205-01-21 genehmigt.

### 2.2.1 Auswahl der Mausmodelle

Die Auswahl der verwendeten Mausgenotypen erfolgte nach der jeweiligen Fragestellung in Bezug auf die Auswirkung der Kolitis im Allgemeinen auf das physiologische System, den gegenseitigen Einfluss der CH und Kolitis aufeinander sowie einer möglichen Verknüpfung mit der Entwicklung und Progression atherosklerotischer Ablagerungen. Der Einfluss der Kolitis auf physiologische Prozesse wurde mit den Stämmen der C57BL/6J-Maus ohne genetische

Modifikation und dem mit einem für das Apolipoprotein E kodierende Gen *knock-out* Stamm untersucht. Um den Zusammenhang zwischen chronischer Kolitis und der CH zu untersuchen wurden speziell an der *University of Virginia* (UVA) in den USA gezüchtete Mauslinien verwendet. Diese weisen in den bereits bekannten Treiber-Genen der CH, *Dnmt3a*, *Tet2*, *Tp53* und *Ppm1d*, entweder einen vollständigen Gen-*knock-out* oder einzelne Punktmutationen mit Einfluss auf die Trägerzelle auf (Tab. 6). Das Knochenmark der genannten Linien wurde in den Transplantationsstudien als Spender in CD45.1-*Pepboy*-Empfängertiere injiziert.

Sämtliche Versuchstiere wurden zur Gestaltung geeigneter Vergleichsgruppen zu Beginn der Therapie mit einem Kontrollpartner nach Alter, Gewicht und physiologischer Kondition gepaart.

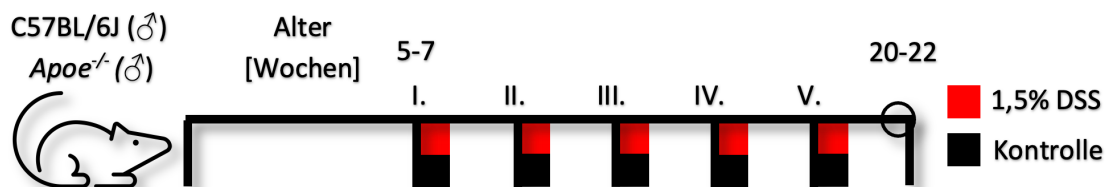
**Tabelle 6** Verwendete Mauslinien

Offizielle Bezeichnung	Interne Bezeichnung	Lieferant/ Zucht
C57BL/6J (#000664)	B6J/ Wildtyp (WT)	The Jackson Laboratory
B6.129P2-Apoe <sup>tm1Unc/J</sup> (#002052) <sup>120</sup>	<i>Apoe</i> <sup>-/-</sup>	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben Düsseldorf (ZETT)
B6.SJL-Ptprc <sup>a</sup> Pepc <sup>b</sup> /BoyJ (#002014) <sup>121</sup>	CD45.1 Pep Boy	<i>University of Virginia</i> (UVA) Vivarium in Gebäude MR5/ Jackson Laboratories
B6(Cg)-Tet2 <sup>tm1.2Rao/J</sup> (#023359) <sup>104</sup>	<i>Tet2</i> <sup>-/-</sup>	UVA-Vivarium in Gebäude MR5
Kommerziell nicht verfügbar	<i>Ppm1d</i> <sup>mut/mut</sup> 114	UVA-Vivarium in Gebäude MR5
B6.129S4-Trp53 <sup>tm3.1Tyj/J</sup> (#008182) <sup>109</sup>	<i>Tp53</i> <sup>R270H/+</sup>	UVA-Vivarium in Gebäude MR5
B6(Cg)-Dnmt3a <sup>tm1Trow/J</sup> (#032289) <sup>99</sup>	<i>Dnmt3a</i> <sup>R878H/+</sup>	UVA-Vivarium in Gebäude MR5

## 2.2.2 Experimentell-induzierte chronische Kolitis

Die Induktion der chronischen Kolitis erfolgt nach einem etablierten Modell mit einem polyanionischen, sulfatierten Polysaccharid, dem Dextran Natriumsulfat (*dextran sodium sulfate*, DSS)<sup>122</sup>. Das Dextranderivat induziert in der Maus die für eine Kolitis typischen Inflammationsmuster mit erosiv-bedingtem Kryptenverlust sowie die damit verbundene reflektorische Infiltration von neutrophilen Granulozyten und simuliert somit die nicht-infektiöse Entzündung, die sich ausschließlich auf das Kolon bezieht, wie es auch in der humanen Pathologie zu finden ist. In einer angemessenen Dosierung zeigen sich nach einer kurzzeitigen Gabe von fünf bis sechs Tagen bereits entsprechende Folgen einer Kolitis mit Gewichtsverlust und okkultem sowie teilweise sichtbarem Blut im Stuhl. Im Vorfeld zu dieser Studie wurde die verfügbare

Charge des DSS in verschiedenen Konzentrationen über die Gabe von sechs Tagen mittels Hämoccult-Tests zur Beurteilung des okkulten Bluts im Stuhl validiert. Die Gabe einer 1,5-prozentigen Lösung des DSS zeigte sich hierbei als am besten für die Behandlung von C57BL/6J und *ApoE*<sup>-/-</sup>-Tieren geeignet. Da CD45.1-*Pepboy*-Tiere hinsichtlich des Einflusses von DSS eine erhöhte Toleranz aufwiesen, wurde die Konzentration in diesen Gruppen auf 2% erhöht, der Versuchsaufbau dazu wird im Methodenteil 2.2.3 erläutert<sup>123</sup>. Das DSS wurde in Leitungswasser gelöst und über das Trinkwasser zur freien Verfügung bereitgestellt<sup>124</sup>. Das notwendige Volumen an Lösung wurde mit 5 ml pro Tag pro Maus kalkuliert, wobei das DSS-haltige Wasser nach dem dritten Tag ausgetauscht wurde. Zur Übertragbarkeit wurde das DSS, ähnlich zum klinischen Bild der Kolitis, das durch abwechselnde akute Schübe und Remissionsphasen charakterisiert ist, in Intervallen verabreicht. Dazu erhielten männliche Mäuse im Alter von fünf bis sieben Wochen das mit DSS-angereicherte Trinkwasser über einen Zeitraum von sechs Tagen zur Induktion des akuten Schubs mit anschließender Remission durch Umstellung auf Leitungswasser ohne Zusatz von DSS für 14 Tage. Die Kontrollgruppe ohne Kolitisinduktion erhielt über den gesamten Zeitraum lediglich Leitungswasser. Der Versuchsaufbau besteht insgesamt aus fünf Zyklen zu je drei Wochen. Die analysierten Endpunkte betreffen den Remissionszeitpunkt nach fünf vollen Zyklen (Abb. 4).

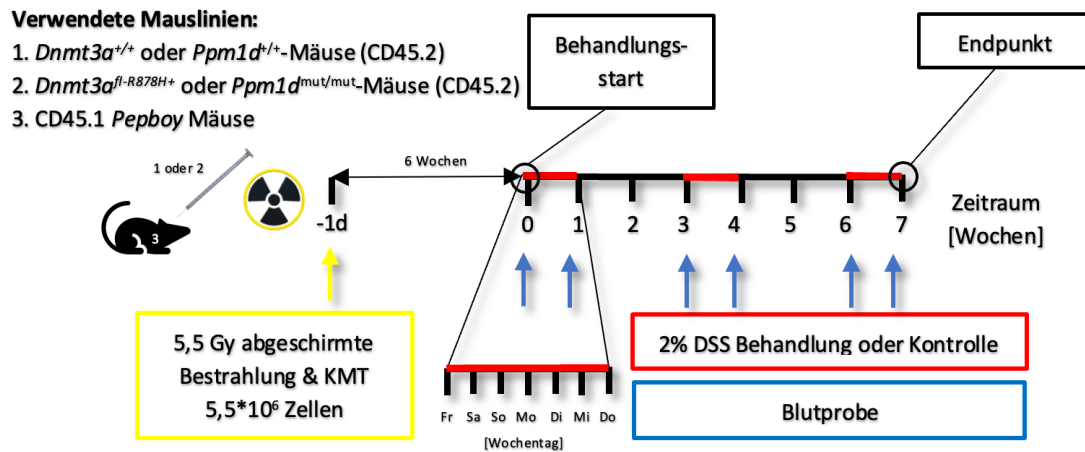


**Abbildung 4 Versuchsaufbau der experimentell-induzierten chronischen Kolitis.**

Die experimentelle Kolitis wurde in fünf bis sieben Wochen alten, männlichen C57BL/6J und *ApoE*-defizienten-Mäusen mit einer 1,5-prozentigen Lösung von DSS über fünf Zyklen zu je einer Woche mit einer zweiwöchigen Remissionsphase induziert. Kontrolltiere erhielten über den gesamten Behandlungszeitraum Leitungswasser. *ApoE*, Apolipoprotein E; DSS, Dextrannatriumsulfat (*Dextran sodium sulfate*)

### 2.2.3 Myeloablativer Knochenmarkstransfer

Zur Modellierung der CH wurden Knochenmarkszellen eines genetisch manipulierten oder CD45.2-Wildtypsponders in eine CD45.1-*Pepboy*-Maus transplantiert<sup>125</sup>. Beim myeloablativen Knochenmarkstransfer wurden die mit 100 µl Ketamin/ Xylazin narkotisierten CD45.1 *Pepboy*-Empfängermäuse im Abstand von 4h insgesamt zweimal für zirka 150s einer Intensität von jeweils 5,5 Gy in Form von Röntgenstrahlung ausgesetzt<sup>126</sup>. Um sicherzustellen, dass jede Maus dieselbe Strahlendosis erhält, wurden die Mäuse einzeln auf einer Bleiplatte an den oberen und unteren Extremitäten mittels kohäsiven Haftbinden fixiert. Zur Minimierung eines bestrahlungsabhängigen Effekts auf viszerale Organe, im speziellen der Entwicklung eines Kolonkarzinoms<sup>127</sup>, und gewebresidente Immunzellen<sup>128</sup>, wurde der abdominale Bereich mittels anatomisch angepasstem Röntgenschutz aus Blei abgeschirmt. Nach der zweiten Bestrahlung erhielt jede Maus eine retroorbitale Injektion von zirka  $5,5 \cdot 10^6$  isolierten Knochenmarkszellen eines Treiber-Gen-modifizierten oder eines Wildtyp-Geschwistertieres als Kontrollpartner. Die Injektion fand unter Anästhesie mit 5% Isofluran in medizinischen Sauerstoff statt. Die Donorzellen wurden zuvor aus den Oberschenkel-, Schienbein-, Oberarm- und Hüftkochen gewonnen und in sterilem *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI)-Medium in einer Konzentration von  $5,5 \cdot 10^6$  Zellen/ 200 µl resuspendiert. Zur Infektionsprophylaxe erhielten die Tiere für 14 Tage nach der Bestrahlung eine antibiotische Therapie mit 5 mM Sulfamethoxazol und 0,86 mM Trimethoprim über das Trinkwasser sowie ein Diät-Gel zur Verkürzung der Erholungsphase<sup>126</sup>. Sechs Wochen nach dem Knochenmarkstransfer wurde die Behandlung mit DSS zur Kolitisinduktion gestartet. Innerhalb der Transplantationsstudien wurde der akute Zeitpunkt am Ende des dritten Zyklus untersucht. Die Methode des myeloablativen Knochenmarkstransfers eignet sich speziell für Treiber-Gene mit geringer Expansion und fand experimentell für *Dnmt3a*<sup>fl-R878H+</sup> und *Ppm1a*<sup>mut/mut</sup> Anwendung. Da die CD45.1 *Pepboy*-Mäuse eine höhere Toleranzschwelle aufwiesen, wurde hier zur Kolitis-Induktion mit einer Konzentration von 2% gearbeitet (Abb. 5).

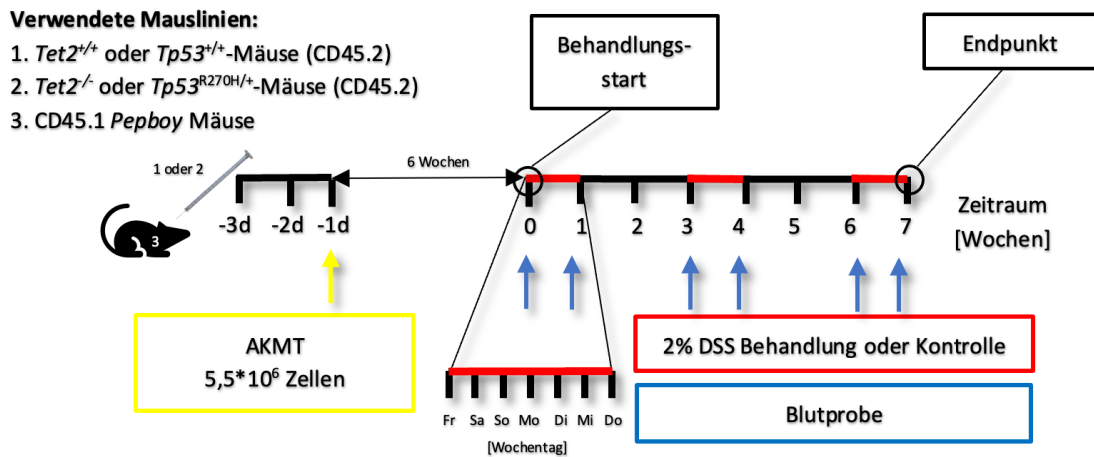


**Abbildung 5 Schematischer Versuchsaufbau des myeloablativen Knochenmarkstransfers in Kombination mit der experimentell-induzierten Kolitis.**

Im Abdominalbereich abgeschirmte CD45.1 *Pepboy*-Mäuse wurden zweimalig im Abstand von 4h mit einer Intensität von 5,5 Gy für 150s bestrahlt. Nach der zweiten Bestrahlung wurde das Knochenmark von CD45.2 *Ppm1d*<sup>mut/mut</sup>-mutierten, *Dnmt3a* <sup>$\beta$ -R878H+</sup>-defizienten oder den Wildtyp-Geschwistertieren isoliert und 5,5 Millionen Zellen retrobulbär den CD45.1 *Pepboy*-Mäusen injiziert. Die experimentelle Kolitis wurde sechs Wochen nach der Transplantation mit einer 2%igen DSS-Lösung in den CD45.1 Mäusen in drei Zyklen über einen Zeitraum von 7 Wochen induziert. DSS, Dextrantrisulfat; KMT, Knochenmarkstransfer

## 2.2.4 Adoptiver Knochenmarkstransfer

Da das klinische Bild der CH auf einer niederschweligen Konzentration an mutierten Zellen beruht, gibt es neben der vollständigen Präkonditionierung des Knochenmarks die Möglichkeit, eine teilweise Transplantation der Spenderzellen durchzuführen<sup>129</sup>. Beim adoptiven Knochenmarkstransfer erhielten die CD45.1 *Pepboy*-Mäuse an drei konsekutiven Tagen eine retroorbitale Injektion von 5,5\*10<sup>6</sup> Knochenmarkszellen eines genetisch manipulierten oder Wildtyp CD45.2-Spenders, ohne eine vorherige Präkonditionierung mittels Bestrahlung zu durchlaufen<sup>126</sup>. Analog zum Modell der Bestrahlung wurde die Behandlung mit DSS sechs Wochen nach der letzten Injektion gestartet (Abb. 6). Diese Methode eignet sich speziell für Treiber-Gene mit aggressiver Expansion und wurde experimentell für *Tet2*<sup>-/-</sup> und *Tp53*<sup>R270H/+</sup> angewandt.



**Abbildung 6 Schematischer Versuchsaufbau des adoptiven Knochenmarkstransfers (AKMT) in Kombination mit der experimentell-induzierten Kolitis.**

Das Knochenmark von CD45.2 *Tet2*-defizienten, *Tp53*<sup>R270H/+</sup>-mutierten oder den Wildtyp Geschwistertieren wurde isoliert und 5,5 Millionen Zellen wurden an drei konsekutiven Tagen in CD45.1 *Pepboy*-Mäuse retrobulbär injiziert. Die experimentelle Kolitis wurde sechs Wochen nach der Transplantation mit einer 2%igen DSS-Lösung in den CD45.1 Mäusen in drei Zyklen über einen Zeitraum von 7 Wochen induziert. AKMT, adoptiver Knochenmarkstransfer; DSS, Dextrannatriumsulfat

### 2.2.5 Organpräparation

Je nach Fragestellung wurden die Tiere entweder innerhalb eines akuten Kolitisschubs nach sieben oder aber in der Remissionsphase nach 15 Behandlungswochen der Euthanasie unterzogen. Über Punktion der linken Herzkammer mittels Ethylendiamintetraessigsäure (*Ethylendiaminetetraacetic acid*, EDTA) -beschichteter Spritze wurde das Blut entnommen. Nach Durchtrennen der Beinarterien und anschließender Perfusion mit Heparin-versetzter phosphatpufferter Kochsalzlösung (*Phosphate-buffered saline*, PBS) wurden Blutrückstände in den Gefäßen unter konstantem Druck ausgespült. In Abhängigkeit der weiterführenden Analysen wurden Milz, Dickdarm, Aorta sowie Oberschenkel-, Schienbein-, Oberarm- und Hüftknochen wie folgt beschrieben präpariert und entsprechend aufgearbeitet.



## 2.3 Histologie

### 2.3.1 Gewebeaufbereitung

Nach der Entnahme wurde das Kolon durch Spülen mit einer 20 µg/ml Gentamycin-haltigen Lösung von Fäzes befreit. Um einen Überblick der gesamten Gewebearchitektur des Kolons zu bekommen, wurden die Darmproben der Länge nach aufgeschnitten und vom distalen zum proximalen Ende spiralförmig aufgerollt. Für die histologischen Untersuchung wurde das Kolon weitestgehend vom viszeralen Fettgewebe befreit und in eine Einbettkassette überführt. Im Anschluss daran wurde das Gewebe in einer 4-prozentigen wässrigen Formaldehyd-Lösung zur reversiblen Protein Quervernetzung, welche die Autolyse des Gewebes unterbindet, für 24h bei 4°C fixiert. Nach der Fixierung wurden die Gewebe in PBS überführt, durch eine in der Konzentration aufsteigende Ethanolreihe (50-70-96%) entwässert und schließlich in flüssigem Paraffin gelagert. Die entwässerten Proben wurden an einer Paraffin-Ausgießstation in Paraffinblöcke eingebettet. Aus den Paraffinblöcken wurden am Rotationsmikrotom konsekutive Schnitte mit einer Dicke von 5 µm angefertigt und auf Objektträgern aufgefangen. Die geschnittenen Proben wurden anschließend für 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet und danach für eine Stunde bei 60°C im Trockenschrank unter Hitzeeinfluss fixiert. Zur Vorbereitung auf die Färbung wurden die fixierten Schnitte vorher entparaffiniert. Dazu wurden die Proben für dreimal 15 Minuten in eine absteigenden Konzentrationsreihe des Intermediums Roticlear<sup>®</sup> gegeben, anschließend für zwei Minuten in Ethanol überführt und zuletzt zweimal für fünf Minuten in PBS gewaschen.

### 2.3.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Bei der Hämatoxylin-Eosin (*Hematoxylin and eosin*, HE) -Färbung werden verschiedene Zellorganellen in Gewebeschnitten anhand von zwei aufeinanderfolgenden Einzelfärbungen mikroskopisch differenzierbar gemacht. Die Färbung basiert auf den Säure-Base-Eigenschaften der einzelnen Zellstrukturen. So lassen sich saure Strukturen, wie beispielsweise die DNS, in Zellkernen durch Anreicherung des oxidierten Hämatoxylins bei einem neutralen pH-Wert blauviolett darstellen. Basische Moleküle, wie die Zytoplasmaproteine sowie mitochondriale Strukturen, werden mittels Eosin anschließend rot angefärbt. Dazu wurden nach dem Entparaffinieren die Kolonschnitte in destilliertem Wasser gewaschen und mit einer Hämalaun-Lösung (Tab. 1) für eine Minute gefärbt. Nach Ansäuerung mit einer 1%igen Salzsäure-Lösung wurden die Proben unter fließendem Leitungswasser für zehn Minuten gebläut. Darauffolgend wurden die Schnitte für eine Minute mit einer Eosin-Lösung (Tab. 1) angefärbt. Nach einem

Waschschritt mit Ethanol wurden die Kolonschnitte in dem Eindeckmittel Roti-Mount<sup>®</sup> konserviert. Die Mikroskopie erfolgte mit einem Zeiss Axio Imager.M2 Mikroskop und einer AxioCam MRc Kamera (Tab. 3), bei 10- beziehungsweise 20-facher Vergrößerung. Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte mit der Software ImageJ (Tab. 4).

### 2.3.3 Öl-Rot-O-Färbung

Bei der Öl-Rot-O-(ORO) -Färbung lassen sich mit dem fettlöslichen Bisazofarbstoff *Solvent Red 27* Triglyceride in Zellen rot anfärben. Die Färbung diente im Zusammenhang mit dieser Arbeit zur Darstellung atherosklerotischer Plaques in der Aorta innerhalb der durchgeführten Mausversuche, da diese triglyceridhaltige Gewebeveränderungen darstellen. Die fixierten Aorten wurden dazu nach einem fünf-minütigen Waschschritt in 78%igem (V/V) Methanol für 90 Minuten in einer ORO-haltigen Lösung gefärbt (Tab. 1). Ein anschließender Waschschritt mit 78%igem (V/V) Methanol diente zur Entfernung von überschüssigem Farbstoff. Nach der manuellen Entfernung von Rückständen des perivaskulären Fettgewebes wurden die Aorten im Längsschnitt geöffnet. Die folgenden Aufnahmen erfolgten mit einem Zeiss Stereomikroskop 2000 mit angeschlossener Canon Power Shot G10 Digitalkamera (Tab. 3). Der relative plaquebelastete Anteil an der Gesamtaortenfläche wurde mit der Software ImageJ quantifiziert und statistisch analysiert.

## 2.4 Durchflusszytometrie

Zur Unterscheidung einzelner Populationen auf Zellebene wurden diese mittels durchflusszytometrischer Analyse untersucht. Auf Basis der Expression bestimmter Zelloberflächenantigene können diese durch die Markierung mit einem Antikörper-Fluorochrom-Konjugat nachgewiesen werden. Klassische Zielmarker für Immunzellen stellen die *clusters of differentiation* (CD)-Antigene dar<sup>130</sup>. Anhand dieser kann eine präzise Differenzierung verschiedener Populationen des hämatopoetischen Systems erreicht werden.

Je nach Notwendigkeit wurden die Gewebe vorab mittels Kombination aus enzymatischen und mechanischen Verfahren zu einer Einzelzellsuspension aufgearbeitet. Zur Vermeidung unspezifischer Antikörperbindungen, wurden die Fragment-kristallisierbaren (*Fragment crystallizable*, Fc) -Regionen vorab mit einem Anti-Maus-CD16/32-Antikörper blockiert. Da lediglich die Leukozyten von Relevanz waren, wurden die Erythrozyten mittels hypotoner Pufferlösung lysiert. Zum Ausschluss apoptotischer Zellen wurde der intrazelluläre Farbstoff

*LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain* vor der Antikörperfärbung von Knochenmark und Darm zu den Proben gegeben. Die Messungen erfolgten am BD LSR Fortessa beziehungsweise dem Cytex Aurora Durchflusszytometer (Tab. 3). Die Auswertung erfolgte mit der Software *FlowJo* (Tab. 4) unter Hinzuziehen von Einzelfärbungen, Isotyp-Kontrollen sowie *Fluorescence minus one* (FMO)-Kontrollen zur klaren Abgrenzung der positiven von den negativen Populationen.

**Tabelle 7** Verwendete Antikörper zur durchflusszytometrischen Analyse von Leukozyten und Stammzellen

Gewebe	Population	Antikörper	Volumen [µl]	Hersteller	Gerät
Blut	Leukozyten	CD3 – AF700	0,25	Biolegend	BD LSR Fortessa
		CD4 – FITC	0,0625		
		CD8a – AF647	0,25		
		CD11b – PE/ Dazzle	0,125		
		CD19 – PacBI	1		
		CD45 – PE	0,5		
		CD115 – BV711	0,25		
		Ly6C – APC/ Cy7	0,0625		
		Ly6G – BV650	1		
	Leukozyten (CD45.1 und CD45.2)	CD3 – PE-eFluor610	0,3	Biolegend	Cytex Aurora
		CD4 – FITC	0,4		
		CD8a – BV510	0,4		
		CD19 – APC-Cy7	0,3		
		CD45.1 – PE-Cy7	0,3		
		CD45.2 – BV785	0,3		
		CD115 – PE	0,4		
		Ly6C – APC	0,3		
Ly6G – PerCP5.5		0,2			
Knochenmark	Leukozyten	Siehe Blut	Siehe Blut	Biolegend	BD LSR Fortessa
	Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen (HSPC)	CD16/32 – BV421	0,5	Biolegend	Cytex Aurora
		CD34 – PE/ Dazzle	0,5		
		CD48 – PE	0,5		
		CD150 – PE/ Cy5	0,125		

		c-kit – PE/ Cy7	0,25					
		Lineage – AF700	1					
		Sca-1 – BV650	0,25					
	Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen (CD45.1 und CD45.2)	CD11b – Biotin	0,5	Biolegend	Cytex Aurora			
		Gr1 – Biotin	0,5					
		Ter119 – Biotin	0,5					
		B220 – Biotin	0,5					
		CD3e – Biotin	0,5					
		CD127 – Biotin	0,5					
	Strep – BV650	CD45.1 – BV711	1	Biolegend	Cytex Aurora			
		CD45.2 – BV785	1					
		CD150 – PerCP/ eF710	0,5					
		Sca1 – PE/Cy7	0,5					
		c-kit – APC	0,5					
		CD48 – BV421	0,5					
		CD135/ Flk2 – PE	1					
Darm		Leukozyten	CD45.1 – AF700			1	Biolegend	Cytex Aurora
			CD45.2 – BV785			1		
	CD11b – PE/Cy7		2					
	CD11c – BV650		1					
	CD206 – BV421		2					
	CD64 – PerCP/ Cy5.5		1					
	CD169 – PE/Dazzle		1					
	CD115 – APC/ Cy7		1					
	CD192 – BV421		1					
	F4/80 – PE		0,5					
	Ly6C – APC		1					
	Ly6G – BV711		1					
	MHCII – FITC		1					

### 2.4.1 Identifizierung der im Blut zirkulierenden Leukozyten

Am Behandlungsendpunkt wurde das isolierte periphere Blut aus dem linken Ventrikel entnommen. 12,5 µl des Blutes wurden mit 0,5 µl Fc-Block versetzt und für zehn Minuten bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden zu jeder Probe 3,5 µl einer Mischung der verwendeten Antikörper hinzugefügt (Tab. 7) und für 15 Minuten bei 4°C gelagert. Nach dem Zusatz von 1,5 ml eines hypotonen Erythrozyten-Lyse Puffers wurden die Proben zentrifugiert (800 g, 10 min, 4°C) und mit einer 1%igen PFA-Lösung für 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur fixiert. Nach einem Waschritt mit PEB und anschließender Zentrifugation (800 g, 10 min, 4°C) wurden die Proben in 212,5 µl PEB resuspendiert und im BD LSRFortessa Durchflusszytometer von BD Bioscience vermessen.

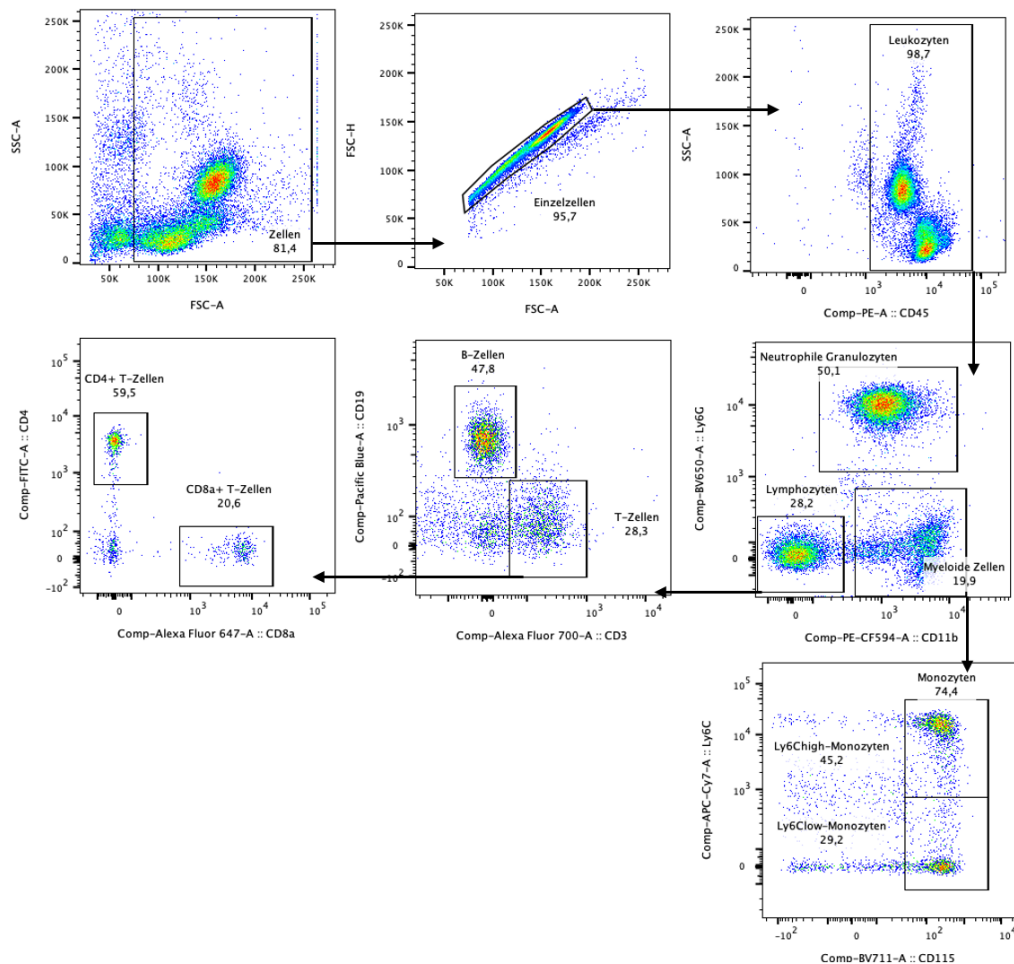
Zusätzlich zur Messung der gefärbten Proben wurden bei Messungen mit dem BD Fortessa in einer separaten Probe das identische Volumen an *Flow-Count Fluorospheres* bekannter Konzentration als interner Standard zur Bestimmung der absoluten Zellzahlen hinzugefügt. Dazu wurden 12,5 µl Probe analog zur Färbung mit 1,5 ml eines hypotonen Erythrozyten-Lyse Puffers versetzt, zentrifugiert, in 212,5 µl resuspendiert und mit 12,5 µl *Flow-Count Beads* versetzt. Durch die Angabe des vermessenen Probenvolumens war dieser Schritt bei der Messung mit dem Gerät von Cytex Biosciences nicht notwendig. Die Unterscheidung der myeloiden und lymphoiden Population erfolgte nach dem Expressionsmuster der Antigene (Tab. 8) und wurde entsprechend der Koexpression nach einer hierarchischen Struktur *gegatet* (Abb. 7).

### 2.4.2 Identifizierung der zirkulierenden sowie knochenmarksresidenten Leukozyten

Neben dem Blut wurde das Knochenmark aus Ober- und Schienbeinknochen durchflusszytometrisch auf die Zusammensetzung der ausdifferenzierten Leukozyten hin untersucht. Die Epiphysen der Knochen wurden entfernt, in ein perforiertes 0,5 ml Eppendorf Tube® gegeben und das Knochenmark durch Zentrifugation (8000 rpm, 1,5 min, 4°C) in ein 1,5 ml Tube aufgefangen. Nach Filtration durch einen Filter mit der Maschenweite von 70 µm zur Entfernung größerer Partikel wurde das Knochenmark in 200 µl PEB resuspendiert und analog zum Blut aufgearbeitet und im BD LSRFortessa Durchflusszytometer von BD Bioscience vermessen. Die Markerkombination richtet sich nach der zu beurteilenden Zellfraktion (Tab. 8) und wurde analog zu den Zellen im Blutkreislauf hierarchisch *gegatet* (Abb. 7).

**Tabelle 8 Markerkombination zur Unterscheidung der Leukozytenpopulationen**

Leukozyten (CD45 <sup>+</sup> )	Antigenexpression
Neutrophile Granulozyten	CD11b <sup>-</sup> Ly6G <sup>+</sup>
Monozyten	CD11b <sup>+</sup> CD115 <sup>+</sup>
Ly6C <sup>high</sup> Monozyten	CD11b <sup>+</sup> CD115 <sup>+</sup> Ly6C <sup>high</sup>
Ly6C <sup>low</sup> Monozyten	CD11b <sup>+</sup> CD115 <sup>+</sup> Ly6C <sup>low</sup>
Lymphozyten	CD11b <sup>-</sup> Ly6G <sup>-</sup>
B Lymphozyten	CD11b <sup>-</sup> Ly6G <sup>-</sup> CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup>
T Lymphozyten	CD11b <sup>-</sup> Ly6G <sup>-</sup> CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>-</sup>
CD4 T Lymphozyten	CD11b <sup>-</sup> Ly6G <sup>-</sup> CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>-</sup> CD4 <sup>+</sup>
CD8 T Lymphozyten	CD11b <sup>-</sup> Ly6G <sup>-</sup> CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>



**Abbildung 7 Gating-Schema zur Differenzierung myeloider und lymphoider Leukozyten im Knochenmark und Blutkreislaufsystem.**

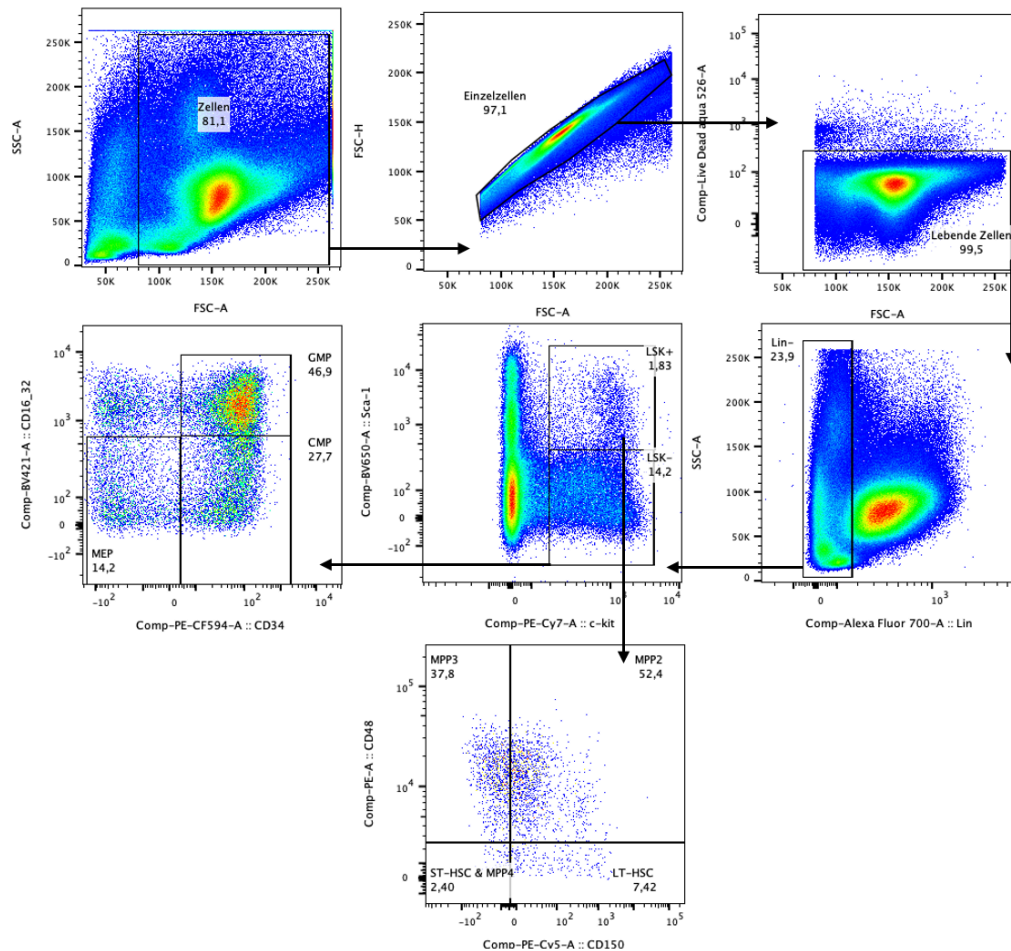
Die verschiedenen Zellpopulationen der Leukozyten im Blutkreislauf wurden entsprechend der Koexpression der Oberflächenantigene hierarchisch gegatet.

### 2.4.3 Identifizierung der knochenmarksresidenten, hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen

Zusätzlich zur Untersuchung der Leukozyten wurde eine weitere durchflusszytometrische Messung zur Beurteilung des Einflusses auf die HSPC im Knochenmark durchgeführt. Dazu wurden 25 µl Probe mit 177 µl *LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain* (0,115 µl/100 µl PBS) versetzt und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach einem Reinigungsschritt mit 1 ml PBS wurden die Proben unter Einsatz entsprechender Antikörper (Tab. 7) analog wie zuvor beschrieben aufgearbeitet und im BD LSRFortessa Durchflusszytometer von BD Bioscience vermessen. Die Markerkombination richtet sich nach der zu beurteilenden Zellfraktion (Tab. 9) und wurde analog zu den ausdifferenzierten Zellen hierarchisch gegatet (Abb. 8).

**Tabelle 9** Markerkombination zur Unterscheidung der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen im Knochenmark.

Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen (Lin <sup>-</sup> ckit <sup>+</sup> )	Antigenexpression
Langlebige hämatopoetische Stammzellen ( <i>long term hematopoietic stem cells</i> , LT-HSC)	Sca1 <sup>+</sup> CD48 <sup>-</sup> CD150 <sup>+</sup>
Kurzlebige hämatopoetische Stammzellen ( <i>short term hematopoietic stem cells</i> , ST-HSC)	Sca1 <sup>+</sup> CD48 <sup>-</sup> CD150 <sup>-</sup>
Multipotente Vorläuferzellen Klasse 2 ( <i>multipotent progenitors group 2</i> , MPP2)	Sca1 <sup>+</sup> CD48 <sup>+</sup> CD150 <sup>+</sup>
Multipotente Vorläuferzellen Klasse 3 ( <i>multipotent progenitors group 3</i> , MPP3)	Sca1 <sup>+</sup> CD48 <sup>+</sup> CD150 <sup>-</sup>
Granulozyten-Monozyten-Vorläuferzellen ( <i>granulocyte monocyte progenitors</i> , GMP)	Sca1 <sup>-</sup> CD34 <sup>+</sup> CD16/32 <sup>+</sup>
Gemeinsame Myeloide Vorläuferzellen ( <i>common myeloid progenitors</i> , CMP)	Sca1 <sup>-</sup> CD34 <sup>+</sup> CD16/32 <sup>int</sup>
Megakaryocyten-Erythrocyten Vorläuferzellen ( <i>megakaryocytic-erythroid progenitors</i> , MEP)	Sca1 <sup>-</sup> CD34 <sup>-</sup> CD16/32 <sup>-</sup>



**Abbildung 8 Gating-Schema zur Differenzierung der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen im Knochenmark.**

Die verschiedenen Zellpopulationen der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen im Knochenmark wurden entsprechend der Koexpression der Oberflächenantigene hierarchisch gegatet. CMP, Gemeinsame Myeloide Vorläuferzellen (*common myeloid progenitors*); GMP, Granulozyten-Monozyten-Vorläuferzellen (*granulocyte monocyte progenitors*); Lin, Lineage; LSK, Lineage<sup>Sca1<sup>+</sup>ckit<sup>+</sup></sup>; LT-HSC, Langlebige hämatopoetische Stammzellen (*long term hematopoietic stem cells*); MEP, Megakaryocyten-Erythrocyten Vorläuferzellen (*megakaryocytic-erythroid progenitors*); MPP, Multipotente Vorläuferzellen (*multipotent progenitors*); ST-HSC, Kurzlebige hämatopoetische Stammzellen (*short term hematopoietic stem cells*).

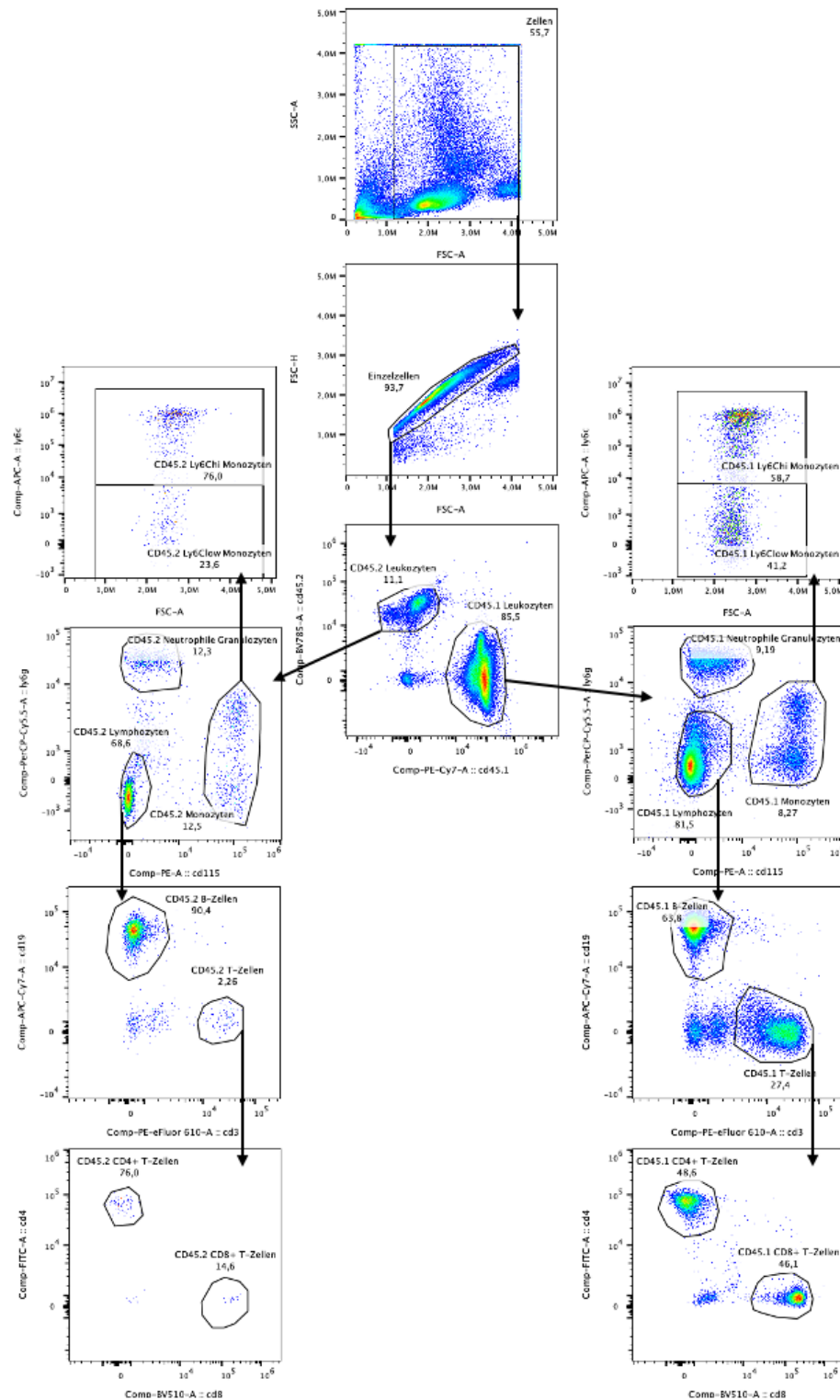


#### 2.4.4 Identifizierung der klonalen Expansion im Blut

Zur Beurteilung einer erfolgreichen Knochenmarkstransplantation sowie der klonalen Expansion unter Behandlungsbedingungen wurde das periphere Blut im Verlauf der Kolitis durchflusszytometrisch untersucht. Die Tiere wurden zu diesem Zweck mit 5% Isofluran in medizinischer Luft narkotisiert und zirka 100 µl Blut wurden mittels Glaskapillare aus dem retroorbitalen Sinus gewonnen und in ein mit EDTA-beschichtetes Gefäß überführt. Die Messung erfolgte zu Beginn und am Ende eines jeweiligen Behandlungszyklus. 50 µl Blut wurden in einem FACS®-Tube mit 1,5 ml eines hypotonen Erythrozyten-Lyse Puffers für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Nach Neutralisation mit 2 ml PBS wurden die Proben zentrifugiert (1800 rpm, 5 min, 4°C). Die folgende Färbung erfolgte mit der entsprechenden Markerkombination (Tab. 7). Das notwendige Volumen der Antikörper wurde mit PEB zu 100 µl ergänzt und mit der Probe vermischt. Nach einer Inkubation von 20 Minuten bei Raumtemperatur wurden 1,5 ml PBS hinzugesetzt und die Probe zentrifugiert (1800 rpm, 5 min, 4°C). Danach wurde der Rückstand mit einer 1%igen PFA-Lösung für zehn Minuten im Dunkeln bei 4°C fixiert. Nach einem Waschriff mit 3 ml PEB wurden die Proben zentrifugiert (1800 rpm, 5 min, 4°C), in 400 µl PEB resuspendiert und im Aurora Durchflusszytometer von Cytex Bioscience vermessen. Die Marker richten sich nach der zu beurteilenden Zellfraktion (Tab. 10) und wurden hierarchisch gegatet (Abb. 9).

**Tabelle 10 Markerkombination zur Unterscheidung der CD45.1 und CD45.2 positiven Leukozytenpopulationen**

Leukozyten (CD45 <sup>+</sup> )	Antigenexpression
CD45.1 Leukozyten	CD45.1 <sup>+</sup>
CD45.2 Leukozyten	CD45.2 <sup>+</sup>
Neutrophile Granulozyten	CD115 <sup>+</sup> Ly6G <sup>+</sup>
Monozyten	CD115 <sup>+</sup>
Ly6C <sup>high</sup> Monozyten	CD115 <sup>+</sup> Ly6G <sup>-</sup> Ly6C <sup>high</sup>
Ly6C <sup>low</sup> Monozyten	CD115 <sup>+</sup> Ly6G <sup>-</sup> Ly6C <sup>low</sup>
Lymphozyten	CD115 <sup>-</sup> Ly6G <sup>-</sup>
B Lymphozyten	CD115 <sup>-</sup> Ly6G <sup>-</sup> CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup>
T Lymphozyten	CD115 <sup>-</sup> Ly6G <sup>-</sup> CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>-</sup>
CD4 T Lymphozyten	CD115 <sup>-</sup> Ly6G <sup>-</sup> CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>-</sup> CD4 <sup>+</sup>
CD8 T Lymphozyten	CD115 <sup>-</sup> Ly6G <sup>-</sup> CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>



**Abbildung 9 Gating-Schema zur Differenzierung der klonalen Expansion der CD45.2 mutierten Donorzellen im Blutkreislauf.**

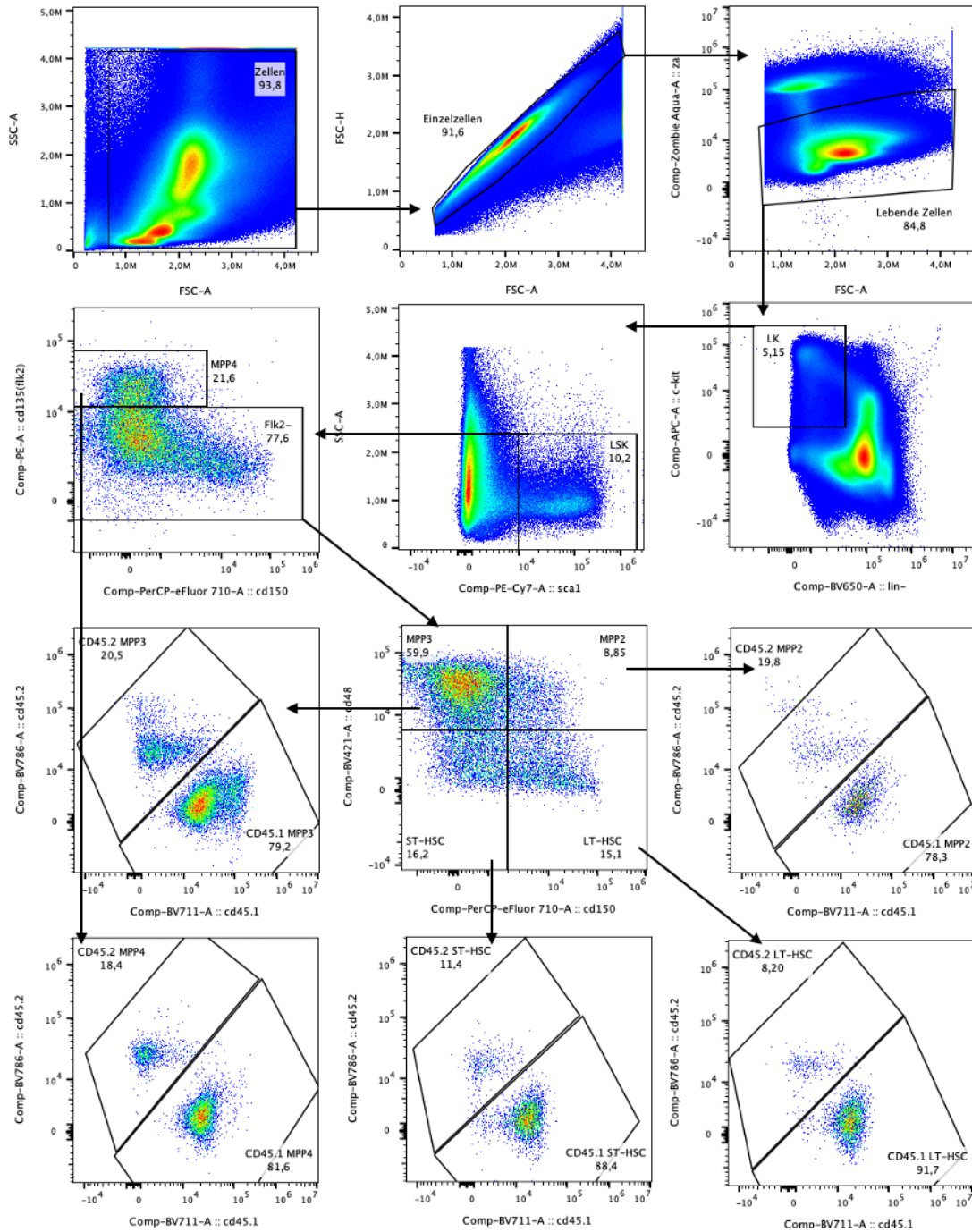
Die verschiedenen Zellpopulationen der Leukozyten im Blutkreislauf wurden entsprechend der Koexpression der Oberflächenantigene hierarchisch gegatet. Die CD45.2-Spenderzellen konnten entsprechend ihres Oberflächenmarkers von den CD45.1-Empfängerzellen differenziert werden.

### 2.4.5 Identifizierung der klonalen Expansion im Knochenmark

Analog zur Identifizierung der knochenmarksresidenten, hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen (2.4.3) wurde am Endpunkt nach sieben Wochen Behandlung das Chimärenverhältnis im Knochenmark untersucht. Das isolierte Knochenmark wurden in einem FACS<sup>®</sup>-Tube mit 1,5 ml eines hypotonen Erythrozyten-Lyse Puffers für 30 Sekunden auf Eis inkubiert. Nach Neutralisation mit 2 ml PBS wurden die Proben zentrifugiert (1800 rpm, 5 min, 4°C). Nach dem Zusatz von 100 µl *LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain* (0,115 µl/100 µl PBS) wurden die Proben für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Neutralisation mit 2 ml PEB wurden die Proben zentrifugiert (1800 rpm, 5 min, 4°C). Die folgende Färbung erfolgte mit der entsprechenden Markerkombination der biotinylierten Antikörper (Tab. 7). Das notwendige Volumen der Antikörper wurde mit PEB zu 100 µl ergänzt und mit der Probe vermischt. Nach einer Inkubation von 20 Minuten bei Raumtemperatur wurden 1,5 ml PBS hinzugesetzt und die Probe zentrifugiert (1800 rpm, 5 min, 4°C). Danach wurden zum Rückstand 100 µl der gelösten, nicht-biotinylierten Antikörper hinzugegeben (Tab. 7). Nach einer Inkubation von 20 Minuten bei Raumtemperatur wurden 1,5 ml PBS hinzugesetzt und die Probe zentrifugiert (1800 rpm, 5 min, 4°C). Danach wurde der Rückstand mit einer 1%igen PFA-Lösung für zehn Minuten im Dunkeln bei 4°C fixiert. Nach einem Waschriff mit 3 ml PEB wurden die Proben zentrifugiert (1800 rpm, 5 min, 4°C), in 400 µl PEB resuspendiert und im Aurora Durchflusszytometer von Cytel Bioscience vermessen. Die Marker richten sich nach der zu beurteilenden Zellfraktion (Tab. 11) und wurden hierarchisch gegatet (Abb. 10).

**Tabelle 11 Markerkombination zur Unterscheidung der CD45.1 und CD45.2 positiven hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen im Knochenmark.**

Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen (CD45.1 <sup>+</sup> Lin <sup>-</sup> ckit <sup>+</sup> Sca1 <sup>-</sup> oder CD45.2 <sup>+</sup> Lin <sup>-</sup> ckit <sup>+</sup> Sca1 <sup>-</sup> )	Antigenexpression
Langlebige hämatopoetische Stammzellen ( <i>long term hematopoietic stem cells</i> , LT-HSC)	CD135 <sup>-</sup> CD150 <sup>+</sup>
Kurzlebige hämatopoetische Stammzellen ( <i>short term hematopoietic stem cells</i> , ST-HSC)	CD135 <sup>-</sup> CD150 <sup>-</sup>
Multipotente Vorläuferzellen Klasse 2 ( <i>multipotent progenitors group 2</i> , MPP2)	CD135 <sup>-</sup> CD48 <sup>+</sup> CD150 <sup>+</sup>
Multipotente Vorläuferzellen Klasse 3 ( <i>multipotent progenitors group 3</i> , MPP3)	CD135 <sup>-</sup> CD48 <sup>+</sup> CD150 <sup>-</sup>
Multipotente Vorläuferzellen Klasse 3 ( <i>multipotent progenitors group 3</i> , MPP4)	CD135 <sup>+</sup> CD150 <sup>-</sup>



**Abbildung 10 Gating-Schema zur Differenzierung der klonalen Expansion der CD45.2 mutierten Donorzellen im Knochenmark.**

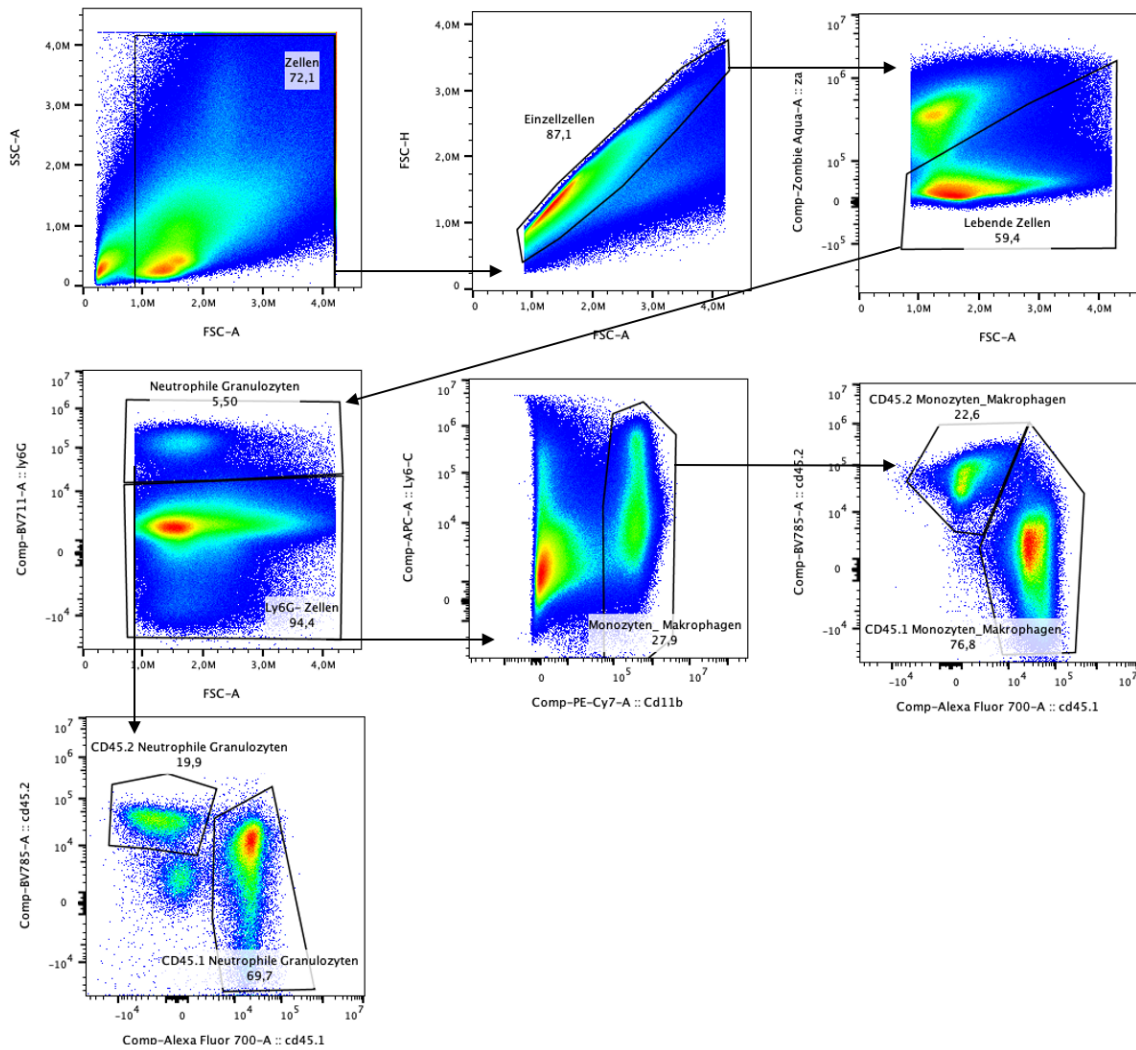
Die verschiedenen Zellpopulationen der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen im Knochenmark wurden entsprechend der Koexpression der Oberflächenantigene hierarchisch gegatet. Die CD45.2-Spenderzellen konnten entsprechend ihres Oberflächenmarkers von den CD45.1-Empfängerzellen differenziert werden. CMP, Gemeinsame Myeloide Vorläuferzellen (*common myeloid progenitors*); GMP, Granulozyten-Monozyten-Vorläuferzellen (*granulocyte monocyte progenitors*); Lin, Lineage; LSK, Lineage Sca1<sup>+</sup>ckit<sup>+</sup>; LT-HSC, Langlebige hämatopoetische Stammzellen (*long term hematopoietic stem cells*); MEP, Megakaryocyten-Erythrocyten Vorläuferzellen (*megakaryocytic-erythroid progenitors*); MPP, Multipotente Vorläuferzellen (*multipotent progenitors*); ST-HSC, Kurzlebige hämatopoetische Stammzellen (*short term hematopoietic stem cells*).

### 2.4.6 Identifizierung der klonalen Expansion im Kolongewebe

Zusätzlich wurde das Chimärenverhältnis im Kolongewebe durchflusszytometrisch untersucht. Dazu wurde das Kolongewebe durch Spülen mit einer 20 µg/ml Gentamycin-haltigen Lösung von Fäzes befreit und zur Gewinnung einer Einzelzellsuspension einem Verdauungsprozess unterzogen<sup>131</sup>. Dazu wurde das Kolon longitudinal aufgeschnitten, in 1 cm lange Stücke geschnitten und in einem 50 ml Falcon mit auf 37°C erwärmten 20 ml Vorverdaumedium (PBS, 5 mM EDTA, 14 mM HEPES, 10% FBS) bei 200 rpm für 30 Minuten in einem Orbital Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben über einen 70 µl Filter gegeben und viermalig mit PBS gewaschen. Der Rückstand wurde in einem 50 ml Falcon mit 17 ml vorgewärmtem Kolonverdaumedium (RPMI, 10% FBS, Collagenase III) bei 37°C für 45 Minuten bei 200 rpm im Orbital Schüttler inkubiert. Die Suspension wurde über einen 70 µm Filter filtriert und das Filtrat zentrifugiert (1800 rpm, 5 min, 4°C). Darauf wurde die Probe mit 177 µl *LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain* (0,115 µl/100 µl PBS) versetzt und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach einem Reinigungsschritt mit 1 ml PBS wurden die Proben unter Einsatz entsprechender Antikörper (Tab. 7) analog wie zuvor beschrieben aufgearbeitet und im Aurora Durchflusszytometer von Cytex Bioscience vermessen. Die Markerkombination richtet sich nach der zu beurteilenden Zellfraktion (Tab. 12) und wurde analog zu den ausdifferenzierten Zellen hierarchisch gegatet (Abb. 13).

**Tabelle 12 Markerkombination zur Unterscheidung der CD45.1 und CD45.2 positiven Leukozytenpopulationen im Kolongewebe**

Leukozyten (CD45.1 <sup>+</sup> oder CD45.2 <sup>+</sup> )	Antigenexpression
Neutrophile Granulozyten	Ly6G <sup>+</sup>
Monozyten/ Makrophagen	Ly6G-CD11b <sup>+</sup>



**Abbildung 11 Gating-Schema zur Differenzierung der klonalen Expansion der CD45.2 mutierten Donorzellen im Kolongewebe.**

Die verschiedenen Zellpopulationen der Leukozyten im Kolongewebe wurden entsprechend der Koexpression der Oberflächenantigene hierarchisch gegatet. Die CD45.2-Spenderzellen konnten entsprechend ihres Oberflächenmarkers von den CD45.1-Empfängerzellen differenziert werden.

## 2.5 Zellkultur

### 2.5.1 Isolation der Knochenmarksmonozyten und -neutrophilen

Die Knochenmarkseinzelsuspension wurde analog zur Aufbereitung für die Durchflusszytometrie durch Abtrennung der Epiphysen mit anschließendem Ausspülen und Filtern gewonnen. Die Isolation der Populationen von residenten Monozyten und Neutrophilen erfolgte nach dem Verfahren der magnetischen Zellseparation (*magnetic cell separation*, MACS®). Im ersten Schritt wurden die Monozyten mittels CD115 MicroBead Kit von Miltenyi Biotec nach Herstellerprotokoll in einer Positivselektion isoliert<sup>132</sup>. Das Filtrat wurde folgend zur Neutrophilen-Isolation mit dem Neutrophil Isolation Kit von Miltenyi Biotec in einer Negativselektion analog nach Herstellerprotokoll aufbereitet. Zur weiteren Analyse von DNS beziehungsweise der Ribonukleinsäure (RNS) wurden die isolierten Zellfraktionen bei -80°C gelagert.

## 2.6 Molekularbiologische Techniken

### 2.6.1 Sanger Sequenzierung knochenmarksisolierter Immunzellen

Unter Zusatz von 10 µl Trypanblau zu 10 µl der isolierten Knochenmarkszellsuspension wurde die Anzahl an Monozyten und neutrophilen Granulozyten mit einer Neubauer-Zählkammer unter einem Zeiss Stereomikroskop 305 quantifiziert. Jeweils fünf Millionen Zellen wurden pro Ansatz mit dem *DNeasy Blood & Tissue Kit* von Qiagen nach Herstellerangaben zur DNS-Extraktion aufgearbeitet.

Die isolierte DNS wurde zu 10 ng/µl mit AE-Puffer verdünnt und nach Herstellerangaben mit dem *Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase Kit* von Qiagen unter Zusatz von jeweils 1 µl der *Ppm1d*-Vorwärts- und Rückwärts-Primer zur PCR vorbereitet (Tab. 13).

**Tabelle 13 Eingesetzte Primersequenzen zur *Ppm1d*-Sequenzierung**

Gen	Symbol	Vorwärts-Primer (3' → 5')	Rückwärts-Primer (5' → 3')
Proteinphosphatase 1D	mPPM1D	TGTCTGTGTCAGTTTATTGTGC	GTGCTGGTGGAGAAGAGGAT

Eine Gesamtmenge von 20 ng DNS wurde im Bio-Rad T100 Cycler über 40 Zyklen amplifiziert (Tab. 14).

**Tabelle 14 Verwendetes Programm am Bio-Rad T100 Cycler**

Anzahl	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1x	94	5
40x	94	0,5
	63	0,5
	72	0,5
1x	72	5
1x	4	∞

Nach der PCR-Amplifikation des Genfragments erfolgte die Aufreinigung mittels Gelelektrophorese auf einem Agarose-Gel für 45 Minuten bei einer konstanten Spannung von 80 V bei maximaler Stromstärke. Das *Ppm1d*-Fragment wurde mittels 100 Basenpaar MG-Marker bei 597 Basenpaaren identifiziert, ausgeschnitten und anschließend mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* von Qiagen extrahiert. Nach Vermessung im Nanodrop wurde das Volumen für 120 ng DNS mit 1 µl Primer (10 pmol/l) zu 7 µl mit RNS-freiem Wasser ergänzt und zur Sequenzierung an das Unternehmen Star\*Seq GmbH mit Hauptsitz in Mainz verschickt. Pro Probe wurde jeweils ein Ansatz mit enthaltenem Vorwärts- beziehungsweise Rückwärts-Primer sequenziert (Tab. 13). Zur Bestätigung einer vorhandenen Mutation fand die Sequenzierung sowohl vom 3'- zum 5'-Ende als auch vom 5'- zum 3'-Ende, statt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der Software *SnapGene Viewer 5.3.2* hinsichtlich des Auftretens von Mutationen analysiert. Die analysierte Sequenz auf Exon sechs erstreckte sich über einen Bereich von zirka 570 bis 580 Basenpaare.

### 2.6.2 RNS-Extraktion

Zirka 30 mg gefrorenes Kolongewebe wurden unter Zusatz von 700 µl *peqGOLD TriFast™* Reagenz mit einem *TissueRuptor* mittels Rotor/Stator-Prinzip mechanisch zu einer Einzelzellsuspension zerkleinert. Die RNS-Isolierung fand nach Herstelleranweisung mit dem *Qiagen RNeasy Minikit* von Qiagen statt. Die RNS-Qualität sowie Konzentration wurde mittels



NanoDrop™ 1000 Spektrophotometer durch die Quotienten der Absorptionsmessungen bei 230 nm, 260 nm und 280 nm berechnet.

Zum Abbau genomischer DNS wurden Ansätze zu jeweils 250 ng isolierter RNS nach Herstellerangaben mit einer DNase I versetzt und anschließend in einem 20 µl Ansatz mittels *iScript cDNA-Synthesis Kit* in cDNA umgeschrieben. 5 µl der cDNA-Lösung wurden mit 100 µl RNase-freiem Wasser verdünnt.

### 2.6.3 Reverse Transkription

Die Probe wurde zu einer Konzentration von 200 ng/µl mit RNS-freiem Wasser verdünnt. 5 µl der Probe wurden zu 12 µl mit RNS-freiem Wasser in einem PCR-*LowBind Tube* ergänzt und nach Herstellerangabe mit dem *QuantiTect Reverse Transcription Kit* von Qiagen aufgearbeitet. Die transkribierte c (*complementary*)-DNS wurde in 100 µl RNS-freiem Wasser bei -20°C aufbewahrt.

### 2.6.4 Quantitative Polymerase-Ketten Reaktion

Die quantitative Echtzeit-Reverse-Transkriptase-PCR (*quantitative real-time reverse transcription PCR*, qRT-PCR) wurde in einer 96-Loch-Platte mit dem *SensiFAST™ SYBR NoROX Kit* unter Verwendung eines *BioRad CFX96 Touch Real-Time OCR Detection System C1000 Touch Thermal Cyclers* in Kombination mit dem *BioRad CFX Manager 3.1* durchgeführt. Pro Messansatz wurden je 5 µl verdünnte cDNS (4,166 ng/µl), 10 µl *Sensifast SYBR Mix*, 1 µl Vorwärts- und Rückwärts-Primer (0,25 ng/µl), sowie 3 µl RNase-freies Wasser verwendet. Alle Proben wurden in einer Zweifachbestimmung gemessen und die relative m (*messenger*)-RNS-Expression mithilfe des  $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ -Verfahrens berechnet. Als interner Standard zur Quantifizierung wurde 18S r (ribosomale)-RNS verwendet.

**Tabelle 15** Eingesetzte qPCR-Primersequenzen

Gen	Symbol	Vorwärts-Primer (3' → 5')	Rückwärts-Primer (5' → 3')
18S	<i>18S</i>	GCAATTATTCATGAACG	GGCCTCACTAAACCATCCAA
<i>Brain and muscle Arnt like protein 1</i>	<i>Bmal1</i>	CCAAGAAAGTATGGACAGACAAA	GCATTCTTGATCCTTCCTTGGT
<i>Period circadian regulator 2</i>	<i>Per2</i>	ATGCTCGCCATCCACAAGA	GCGGAATCGAATGGGAGAAT

### 2.6.5 ELISA von Inflammationsmarkern

Die Zytokin-Bestimmung von IL-6 und TNF-alpha fand unter Verwendung des *IL-6 Mouse ELISA Kit* (Cat.No. KMC0061) und *TNF alpha Mouse ELISA Kit* (Cat.No. BMS607-3) von Thermo Fisher nach Herstellerangaben statt. Die Vermessung der Proben erfolgte mittels *SpectraMax iD3* Spektrophotometer. Anhand der erhaltenen Regressionsgerade wurden die Probenkonzentrationen berechnet.

## 2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Software *GraphPad Prism* Version 9.3.0 der Firma GraphPad Software. Die Darstellung der Daten erfolgte als Mittelwert und Standardabweichung (*standard deviation*, SD) unter Ausschluss von Ausreißern nach Feststellung mittels ROUT (*Robust regression and Outlier removal*) -Test. Auf eine Gauß'sche Normalverteilung wurde mittels Shapiro-Wilk-Test getestet. Der Vergleich zweier Datensätze erfolgte mittels ungepaartem zweiseitigen *Student t-test*. Die statistische Analyse bei mehr als zwei Datensätzen innerhalb einer grafischen Darstellung fand unter Einsatz einer einbeziehungsweise zweifaktoriellen Varianzanalyse (*two-way Analysis of variance; ANOVA*) statt. Ein P-Wert (*probability value*)  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikanter Unterschied im Datensatzvergleich angenommen.

### 3 Ergebnisse

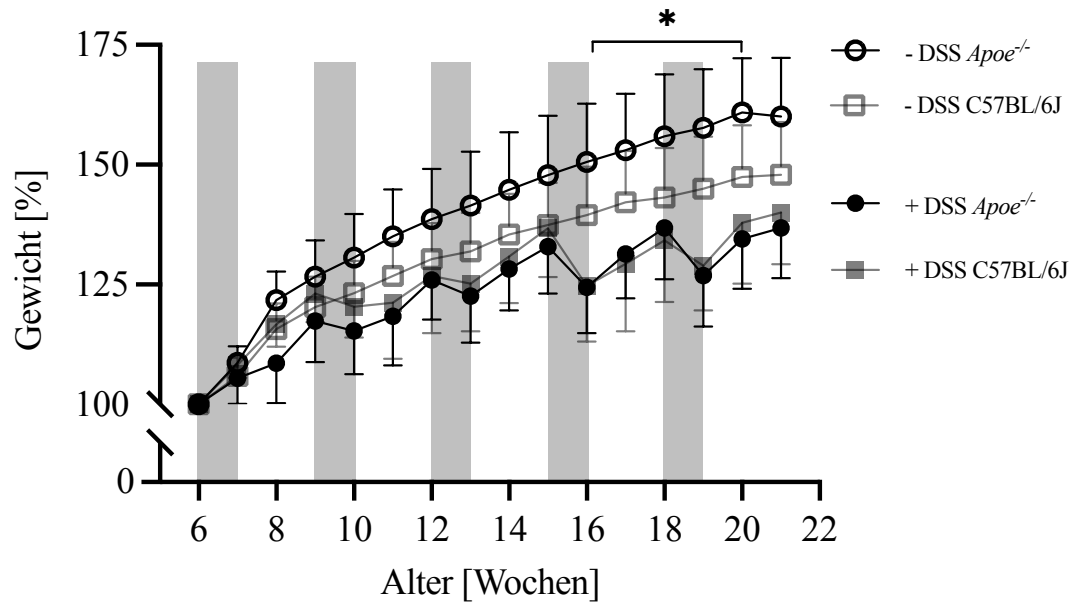
Sämtliche generierte Daten stammen aus den Experimenten, die am Institut für Translationale Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (HHU) und dem *Cardiovascular Research Center* (CVRV) der UVA in Charlottesville durchgeführt wurden. Die Versuche konzentrierten sich im Speziellen auf die Frage, ob der chronische Verlauf einer Kolitis ulzerosa einen direkten Einfluss auf das hämatopoetische Stammzellsystem hat und inwiefern sich die Expansion mutierter Treiber-Gene in diesem Kontext verhält.

#### 3.1 Experimentell-induzierte Kolitis in C57BL/6J und *ApoE*-defizienten Mäusen

Zur Darstellung der auch in Patienten klinisch relevanten Kolitisform, bestehend aus akuten inflammatorischen Schüben und Phasen der Remission, wurde das Mausmodell der experimentell-induzierten Kolitis mit DSS-Gabe über mehrere Zyklen gewählt. Um Methodenrobustheit und -eignung zu bewerten, wurde die Stärke der induzierten Kolitis anhand verschiedener Faktoren beurteilt. Zur Beurteilung, inwieweit eine chronisch, niederschwellige Entzündung sich auf das Knochenmark auswirkt, wurden C57BL/6J und *ApoE*-defiziente Tiere bezüglich des DSS-Effekts miteinander verglichen. Im Verlauf der Behandlung wurde die Entzündungsstärke anhand der generellen physiologischen Kondition, dem Auftreten von sichtbaren Blutspuren im Stuhl und des Gewichts in regelmäßigen Abständen kontrolliert.

##### 3.1.1 Bewertung des Schweregrads anhand des Gewichtsverlaufs

Die Gewichtsbestimmung erfolgte jeweils zum Beginn und Ende des akuten DSS-induzierten Schubs sowie innerhalb der Remissionsphase sieben Tage nach Zyklusende. Im Behandlungsverlauf, in dem die Mäuse einen erwarteten wöchentlichen Gewichtszuwachs von 5-8% verzeichnen sollten<sup>133</sup>, konnte am Ende eines akuten Kolitisschubs ein deutlicher Gewichtsverlust von durchschnittlich 6-10% beobachtet werden. Dieser stieg bei zunehmender Zyklusanzahl weiter an (Abb. 12). Innerhalb der Remission war die prozentuale Geschwindigkeit des Gewichtszuwachses [%/ Woche] vergleichbar mit dem der Kontrollgruppen, jedoch wurde das Gewichtsniveau der Kontrollgruppen nicht wieder erreicht. Dieser Trend zeigte sich ab Ende des vierten Zyklus auch als statistisch signifikantes Ergebnis. C57BL/6J und *ApoE*-defiziente Tiere zeigten einen vergleichbaren Effekt auf die Behandlung, ein entsprechender *ApoE*<sup>-/-</sup>-abhängiger Effekt auf die DSS-Behandlung konnte nicht notiert werden.



**Abbildung 12** Reduzierte Gewichtszunahme in C57BL/6J und *Apoe*-defizienten Mäusen nach experimentell induzierter Kolitis.

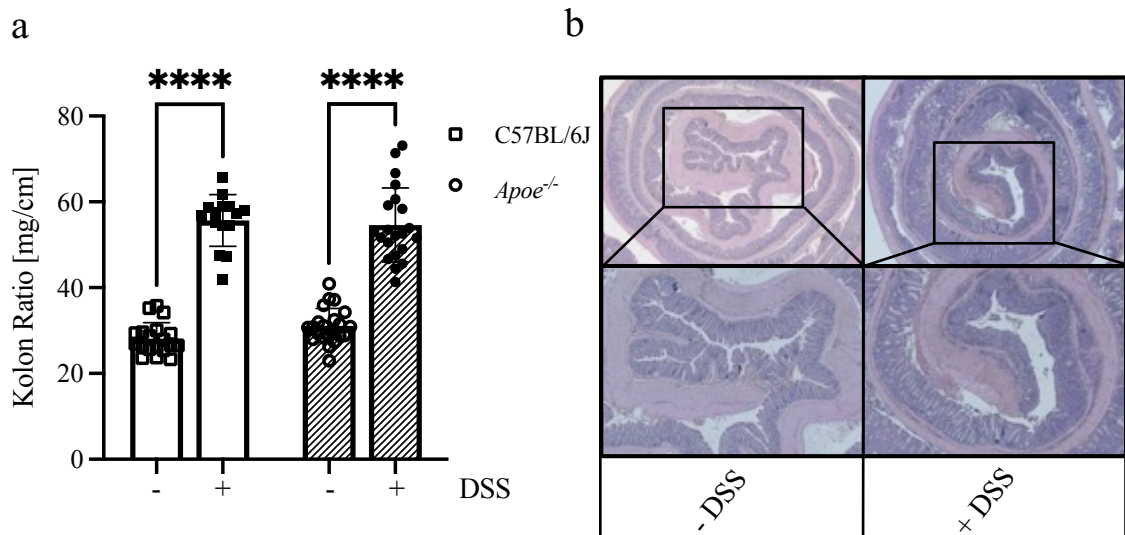
Die experimentelle Kolitis wurde in fünf bis sieben Wochen alten C57BL/6J und *Apoe*-defizienten Mäusen mit einer 1,5%igen Lösung von Dextranatriumsulfat (DSS) über fünf Zyklen zu je einer Woche über einen Zeitraum von 15 Wochen induziert. Kontrolltiere erhielten Leitungswasser über die gesamte Zeitperiode. Die grauen Säulen repräsentieren das Intervall in dem DSS mit dem Trinkwasser appliziert wurde. Dargestellt sind die Gewichtszunahme von C57BL/6J (n=20, 24) und *Apoe*-defizienten (n=19, 27) Mäusen als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. \*  $P < 0.05$  (basierend auf einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (*two-way Analysis of variance, ANOVA*)).

### 3.1.2 Veränderung der Kolonmorphologie im Verlauf der chronischen Kolitis

Der direkte Einfluss der Behandlung auf die Kolonstruktur und die Verifizierung der Kolitis wurden am Versuchsendpunkt nach 15 Wochen am entnommenen Organ festgestellt. Die Beurteilung der morphologischen Veränderung des Kolons diente im Speziellen der Festlegung des Grads der induzierten Kolitis sowie als Maßstab, ob die induzierte Entzündung im erwarteten Ausmaß stattgefunden hatte und das Modell somit für die weiterführenden Analysen geeignet war.

Durch die Betrachtung des isolierten Kolons konnten bereits deutliche Unterschiede in den Proben festgestellt werden. Zur vereinfachten Erkennung der einzelnen Wandstrukturen wurden diese mittels H&E-Färbung angefärbt (Abb. 13b). Der Vergleich von Kontrolle und Behandlung visualisierte einen Verlust der typischen Kolonstruktur, insofern als die klassischen Strukturen der Krypten des Dickdarms unter Behandlung mit DSS kaum noch erkennbar waren und zusätzlich Veränderungen in Form erhöhter Immunzellinfiltration innerhalb der Submukosa auftraten. Der pathologische, entzündliche Zustand nach Behandlung konnte anhand der Bestimmung von Länge und Gewicht morphologisch bestätigt werden (Abb. 13a). In dem

Verhältnis aus Gewicht pro Längeneinheit zeigte sich ein ödematöser Zustand auf. Die Darmproben der DSS-Gruppen wiesen eine zusammengeschrumpfte Form auf, bei erhöhtem Gewicht. Im Vergleich der Kolon Ratio konnte morphologisch kein Unterschied im Modell der *Apoe*-Defizienz nachgewiesen werden.

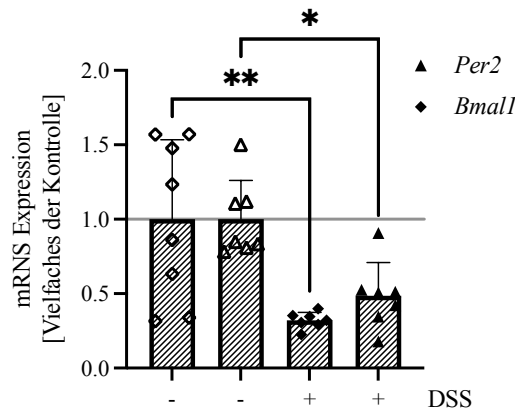


**Abbildung 13 Morphologische Veränderungen des Kolons in DSS-behandelten C57BL/6J und *Apoe*-defizienten Mäusen.**

Die experimentelle Kolitis wurde in fünf bis sieben Wochen alten C57BL/6J und *Apoe*-defizienten Mäusen mit einer 1,5%igen Lösung von Dextranatriumsulfat (DSS) über fünf Zyklen zu je einer Woche über einen Zeitraum von 15 Wochen induziert. Kontrolltiere erhielten Leitungswasser über die gesamte Zeitperiode. Das Kolon wurde nach 15 Wochen Behandlung entfernt, durch Spülen von Fäzes befreit und morphologische Veränderungen wurden mittels histologischer Färbung sowie anhand von Länge und Gewicht beurteilt. Dargestellt ist (a) die Kolonlänge bezogen auf das Kolongewicht und (b) eine Querschnittsaufnahmen des distal nach proximal gerollten Kolons nach H&E-Färbung von C57BL/6J Mäusen (n=18, 16) und *Apoe*-defizienten (n=22, 22) Mäusen. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. \*\*\*\* P < 0.0001 (basierend auf einer zweifaktoriellen Varianzanalyse).

### 3.1.3 Beeinflussung der circadianen Rhythmik unter Einfluss einer chronischen Kolitis

Die initiale Manifestation der CED, sowie der Inflamationsgrad im Kolon wurden anhand des Einflusses auf die in der circadianen Rhythmik relevanten Marker evaluiert. Zur Analyse der circadianen Rhythmik unter dem Einfluss einer chronischen Entzündung wurden die mRNA-Level des aktiven Regulators *Bmal1* und des von diesem regulierten Inhibitors *Per2* im Kolongewebe *Apoe*-defizienter Mäuse 15 Wochen nach Behandlung mittels qRT-PCR quantifiziert. Unter dem Einfluss der Behandlung ließ sich eine signifikante Abnahme der *Bmal1* und *Per2* mRNA-Konzentration am Ursprungsort der Entzündung im Kolon feststellen (Abb. 14).



**Abbildung 14** Verringerte mRNS-Level von *Bmal1* und *Per2* im intestinalen Gewebe DSS-behandelter *Apoe*-defizienter Mäuse.

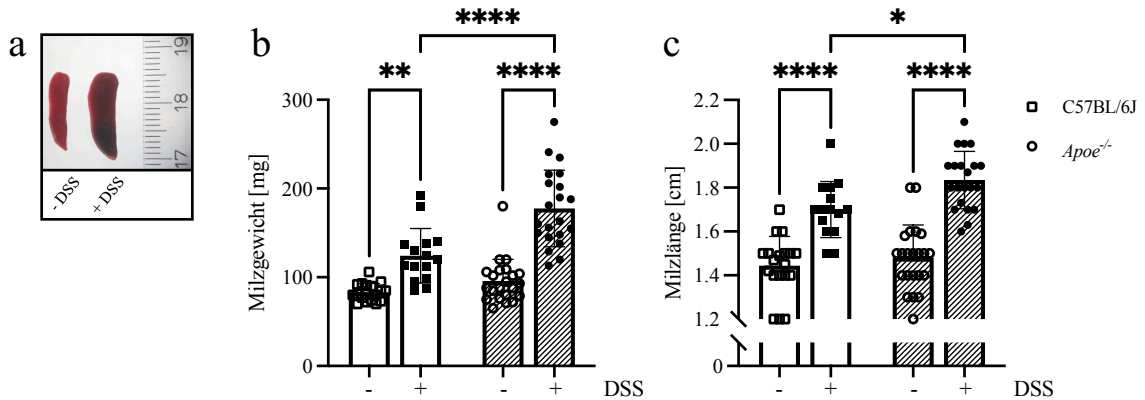
Die experimentelle Kolitis wurde in fünf bis sieben Wochen alten *Apoe*-defizienten Mäusen mit einer 1,5%igen Lösung von Dextranatriumsulfat (DSS) über fünf Zyklen zu je einer Woche über einen Zeitraum von 15 Wochen induziert. Kontrolltiere erhielten Leitungswasser über die gesamte Zeitperiode. Das Kolon wurde nach 15 Wochen Behandlung entfernt, von Fäzes durch Spülen befreit und die RNS extrahiert. Die RNS-Level von *Bmal1* und *Per2* im intestinalen Gewebe wurden mittels qRT-PCR untersucht (n=8, 7). Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 (basierend auf einem ungepaarten *Students t-test*).

## 3.2 Einfluss der chronischen Kolitis auf die Milz und Aorta

Inwiefern die lokale Entzündung im intestinalen Gewebe eine Beeinflussung auf weitere Organe darstellt, wurde anhand morphologischer Veränderungen von Milz und Aorta untersucht. Grundsätzlich stellt die Milz als Speicherort myeloider Zellen ein wichtiges Organ in der Regulation der Homöostase von Immunzellen dar. Zudem könnte die Aorta als größtes arterielles Gefäß direkt von einer solchen Dysregulation entzündlicher Konditionen negativ betroffen sein.

### 3.2.1 Milz

Unter dem Einfluss einer chronischen Kolitis konnte ein Wachstum in Milzgröße und -gewicht der Behandlungsgruppe beobachtet werden (Abb. 15). Zwei Wochen nach der letzten DSS-Gabe und somit in der Phase der Remission zeigte die Milz noch immer die morphologischen Veränderungen auf. Die *Apoe*-defiziente Prädisposition zeigte ein erhöhtes Milzwachstum auf. Eine dadurch möglicherweise verstärkte Bereitstellung zellulärer Bestandteile des nativen Immunsystems wurde über Untersuchung der zirkulierenden Immunzellen analysiert.

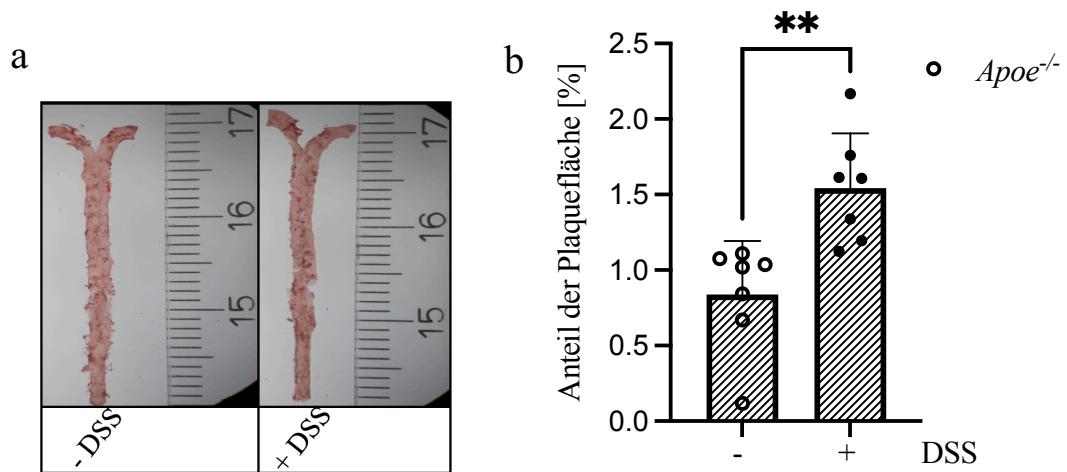


**Abbildung 15 Morphologische Veränderungen der Milz in DSS-behandelten C57BL/6J und *Apoe*-defizienten Mäusen.**

Die experimentelle Kolitis wurde in fünf bis sieben Wochen alten C57BL/6J und *Apoe*-defizienten Mäusen mit einer 1,5%igen Lösung von Dextranatriumsulfat (DSS) über fünf Zyklen zu je einer Woche über einen Zeitraum von 15 Wochen induziert. Kontrolltiere erhielten Leitungswasser über die gesamte Zeitperiode. Die Milz wurde nach 15 Wochen Behandlung entfernt und morphologische Veränderungen wurden anhand von Gewicht und Länge beurteilt. Dargestellt sind (a) exemplarische Längsaufnahmen der Milz unter dem Lichtmikroskop, (b) das Milzgewicht und (c) die -länge von C57BL/6J (n=18, 16) und *Apoe*-defizienten Mäusen (n=22, 22). Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung. \* P < 0,05, \*\* P < 0,01, \*\*\*\* P < 0,0001 (basierend auf einer zweifaktoriellen Varianzanalyse).

### 3.2.2 Aorta

Das kardiovaskuläre Risiko einer chronischen Kolitis wurde anhand der atherosklerotischen Plaque-Belastung der Aorta beurteilt. Da wie bereits in den Vorarbeiten erwähnt, *Apoe*-defiziente Mäuse proximale Plaque-Ablagerungen in der Aorta ausbilden, wurde eine Verstärkung von diesem Effekt nur im *Apoe*<sup>-/-</sup>-Genotyp untersucht. Zur Auswertung wurden die Aorten einem Längsschnitt unterzogen und die fettreichen Plaques mittels ORO-Färbung visualisiert. Der prozentuale Anteil der Plaquefläche an der Gesamtfläche der Aorta wurde anhand der Farbintensität quantifiziert. Die mit DSS-behandelten Mäuse wiesen nach 15 Wochen, am Endpunkt der chronischen Kolitis, eine um das Doppelte zunehmende Fläche atherosklerotischer Plaques in der Aorta auf (Abb. 16).



**Abbildung 16 Erhöhte Plaquebelastung der Aorta in DSS-behandelten *ApoE*-defizienten Mäusen.**

Die experimentelle Kolitis wurde in fünf bis sieben Wochen alten *ApoE*-defizienten Mäusen mit einer 1,5%igen Lösung von Dextranatriumsulfat (DSS) über fünf Zyklen zu je einer Woche über einen Zeitraum von 15 Wochen induziert. Kontrolltiere erhielten Leitungswasser über die gesamte Zeitperiode. Die Aorta wurde nach 15 Wochen Behandlung entfernt und die Plaquebelastung wurde nach Öl-Rot-O (ORO)-Färbung beurteilt. Dargestellt ist (a) eine Längsschnittaufnahme der Aorta nach ORO-Färbung und (b) die prozentuale Plaquebelastung der *ApoE*-defizienten Mäuse ( $n=7, 7$ ). Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. **\*\***  $P < 0.01$  (basierend auf einem ungepaarten *Student's t-test*).

### 3.3 Einfluss der chronischen Kolitis auf die Immunzellbildung

Wie in Abschnitt 3.2 geschildert, induziert die experimentelle Kolitis morphologische Veränderungen neben dem Kolon auch in der Milz und Aorta. Um die Beobachtung dieser entzündungsbedingten Modulation zu bestätigen, wurde die Immunzellkomposition im Blut und Knochenmark unter DSS-Behandlung bewertet.

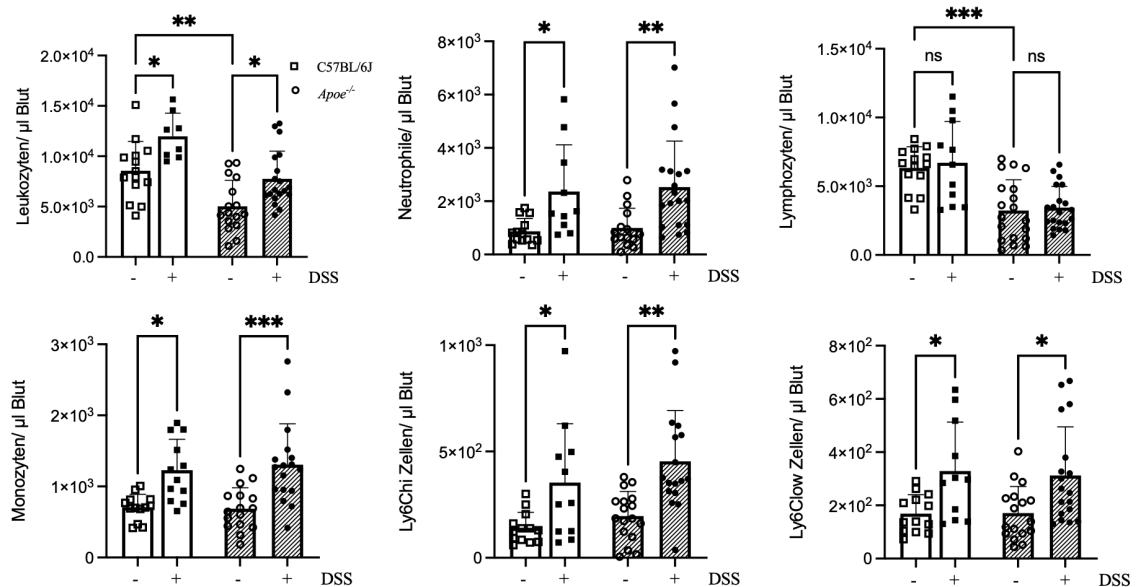
Zur tieferen Bewertung der Auswirkungen der experimentellen Kolitis auf zellulärer Ebene wurden das periphere Blut sowie das Knochenmark als wichtiges hämatopoetisch aktives Organ hinsichtlich Kolitis-induzierter Veränderungen mittels durchflusszytometrischer Untersuchung analysiert. Von speziellem Interesse waren die peripheren, myeloiden Immunzellen und deren Formation aus den hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark.



### 3.3.1 Zirkulierende Immunzellen

Zur Überprüfung des aus den vorherigen Versuchen festgestellten systemisch inflammatorischen Phänotyps der CED wurde nach 15-wöchiger Behandlung die absolute Zellzahl ausdifferenzierter Immunzellen im Blutkreislaufsystem analysiert.

Die Daten zeigten, dass die induzierte Kolitis mit einer signifikant erhöhten Anzahl an Leukozyten, im Speziellen der myeloiden Fraktion von Neutrophilen und Monozyten, sowie den Ly6C-Monozyten Subpopulationen, einherging und dieser Effekt auch zwei Wochen nach der letzten DSS-Applikation zu beobachten war (Abb. 17). Die Lymphozyten waren indes von der Behandlung nicht betroffen. Im Vergleich des C57BL/6- und *ApoE*-defizienten Hintergrunds zeigte sich ein Unterschied der Gesamtanzahl von Leukozyten im peripheren Blut. Die verringerte Anzahl der Leukozyten im *ApoE*<sup>-/-</sup>-Modell lässt sich auf eine Abnahme der Zellfraktion der Lymphozyten zurückführen. Die myeloide Zelllinie verhielt sich unbeeinflusst vom genetischen Hintergrund analog in Bezug auf die experimentelle Kolitisinduktion.

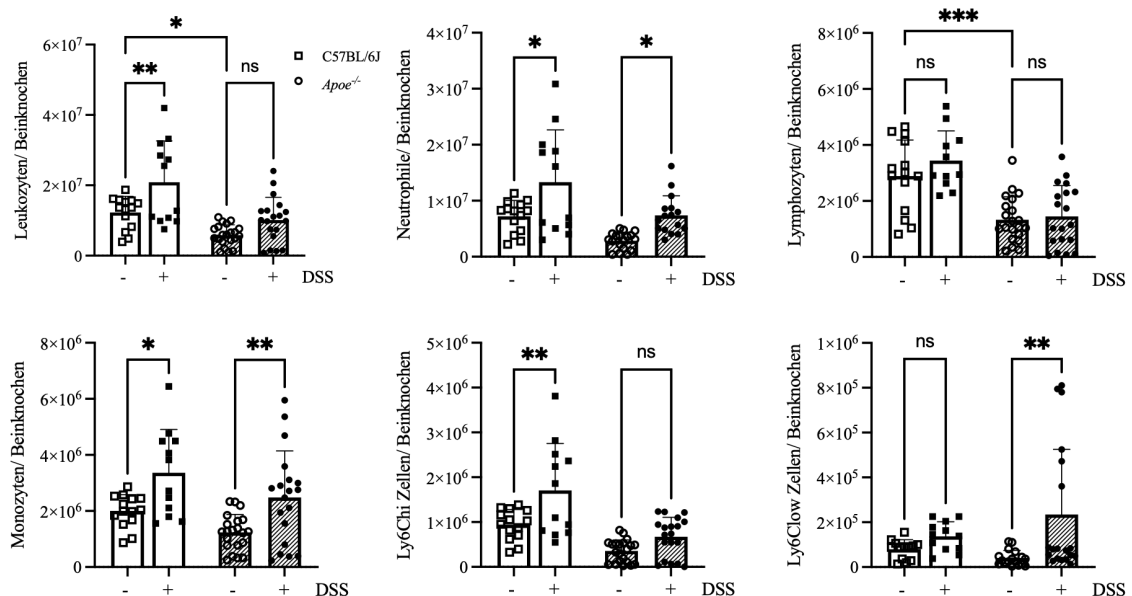


**Abbildung 17 Erhöhte Anzahl zirkulierender Leukozyten in experimentell-induzierter Kolitis.**

Die experimentelle Kolitis wurde in fünf bis sieben Wochen alten C57BL/6J und *ApoE*-defizienten Mäusen mit einer 1,5%igen Lösung von Dextrantrisulfat (DSS) über fünf Zyklen zu je einer Woche über einen Zeitraum von 15 Wochen induziert. Kontrolltiere erhielten Leitungswasser über die gesamte Zeitperiode. 15 Wochen nach Behandlung wurde das kardiale Blut der C57BL/6J (n=13, 12) und *ApoE*-defizienten (n=19, 15) Mäuse durchflusszytometrisch analysiert und die absolute Immunzellanzahl pro µl Blut quantifiziert. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung. \* P < 0,05, \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001 (basierend auf einer zweifaktoriellen Varianzanalyse).

### 3.3.2 Knochenmarksresidente Immunzellen

Die Ergebnisse aus der Messung der peripheren Immunzellen indizieren eine angeregte Hämatopoese myeloider Zellen. Deshalb wurde als Ursprung dieser das Knochenmark hinsichtlich der zellulären Zusammensetzung ausdifferenzierter Zellen analog zur Zirkulation untersucht. Die durchflusszytometrische Untersuchung der knochenmarksresidenten Leukozyten wies die gleiche Verteilung wie im peripheren Blut auf, mit einer speziell erhöhten Anzahl von Neutrophilen und Monozyten sowie den entsprechenden Ly6C<sup>high</sup>- und Ly6C<sup>low</sup>-Subpopulationen (Abb. 18). Analog zum Blutbild waren die im Knochenmark vorkommenden Lymphozyten von der DSS-Behandlung in ihrer absoluten Zellzahl nicht betroffen. Hingegen zeigte sich wie auch im Blut eine verminderte Anzahl von Lymphozyten innerhalb des *ApoE*<sup>-/-</sup>-Hintergrunds in einer vergleichbaren Größenordnung. Demgegenüber zeigten die myeloiden Fraktion bei beiden Genotypen ein vergleichbares Ausmaß. Das vermehrte Vorkommen dieser Zellen im Knochenmark, als Reaktion auf die rezidivierende CED, begünstigt somit die beschriebene akzelerierte Rekrutierung in die Blutbahn und stellt somit auch ein erhöhtes Risiko für weitere entzündliche Krankheitsbilder dar. Neben der Speicherung reifer Leukozyten liegt die Hauptaufgabe des Knochenmarks in entsprechender Neubildung dieser Zellen aus HSPCs, welche daraufhin untersucht wurden.

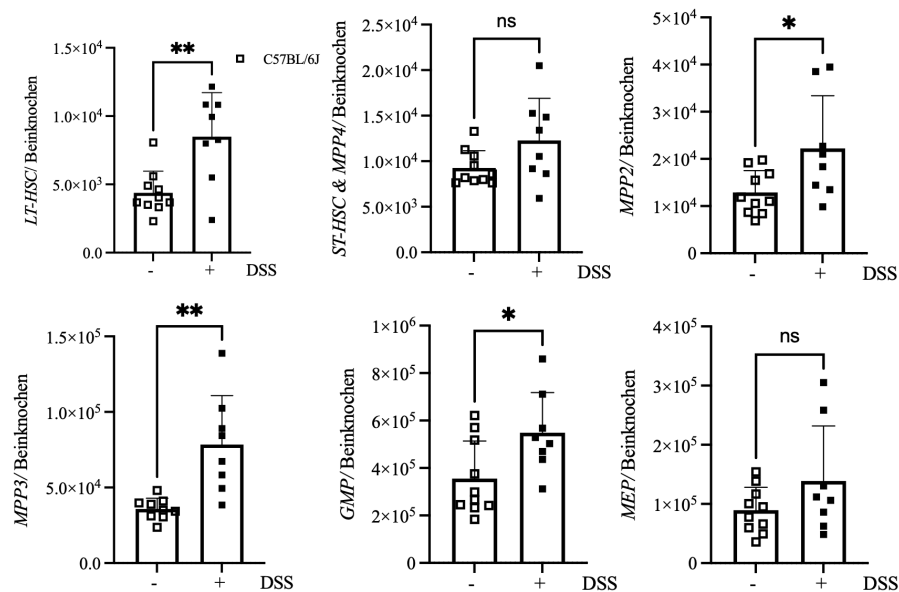


**Abbildung 18 Erhöhte knochenmarksresidente Leukozyten in experimentell-induzierter Kolitis.**

Die experimentelle Kolitis wurde in fünf bis sieben Wochen alten C57BL/6J und *ApoE*-defizienten Mäusen mit einer 1,5%igen Lösung von Dextrannatriumsulfat (DSS) über fünf Zyklen zu je einer Woche über einen Zeitraum von 15 Wochen induziert. Kontrolltiere erhielten Leitungswasser über die gesamte Zeitperiode. 15 Wochen nach Behandlung wurde das Knochenmark der *ApoE*-defizienten (n=19, 15) und C57BL/6J Mäuse (n=14, 12) durchflusszytometrisch analysiert und die absolute Immunzellanzahl pro Bein quantifiziert. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  (basierend auf einer zweifaktoriellen Varianzanalyse).

### 3.3.3 Stamm- und Vorläuferzellen im Knochenmark

Innerhalb der hierarchischen Struktur des hämatopoetischen Systems kommt den langlebigen hämatopoetischen Stammzellen (*long term hematopoietic stem cells*, LT-HSC), den multipotenten Vorläuferzellen der Gruppe 2 und 3 (*multipotent progenitors group 2/3*, MPP2/3) und den Granulozyten-Monozyten Vorläuferzellen (*granulocyte-monocyte progenitors*, GMP) eine wichtige Rolle in der Reifung ausdifferenzierter neutrophiler Granulozyten und Monozyten zu<sup>134</sup>. Da der C57BL/6J und *ApoE*-defiziente Genotyp keinen Unterschied hinsichtlich der myeloiden Zellen in der Blutbahn hatte, wurden die Stammzellen nur im C57BL/6J Modell untersucht. Die durchflusszytometrische Analyse dieser Populationen zeigte eine signifikante Erhöhung innerhalb der Remissionsphase nach fünf Behandlungszyklen auf (Abb. 19). Weitere Vorläuferpopulationen, wie die der lymphatischen (*common lymphoid progenitors*, CLP) oder Erythrozytenvorläuferzellen (*megakaryocytic-erythroid progenitors*, MEP) waren von der DSS-Behandlung nicht betroffen.



**Abbildung 19 Erhöhte Vorläuferzellanzahl der neutrophilen Granulozyten und Monozyten im Knochenmark in experimentell-induzierter Kolitis.**

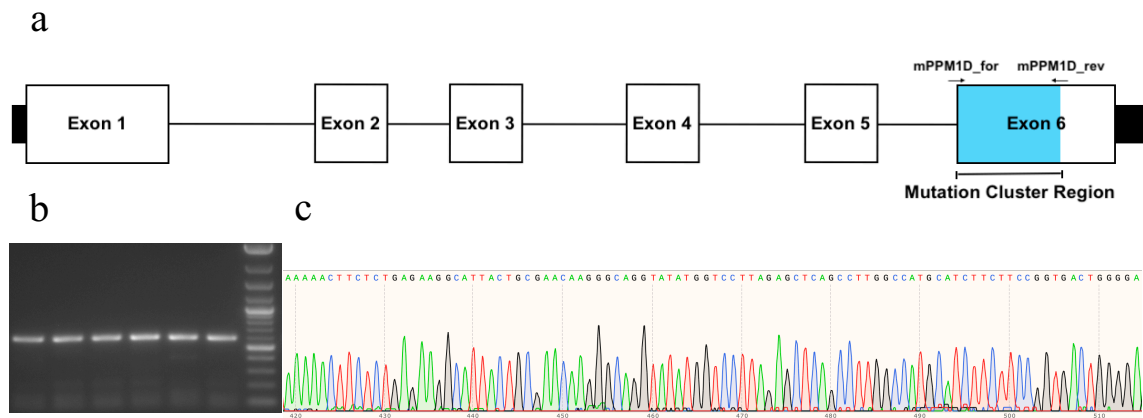
Die experimentelle Kolitis wurde in fünf bis sieben Wochen alten C57BL/6J-Mäusen mit einer 1,5%igen Lösung von Dextranatriumsulfat (DSS) über fünf Zyklen zu je einer Woche über einen Zeitraum von 15 Wochen induziert. Kontrolltiere erhielten Leitungswasser über die gesamte Zeitperiode. 15 Wochen nach Behandlung wurde das Knochenmark der C57BL/6J Mäuse (n=10, 8) durchflusszytometrisch analysiert und die absolute Immunzellanzahl pro Bein (Femur/ Tibia) quantifiziert. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. \* P < 0,05, \*\* P < 0,01 (basierend auf einem ungepaarten *Students t-test*). GMP, Granulozyten-Monozyten-Vorläuferzellen (*granulocyte monocyte progenitors*); LT-HSC, Langlebige hämatopoetische Stammzellen (*long term hematopoietic stem cells*); MEP, Megakaryocyten-Erythrocyten Vorläuferzellen (*megakaryocytic-erythroid progenitors*); MPP, Multipotente Vorläuferzellen (*multipotent progenitors*); ST-HSC, Kurzlebige hämatopoetische Stammzellen (*short term hematopoietic stem cells*)

### **3.4 Wechselseitiger Einfluss einer chronischen Kolitis und der klonalen Hämatopoese**

Die Beobachtungen aus den vorherigen Experimenten wiesen neben dem generellen, proinflammatorischen Phänotyp eine anhaltende geförderte myeloide Hämatopoese auch innerhalb der Remissionsphase zwei Wochen nach der letzten DSS-Applikation auf. Da sich im Vergleich des *ApoE*-defizienten Genotyps zum C57BL/6J-Hintergrund keine phänotypischen Veränderungen im Modell der CED feststellen ließen, wurden die Transplantationsstudien zur Beurteilung einer inflammatorisch bedingten Expansion nachfolgend in C57BL/6J Tieren untersucht.

#### **3.4.1 Einfluss der chronischen Kolitis auf die Entstehung somatischer *Ppm1d* Mutationen in reifen Knochenmarkszellen**

In einem ersten Schritt wurde die Rolle von *Ppm1d* im murinen Modell untersucht. Zur Analyse möglicher, durch CED induzierter, somatischer Mutationen der DNS von Neutrophilen und Monozyten, wurden deren DNS auf mutationsbedingte Veränderungen innerhalb der Mutationsclusterregion auf Exon 6 untersucht (Abb. 20a, b). Um eine vorhandene Mutation bestätigen zu können, wurde der Genabschnitt jeweils mit einem Vorwärts-, sowie Rückwärts-Primer sequenziert. Eine vorliegende Mutation würde innerhalb der Basenabfolge einen doppelten Ausschlag zweier voneinander verschiedener Basen geben (Abb. 20c). Innerhalb der Datensätze mit einer Stichprobenanzahl von mindestens fünf und maximal acht Proben konnte weder bei den Neutrophilen noch bei den Monozyten eine Mutation und somit ein Einfluss der experimentell-induzierten Kolitis gefunden werden.



**Abbildung 20 *Ppm1d*-Sequenzierung knochenmarksresidenter neutrophiler Granulozyten und Monozyten zeigt keine Evidenz induzierter somatischer Mutationen.**

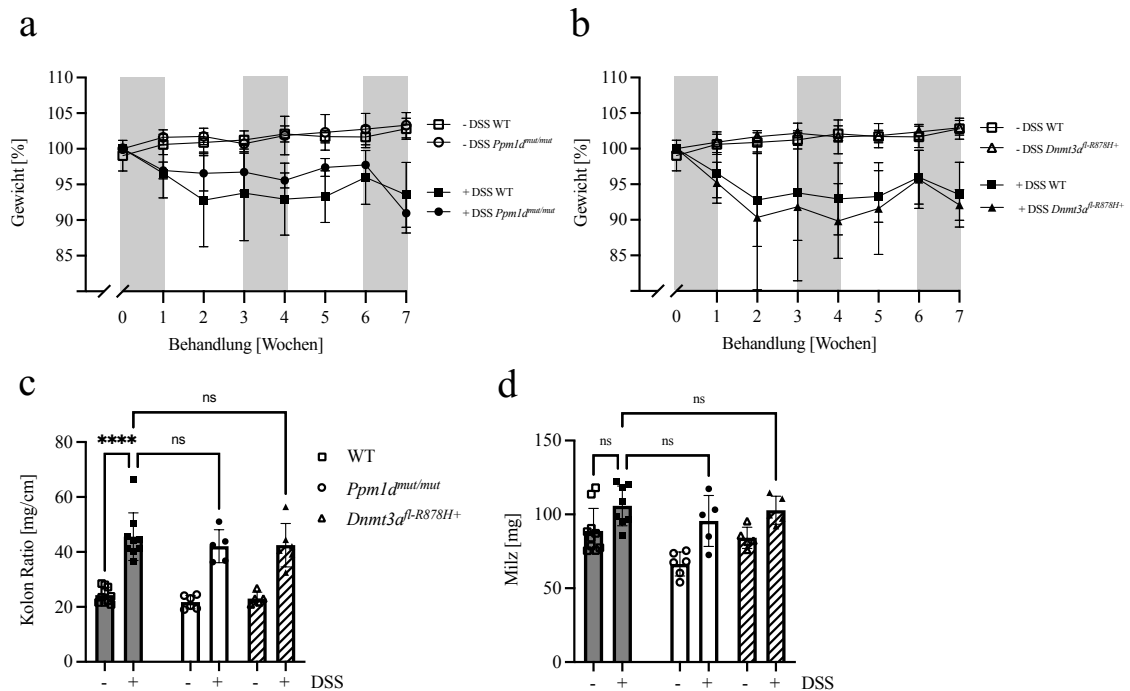
Die experimentelle Kolitis wurde in fünf bis sieben Wochen alten *ApoE*-defizienten Mäusen mit einer 1,5%igen Lösung von Dextrannatriumsulfat (DSS) über fünf Zyklen zu je einer Woche über einen Zeitraum von 15 Wochen induziert. Kontrolltiere erhielten Leitungswasser über die gesamte Zeitperiode. 15 Wochen nach Behandlung wurde das Knochenmark der C57BL/6J-Mäuse isoliert und Monozyten (n=5, 5) und neutrophile Granulozyten (n=6, 8) mittels magnetischer Zellseparation (*magnetic cell separation*, MACS<sup>®</sup>) gewonnen. Die DNS wurde anschließend isoliert. Ein *Ppm1d*-Fragment eines bekannten Hotspots für somatische Mutationen auf Exon 6 wurde amplifiziert und sequenziert. Exemplarische Darstellung der (a) *Ppm1d* Struktur, (b) Gelelektrophorese der amplifizierten *Ppm1d* Mutationsclusterregion und (c) Sanger Sequenzierung der *Ppm1d* Mutationsclusterregion. A, Adenin; C, Cytosin; G, Guanin; T, Thymin

### 3.4.2 Einfluss der chronischen Kolitis auf die klonale Expansion hämatologischer Treiber-Gene

Da eine direkte Induktion von Mutationen an isolierten Zellfraktionen in-vitro nicht festgestellt werden konnte, wurde nachfolgend ein alternatives Modell mit bekannten Mutationen im Mausmodell herangezogen. Die klonale Expansion transplanteder Zellen unter Behandlungsbedingungen wurde anhand der Expansion aus durchflusszytometrischen Messungen des retroorbitalen Bluts beurteilt. Des Weiteren zur Klärung der Frage, ob eine generelle CH oder nur einzelne mutierte Gene durch die Kolitis gefördert werden wurden, zusätzlich zu *Ppm1d* und *Dnmt3a*, die häufig im Zuge der CH beobachteten Gene *Tet2* und *Tp53* untersucht.

### 3.4.2.1 Untersuchung im Modell des myeloablativen Knochenmarkstransfers mit *Dnmt3a* und *Ppm1d*

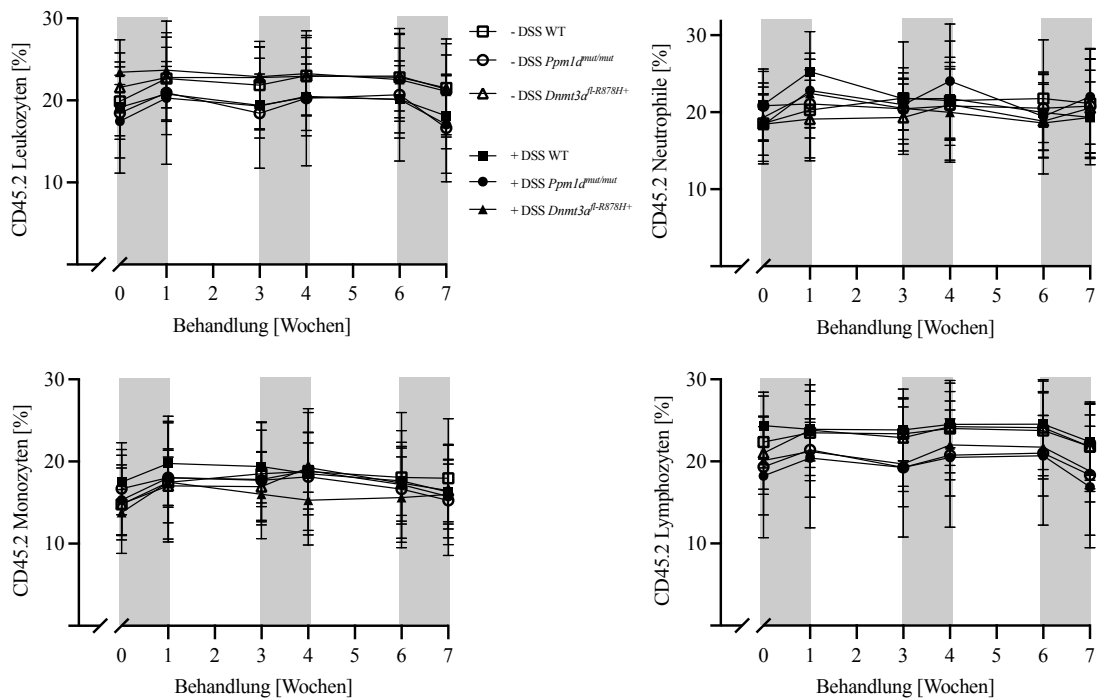
Zur Beurteilung, ob eine in Schüben auftretende starke Inflammation die Expansion mutierter Zellen fördert, wurden Knochenmarkszellen aus *Ppm1d*<sup>mut/mut</sup>-punktmutierten, *Dnmt3a*<sup>fl-R878H+</sup>-defizienten sowie Wildtyp-CD45.2-Mäusen mittels Knochenmarkstransfer in CD45.1-*Pepboy*-Mäuse nach Bestrahlung transplantiert und einer darauffolgenden induzierten Kolitis über drei Zyklen ausgesetzt. Die Beurteilung des Schweregrads der experimentellen Kolitis in den CD45.1 *Pepboy*-Mäusen nach dem myeloablativen Knochenmarkstransfer wurde mittels Überwachung des Gewichtsverlaufs durchgeführt (Abb. 21a, b). Zum Ende eines jeweiligen Zyklus zeigte sich innerhalb der Behandlungsgruppen der charakteristische Gewichtsverlust, welcher bei zunehmender Zyklusanzahl verstärkt auftrat. Ein Einfluss der mutierten Donorzellen auf die Gewichtsverläufe konnte nicht beobachtet werden. Die morphologische Betrachtung des Kolons bestätigte den durch die CED verursachten entzündlichen Zustand (Abb. 21c). Das Verhältnis von Darmgewicht zu Darmlänge zeigte eine zusammengeschrumpfte Form bei erhöhtem Gewicht, ähnlich wie im Modell des 15 Wochen Versuchsendpunkt, auf. Im Milzgewicht konnte nach drei Zyklen in der aktiven CED-Phase keine signifikante Volumenzunahme gefunden werden, jedoch ließ sich ein Trend zu einer Splenomegalie erkennen (Abb. 21d). Das beschriebene morphologische Erscheinungsbild von Kolon und Milz bestätigte die Kolitis-induzierten Veränderungen. Das Vorhandensein der *Dnmt3a*- und *Ppm1d*-Mutanten zeigte keinen zusätzlich begünstigenden Einfluss auf die Veränderungen von Milz und Darm. Kolon Ratio und Milzgewicht lagen auf einem vergleichbaren Level wie die DSS-Behandlungsgruppe ohne mutierte Zellen.



**Abbildung 21 Keine reduzierte Gewichtszunahme in CD45.1-Pepboy-Mäusen nach experimentell induzierter Kolitis in einem myeloablativen Knochenmarkstransfer-Modell mit *Ppm1d<sup>mut/mut</sup>*-punktmutierten und *Dnmt3a<sup>fl-R878H+</sup>*-defizienten Donorzellen.**

Im Abdominalbereich abgeschirmte CD45.1-*Pepboy*-Mäuse wurden zweimalig im Abstand von 4h mit einer Intensität von 5,5 Gy für 150 Sekunden bestrahlt. Nach der zweiten Bestrahlung wurde das Knochenmark von CD45.2 *Ppm1d<sup>mut/mut</sup>*-mutierten (n=5, 6), *Dnmt3a<sup>fl-R878H+</sup>*-defizienten (n=5, 6) oder den Wildtypgeschwistertieren (n=11) isoliert und 5,5 Millionen Zellen retrobulbär den CD45.1-*Pepboy*-Mäusen injiziert. Die experimentelle Kolitis wurde sechs Wochen nach der Transplantation mit einer 2%igen DSS-Lösung in den CD45.1-Mäusen in drei Zyklen über einen Zeitraum von sieben Wochen induziert. Die Behandlungsgruppe ist als gefüllte Form dargestellt, die Kontrollen als Ungefüllte. Die grauen Säulen repräsentieren das Intervall in dem DSS mit dem Trinkwasser appliziert wurde. (a, b) Gewichtszunahme im Behandlungsverlauf, (c) Kolon Ratio und (d) Milzgewicht nach sieben Behandlungswochen der CD45.1 *Pepboy*-Mäuse mit CD45.2-*Ppm1d<sup>mut/mut</sup>*-mutierten, *Dnmt3a<sup>fl-R878H+</sup>*-defizienten oder CD45.2-Wildtyp Chimären. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. \*\*\*\* P < 0.0001 (basierend auf einer zweifaktoriellen Varianzanalyse).

Zur Verifizierung der induzierten CH wurden während des Versuchsverlaufs die CD45.2-Zellen im Blutkreislauf bezüglich ihrer Expansion beurteilt. An insgesamt sechs Versuchszeitpunkten wurde zu Beginn und Ende retrobulbär entnommenes Blut auf seine Zusammensetzung hin durchflusszytometrisch untersucht. Da im Kontext der CED-induzierten Expansion insbesondere Leukozyten den größten Stellenwert besitzen, wurde der Verlauf dieser sowie der lymphoiden und myeloiden Leukozyten-Subpopulationen beurteilt. Sechs Wochen nach Transplantation befanden sich *Ppm1d<sup>mut/mut</sup>*-punktmutierte, *Dnmt3a<sup>fl-R878H+</sup>*-defiziente sowie Wildtyp-CD45.2-Leukozyten auf einem ähnlichen Transplantationslevel von zirka 20% (Abb. 22). Ein Anstieg ausdifferenzierter Immunzellen, in Form der Monozyten, Neutrophilen und Lymphozyten, im Kreislaufsystem unter Einfluss der experimentellen CED konnte am Ende der akuten Phasen nicht beobachtet werden.

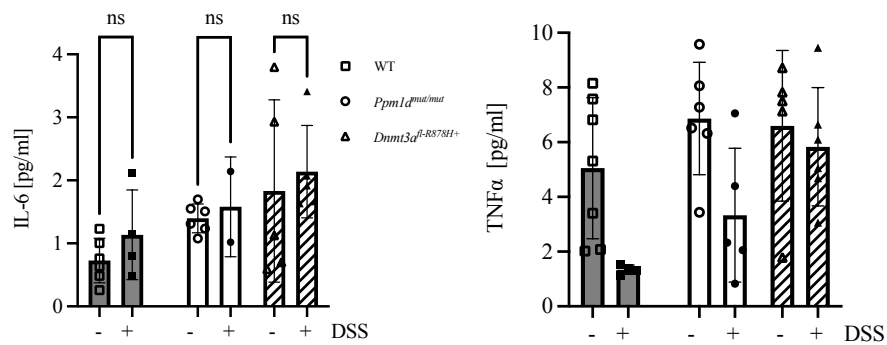


**Abbildung 22 Keine verstärkte klonale Expansion *Ppm1d*<sup>mut/mut</sup>-punktmutierter oder *Dnmt3a*<sup>fl-R878H+</sup>-defizienter CD45.2 Leukozyten im Blut während der experimentell-induzierten Kolitis.**

Die experimentelle Kolitis wurde sechs Wochen nach der Transplantation mit einer 2%igen DSS-Lösung in den CD45.1-Mäusen in drei Zyklen über einen Zeitraum von sieben Wochen induziert. Die Behandlungsgruppe ist als gefüllte Form dargestellt, die Kontrollen als Ungefüllte. Die grauen Säulen repräsentieren das Intervall in dem DSS mit dem Trinkwasser appliziert wurde. Zu Beginn und Ende eines jeweiligen Zyklus wurde retrobulbäres Blut der *Ppm1d*<sup>mut/mut</sup>-mutierten (n=5, 6), *Dnmt3a*<sup>fl-R878H+</sup>-defizienten (n=5, 6) oder den Wildtypgeschwistertieren (n=11) isoliert und auf die Immunzellzusammensetzung durchflusszytometrisch untersucht und die relative CD45.2-Zellanzahl quantifiziert. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. ns (basierend auf einer zweifaktoriellen Varianzanalyse).

Zur weiteren Beurteilung eines systemischen proinflammatorischen Phänotyps unter Einfluss der CH, wurden die Plasmakonzentrationen der für die Kolitis typischen Inflammationsmarker, IL-6 und TNF-alpha, bestimmt. Weder IL-6 noch TNF-alpha zeigten signifikant erhöhte Blutplasmakonzentrationen innerhalb der untersuchten Modelle auf (Abb. 23). Die experimentell induzierte Kolitis begünstigt somit nicht die Expansion der Treiber-Gene *Ppm1d* und *Dnmt3a* im peripheren Kreislaufsystem zum Zeitpunkt nach sieben Wochen und wirkt sich nicht verstärkt proinflammatorisch aus.

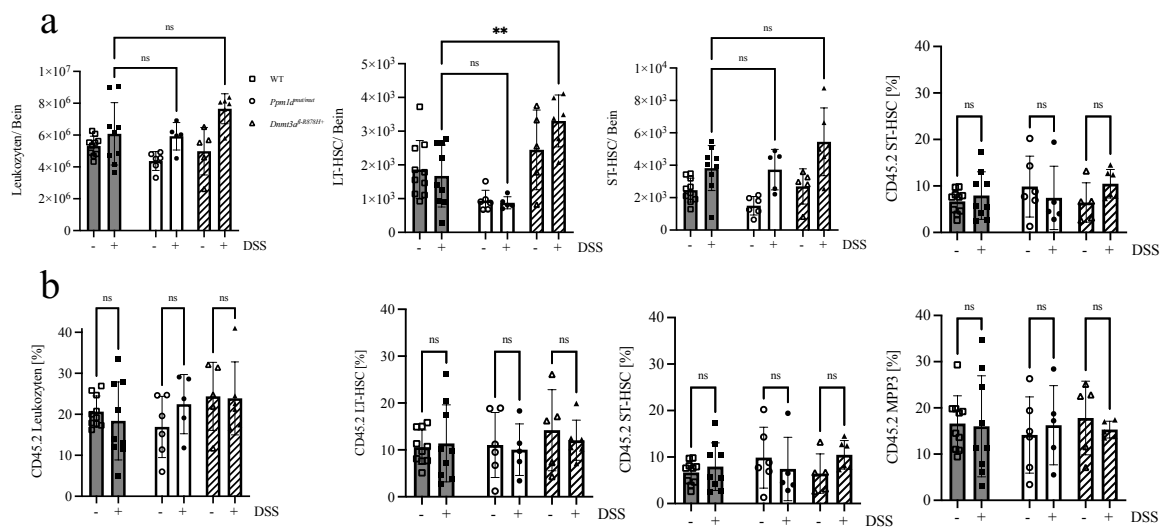




**Abbildung 23 Keine erhöhte Entzündungsmarkerkonzentration durch *Ppm1d<sup>mut/mut</sup>*-punktmutierten und *Dnmt3a<sup>fl-R878H+</sup>*-defizienten Donorzellen in CD45.1-Pepboy-Mäusen nach experimentell induzierter Kolitis**

Sieben Wochen nach Behandlung wurde das kardiale Blut der *Ppm1d<sup>mut/mut</sup>*-mutierten (n=5, 6), *Dnmt3a<sup>fl-R878H+</sup>*-defizienten (n=5, 6) oder den Wildtypgeschwistertieren (n=4, 6) isoliert und die Proteinkonzentration von IL-6 und TNF-alpha mittels ELISA im Plasma quantifiziert. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. ns (basierend auf einer zweifaktoriellen Varianzanalyse).

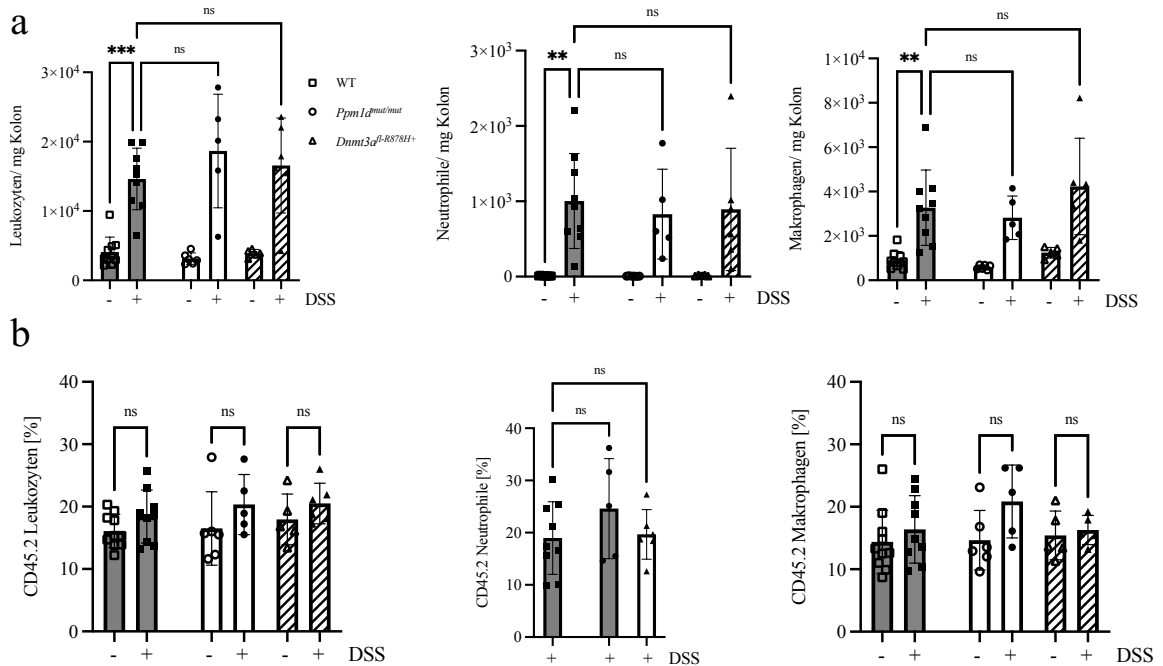
Zusätzlich wurde neben dem Blutbild das Knochenmark hinsichtlich der Expansion der Mutanten auf einen behandlungsspezifischen Einfluss untersucht. Analog zu den Ergebnissen aus 3.3.3. kommt es unter proinflammatorischen Bedingungen zu einer Zunahme knochenmarksresidenter Vorläuferzellen, vor allem der Gruppe der MPP3, welche wichtige Funktionen in der Reifung von Monozyten und neutrophilen Granulozyten haben (Abb. 24a). Ein quantitativer Unterschied innerhalb der Mutanten im Vergleich zu den genetisch unmodifizierten Zellen konnte nicht gefunden werden. Eine erhöhte Anzahl der LT-HSC konnte im Modell mit den *Dnmt3a<sup>fl-R878H+</sup>*-defizienten Zellen beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigten *Ppm1d<sup>mut/mut</sup>*-punktmutierte Zellen einen Trend hin zu einer Verringerung der LT-HSC. Wichtig in Bezug auf die CH ist jedoch eine Veränderung in der relativen Anzahl unter Einfluss der indizierten Kolitis (Abb. 24b). Der relative Anteil somatisch mutierter CD45.2 Zellen bleibt unter allen Versuchsbedingungen unverändert gleich. Die Inflammation hat somit neben dem Blutbild auch keinen Einfluss auf die Zellzusammensetzung im hämatopoetischen Milieu des Knochenmarks und fördert nicht die CH.



**Abbildung 24 Keine verstärkte klonale Expansion CD45.2 *Ppm1d*<sup>mut/mut</sup>-punktmutierter oder *Dnmt3a*<sup>fl-R878H+</sup>-defizienter hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen im Knochenmark nach experimentell-induzierter Kolitis.**

Sieben Wochen nach Behandlung wurde das Knochenmark der *Ppm1d*<sup>mut/mut</sup>-mutierten (n=5, 6), *Dnmt3a*<sup>fl-R878H+</sup>-defizienten (n=5, 6) oder den Wildtypgeschwistertieren (n=4, 6) isoliert und auf die (a) absolute Immunzellzusammensetzung durchflusszytometrisch untersucht sowie die (b) relative CD45.2-Zellanzahl quantifiziert. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. ns, \*\* P < 0.01 (basierend auf einer gewöhnlichen zweifaktoriellen Varianzanalyse).

Ein Effekt auf das Blut und Knochenmark konnte im nicht-kompetitiven Modell des myeloablativen Knochenmarkstransfers nicht beobachtet werden. Jedoch ergibt sich durch einen möglichen proinflammatorischen Phänotyp der mutierten Zellen möglicherweise ein Einfluss auf das Geschehen am Entzündungsherd. Da sowohl das Blut als auch das Knochenmark nicht dem Ursprung der Entzündung entsprechen, wurde in weiterführenden Experimenten die Immunzellzusammensetzung im Kolongewebe analysiert. Eine deutlich erhöhte Anreicherung von Leukozyten, vor allem Makrophagen und Neutrophilen, konnte im intestinalen Gewebe nach sieben Behandlungswochen nachgewiesen werden (Abb. 25a). Nichtsdestotrotz war der CD45.2-Spenderanteil zu den Empfängerzellen unter allen Versuchsbedingungen vergleichbar (Abb. 25b). Da unter Kontrollbedingungen keine Neutrophilen im Kolongewebe zu finden sind, konnte das Chimärenverhältnis zwischen Behandlung und Kontrolle nicht bewertet werden. Eine erhöhte klonale Expansion der mutierten Zellen am Inflammationsherd selbst, dem Kolongewebe, findet bei isolierter Betrachtung der relativen Anzahl an der Leukozytenpopulation, während der akuten Kolitisphase nicht statt. Da Neutrophile ein Bestandteil der Leukozyten sind kann eine Expansion dieser ebenfalls ausgeschlossen werden.



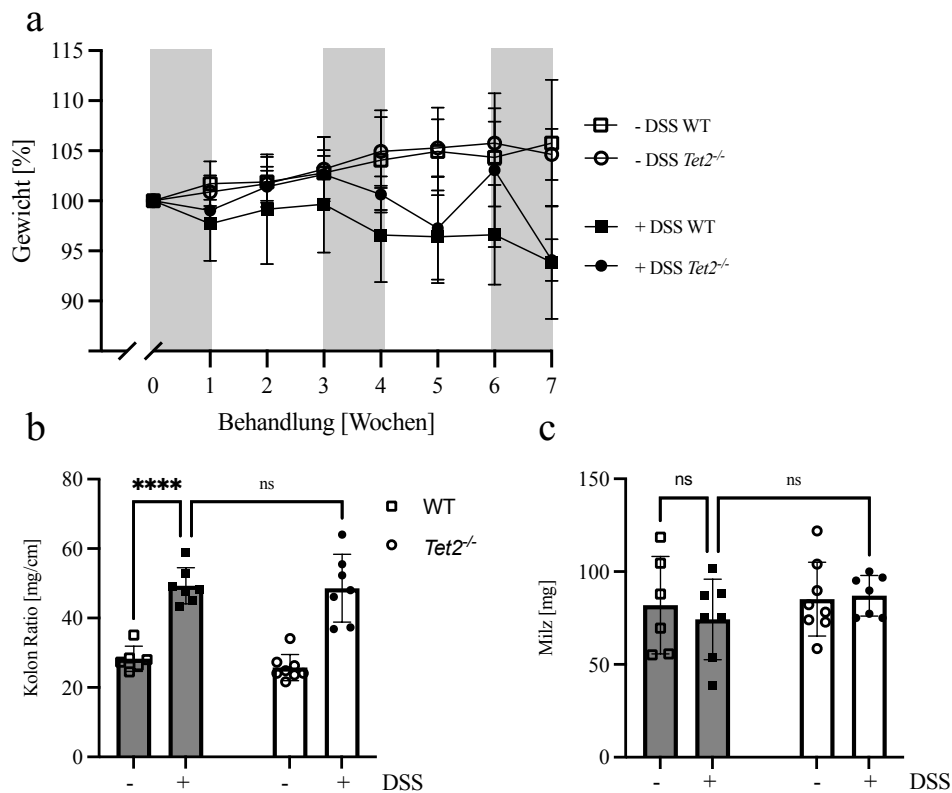
**Abbildung 25 Keine verstärkte Anreicherung CD45.2 *Ppm1d<sup>mut/mut</sup>*-punktmutierter oder *Dnmt3a<sup>fl-R878H+</sup>*-defizienter Leukozyten im Kolongewebe nach experimentell-induzierter Kolitis.**

Sieben Wochen nach Behandlung wurde das Kolon der *Ppm1d<sup>mut/mut</sup>*-mutierten (n=5, 6), *Dnmt3a<sup>fl-R878H+</sup>*-defizienten (n=5, 6) oder den Wildtypgeschwistertieren (n=4, 6) entnommen und auf die (a) absolute Immunzellzusammensetzung durchflusszytometrisch untersucht sowie die (b) relative CD45.2-Zellanzahl quantifiziert. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. ns, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 (basierend auf einer zweifaktoriellen Varianzanalyse).

Die Untersuchungen im nicht-kompetitiven KMT mit vorausgehender Myeloablation zeigten im Modell mit *Ppm1d<sup>mut/mut</sup>*-mutierten und *Dnmt3a<sup>fl-R878H+</sup>*-defizienten Spenderzellen keinen begünstigenden Einfluss durch die rezidivierende Inflammation der CED. Da innerhalb der Reifung von Leukozyten das hämatopoetische Milieu der Knochenmarksnische einen maßgebenden Einfluss ausübt und Bestrahlung eine Disruption dieser Mikroumgebung verursacht, wurde die CH folgend im Modell des adoptiven KMT untersucht.

### 3.4.2.2 Untersuchung im Modell des adoptiven Knochenmarkstransfer mit *Tet2*

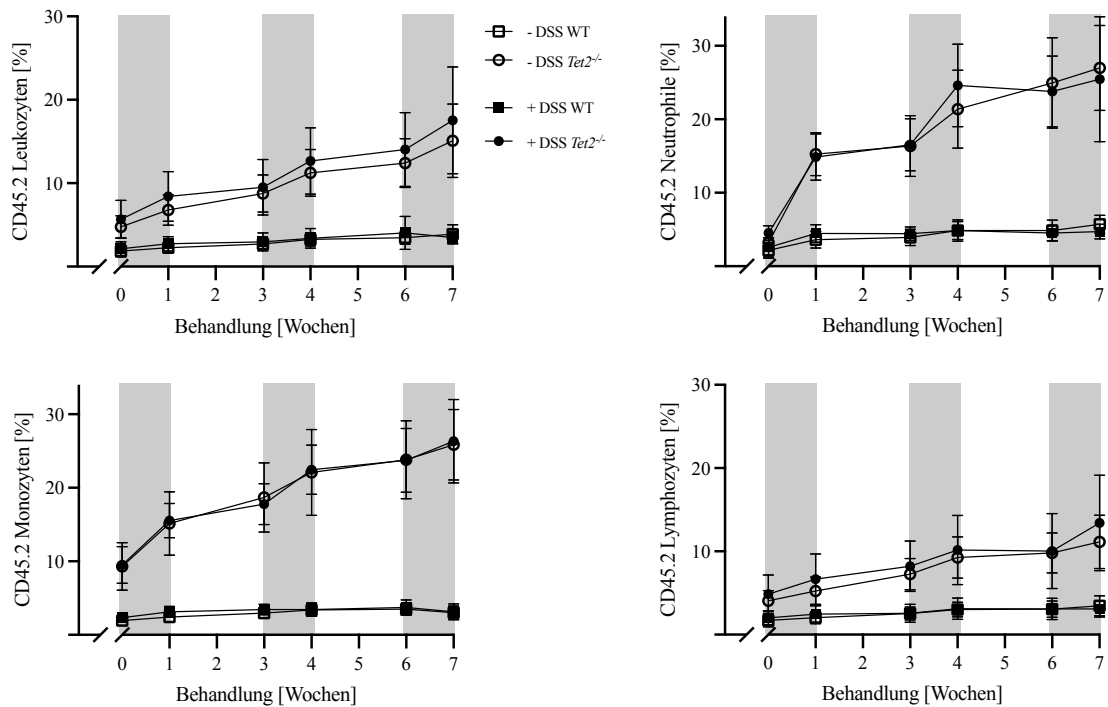
Im adoptiven Knochenmarkstransfer stehen Empfänger- und Spenderzellen in Konkurrenz zueinander und geben so einen verbesserten Überblick über niederschwellige Chimärenkonzentrationen unter homöostatischen Bedingungen, wie es sich auch im klinischen Bild der CH zeigt, wieder. Diese Zellen expandieren bereits unabhängig von äußeren Umweltfaktoren, so dass eine vorherige Präkonditionierung des Knochenmarks mittels Bestrahlung nicht notwendig war. Zur Beurteilung, ob der Zustand einer in Schüben auftretenden starken Inflammation den Effekt der Mutanten Expansion noch verstärken kann, wurden Knochenmarkszellen aus *Tet2*-defizienten Mäusen mittels adoptiven Knochenmarkstransfer in CD45.1-*Pepboy*-Mäuse transplantiert und diese Mäuse einer darauffolgenden induzierten Kolitis über drei Zyklen ausgesetzt. Analog zu den Beobachtungen im myeloablativen Modell wurde eine durch die Entzündung bedingte Gewichtsabnahme bereits nach kurzer Zeit festgestellt (Abb. 26a). Die Kolonmorphologie zeigte nach sieben Therapiewochen ebenso die bereits beschriebenen charakteristischen Marker der chronischen Kolitis, mit verkürzter Länge bei zunehmendem Gewicht, auf (Abb. 26b). Eine Splenomegalie konnte zu diesem Zeitpunkt nicht beobachtet werden (Abb. 26c). Das morphologische Bild von Darm und Milz wies im Verlauf der CED jedoch keine Unterschiede zwischen *Tet2*-defizienten und Wildtyp-Spenderzellen als Reaktion auf die CED auf.



**Abbildung 26 Keine reduzierte Gewichtszunahme in CD45.1 *Pepboy*-Mäusen nach experimentell induzierter Kolitis in einem adoptiven Knochenmarkstransfer Modell mit *Tet2*-defizienten Donorzellen.**

An drei konsekutiven Tagen wurden 5,5 Millionen Zellen des Knochenmarks von *Tet2*-defizienten (n= 8, 7) oder den Wildtypgeschwistertieren (n= 6, 7) retrobulbär in CD45.1-*Pepboy*-Empfängertiere injiziert. Die experimentelle Kolitis wurde sechs Wochen nach der Transplantation mit einer 2%igen DSS-Lösung in den CD45.1 Mäusen in drei Zyklen über einen Zeitraum von sieben Wochen induziert. Die Behandlungsgruppe ist als gefüllte Form dargestellt, die Kontrollen als Ungefüllte. Die grauen Säulen repräsentieren das Intervall in dem DSS mit dem Trinkwasser appliziert wurde. (a) Gewichtszunahme im Behandlungsverlauf, (b) Kolon Ratio und (c) Milzgewicht nach sieben Behandlungswochen der CD45.1-*Pepboy*-Mäuse mit CD45.2 *Tet2*-defizienten oder CD45.2-Wildtyp-Chimären. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. \*\*\*\* P < 0.0001 (basierend auf einer zweifaktoriellen Varianzanalyse).

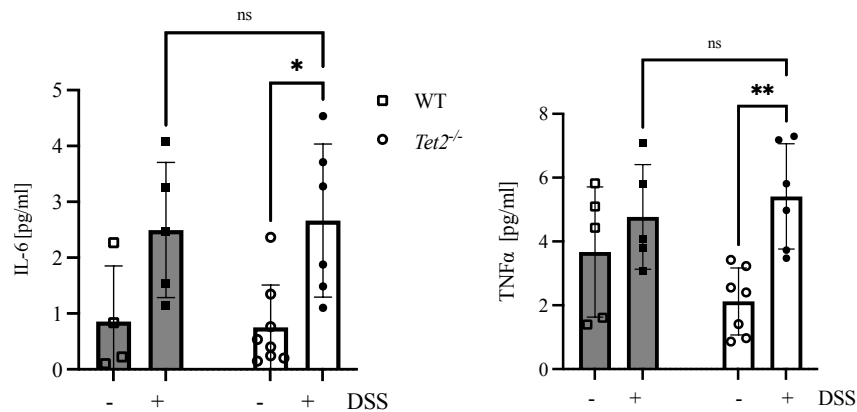
Die Aufnahme der zeitlich abhängigen Expansion *Tet2*-defizienter Immunzellen im Blut zeigt deutlich den Charakter zur klonalen Ausbreitung auf (Abb. 27). Bereits zu Beginn der DSS-Gabe sechs Wochen nach Transplantation lagen die Mutanten mit 5% über den 2,5% der Wildtyp-Spender. Im Verlauf der Kolitisinduktion stieg dieser Wert auf bis zu 20% an. Da die *Tet2*<sup>-/-</sup>-Empfängertiere ohne Kolitis einen vergleichbaren Verlauf aufwiesen, lässt sich folgern, dass der Einfluss der Kolitis auf die Expansion nicht ausschlaggebend ist und die Zellen unabhängig vom inflammatorischen Zustand expandieren. Die Wildtyp-Zellen blieben im ganzen Versuchsverlauf auf einem gleichbleibenden Niveau in Bezug auf die Gesamtzahl der Immunzellen im Kreislaufsystem. Erwähnenswert ist zudem eine verstärkte Expansion in die Linie der myeloiden Fraktionen aus Monozyten und Neutrophilen. Der prozentuale Anteil an der Lymphozyten Population fiel dementsprechend geringer aus.



**Abbildung 27 Keine verstärkte klonale Expansion *Tet2*-defizienter Leukozyten im Blut während der experimentell-induzierten Kolitis.**

Die experimentelle Kolitis wurde sechs Wochen nach der Transplantation mit einer 2%igen DSS-Lösung in den CD45.1-Mäusen in drei Zyklen über einen Zeitraum von sieben Wochen induziert. Die Behandlungsgruppe ist als gefüllte Form dargestellt, die Kontrollen als Ungefüllte. Die grauen Säulen repräsentieren das Intervall in dem DSS mit dem Trinkwasser appliziert wurde. Zu Beginn und Ende eines jeweiligen Zyklus wurde retrobulbäres Blut der *Tet2*-defizienten ( $n = 7, 8$ ) oder der Wildtypgeschwistertiere ( $n = 6, 7$ ) isoliert und auf die Immunzellzusammensetzung durchflusszytometrisch untersucht und die relative CD45.2 Zellanzahl quantifiziert. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. ns (basierend auf einer zweifaktoriellen Varianzanalyse).

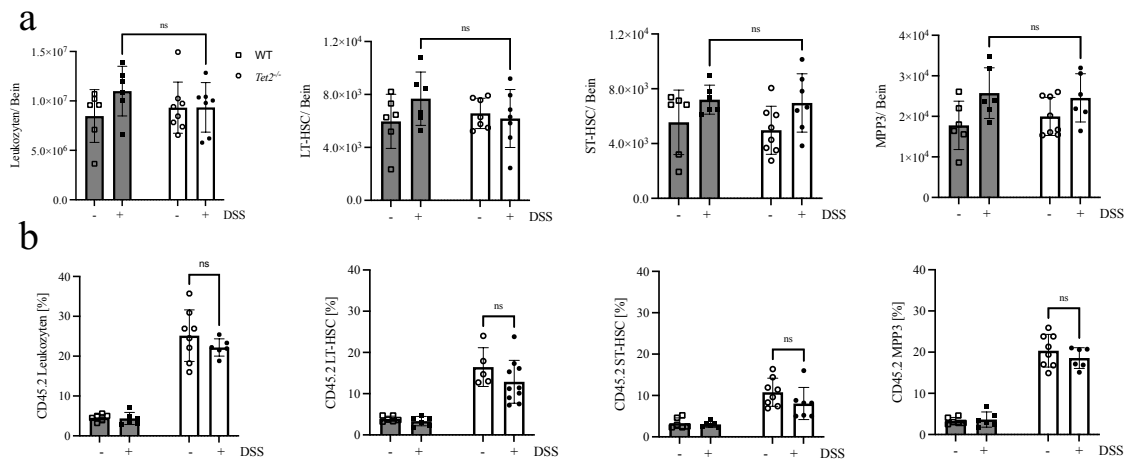
Die Bestimmung der Plasmakonzentration der Entzündungsmarker IL-6 und TNF-alpha zeigte für beide Zytokine eine Zunahme nach DSS-Applikation. Ein CH-abhängiger Unterschied in den Behandlungsgruppen konnte jedoch nicht beobachtet werden, so dass der *Tet2*-defiziente Hintergrund diese Marker nicht negativ beeinflusst (Abb. 28). Nachfolgend wurde zunächst der Einfluss auf die Generierung ausdifferenzierter Zellen des Kreislaufsystems aus den hämatopoetischen Vorläufern im Knochenmark untersucht. Anschließend erfolgte die Untersuchung der Rekrutierung in das lokale Gewebe des Kolons.



**Abbildung 28 Keine erhöhte Entzündungsmarkerkonzentration in CD45.1-Pepboy-Mäusen nach experimentell induzierter Kolitis in einem adoptiven Knochenmarkstransfer Modell mit *Tet2*-defizienten Donorzellen.**

Sieben Wochen nach Behandlung wurde das kardiale Blut der *Tet2*-defizienten (n= 8, 6) oder der Wildtypgeschwistertiere (n= 6, 7) isoliert und die Proteinkonzentration von IL-6 und TNF-alpha mittels ELISA im Plasma quantifiziert. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 (basierend auf einer zweifaktoriellen Varianzanalyse).

Die durchflusszytometrische Analyse der absoluten Anzahl der HSPC im Knochenmark zeigte lediglich einen Trend zu einer verstärkten Hämatopoese in Reaktion auf die DSS-Behandlung (Abb. 29a). Die deutlichste relative Expansion fand mit zirka 20% in die Fraktion der MPP3 statt (Abb. 29b). Eine erhöhte Expansion unter chronischer Kolitis blieb aber auch in diesem Fall aus, so dass die Inflammation keinen Einfluss auf das Teilungsverhalten der *Tet2*-defizienten Zellen hat. Die Gesamtanzahl befand sich im Vergleich der Mutanten und Kontrollzellen auf einem vergleichbaren Niveau.

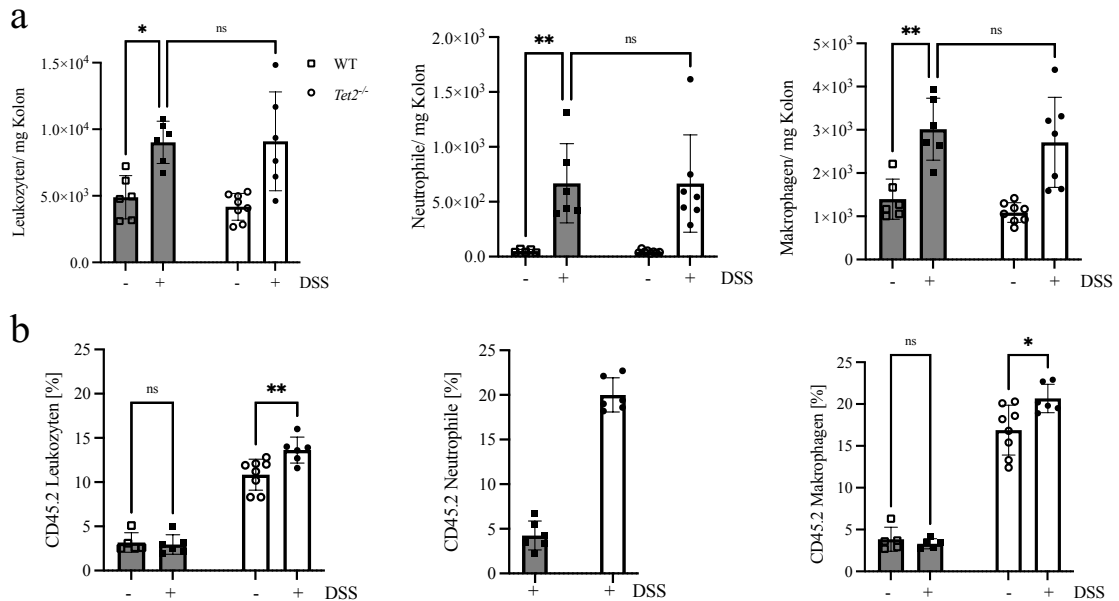


**Abbildung 29 Keine verstärkte klonale Expansion CD45.2 *Tet2*-defizienter hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen im Knochenmark nach experimentell-induzierter Kolitis.**

Sieben Wochen nach Behandlung wurde das Knochenmark der *Tet2*-defizienten ( $n= 8, 6$ ) oder der Wildtypgeschwistertiere ( $n= 6, 7$ ) isoliert und auf die (a) absolute Immunzellzusammensetzung durchflusszytometrisch untersucht sowie die (b) relative CD45.2 Zellanzahl quantifiziert. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. ns (basierend auf einer basierend auf einer zweifaktoriellen Varianzanalyse).

Die hämatopoetische Zellfraktion der MPP3 sowie die peripheren Leukozyten zeigten keine erhöhten Level *Tet2*-defizienter Spenderzellen nach Induktion der experimentellen Kolitis auf. Zur Beurteilung der Expansion während des Versuchsverlaufs ins Kolongewebe wurde zusätzlich das Chimärenverhältnis dort analysiert. Die DSS-induzierte Kolitis wies, ähnlich wie im myeloablativen Modell, einen deutlichen Anstieg lokaler Leukozyten im Kolongewebe auf (Abb. 30a). Die absoluten Zellzahlen waren bezüglich der unterschiedlichen Donorzellen vergleichbar. Beim Betrachten der Chimärenverteilung zeigte sich allerdings eine verstärkte Anreicherung dieser im Entzündungsherd (Abb. 30b). Im Besonderen kam es zu einem signifikanten Anstieg des Anteils *Tet2*-defizienter Makrophagen im intestinalen Gewebe. Bei gleichbleibender relativer Anzahl der mutierten Leukozyten im Kreislaufsystem, während der Kolitisinduktion, konnte am Endpunkt nach sieben Wochen eine Anreicherung mutierter Makrophagen im entzündeten Kolongewebe nachgewiesen werden.



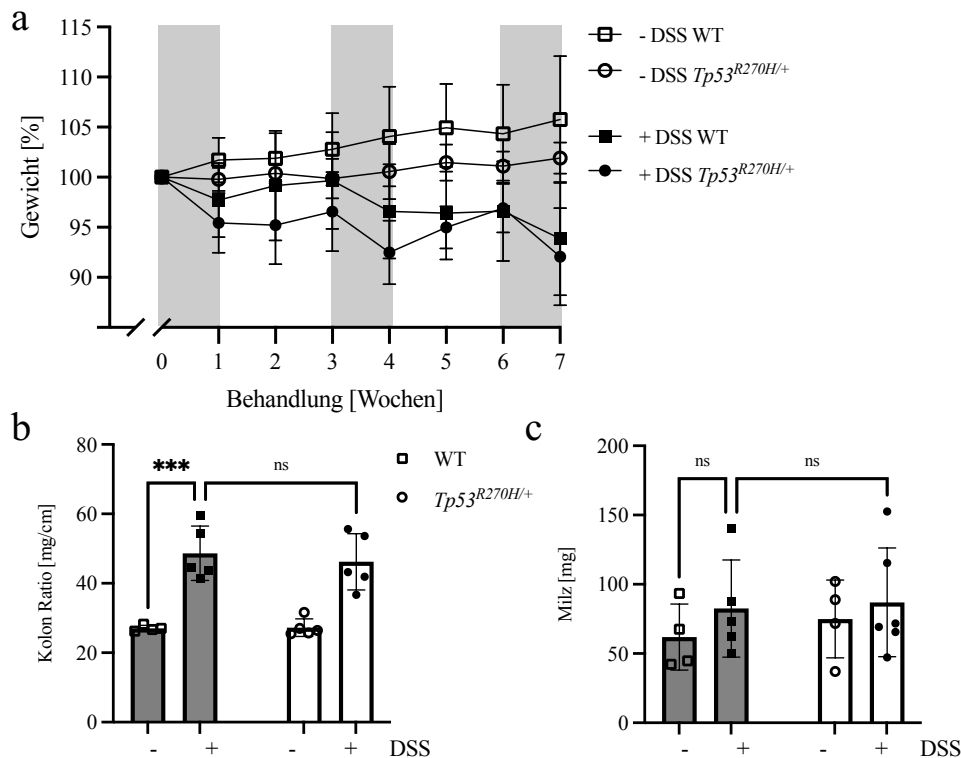


**Abbildung 30 Verstärkte Anreicherung CD45.2 *Tet2*-defizienter Leukozyten im Kolongewebe nach experimentell-induzierter Kolitis.**

Sieben Wochen nach Behandlung wurde das Kolon der *Tet2*-defizienten ( $n = 8, 6$ ) oder der Wildtypgeschwisteriere ( $n = 6, 7$ ) entnommen und auf die (a) absolute Immunzellzusammensetzung durchflusszytometrisch untersucht sowie die (b) relative CD45.2 Zellanzahl quantifiziert. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. ns, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  (basierend auf einer zweifaktoriellen Varianzanalyse).

### 3.4.2.3 Untersuchung im Modell des adoptiven KMT mit *Tp53*

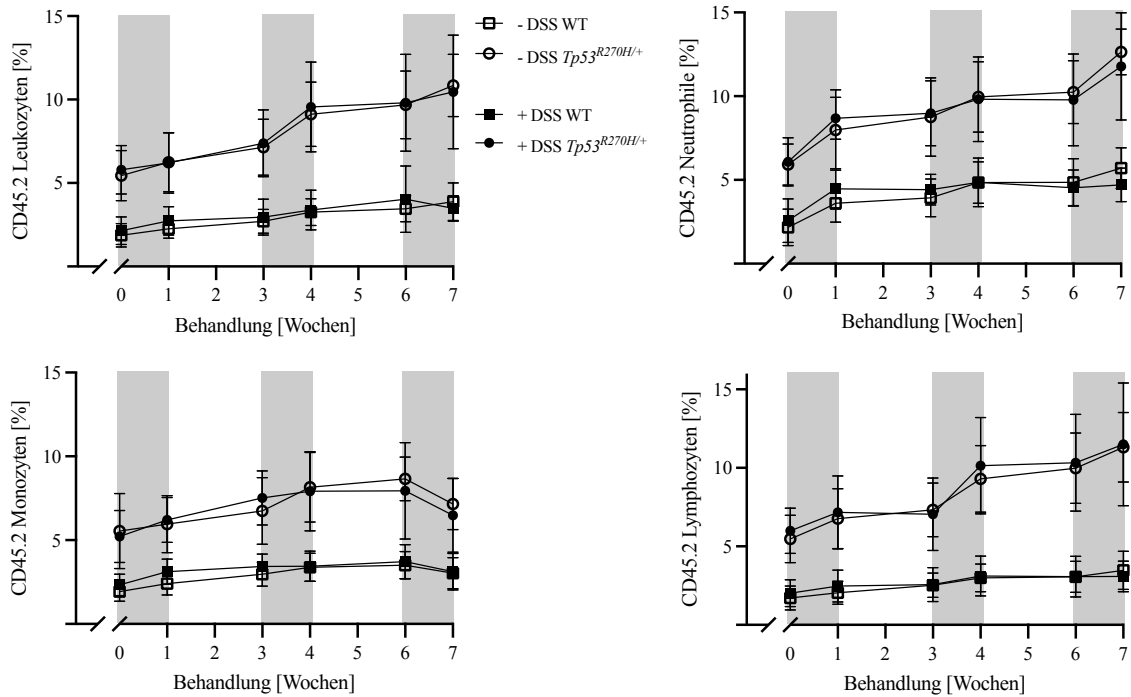
Neben *Tet2* als aggressiven Treiber wurde die Expansion *Tp53*<sup>R270H/+</sup>-mutierter Zellen analog im Modell des adoptiven Knochenmarkstransfer untersucht. Die Überwachung des Gewichtsverlauf zeichnete sich durch den für CED spezifischen Abfall am Ende der akuten Phase der Behandlungsgruppe aus (Abb. 31a). Morphologische Veränderungen des Kolons konnten ebenfalls beobachtet werden (Abb. 31b). In der Milz sind keine Veränderungen der Morphologie nach drei akuten Phasen erkennbar (Abb. 31c). Unterschiede in den Gruppen konnten zwischen den für *Tp53*<sup>R270H/+</sup>-mutierten und unmodifizierten Zellen nicht gefunden werden, jedoch belegen die Ergebnisse die erfolgreiche Induktion der experimentellen Kolitis in den Tieren, so dass weiterführend der Effekt der Kolitis auf die CH untersucht wurde.



**Abbildung 31 Keine reduzierte Gewichts Zunahme in CD45.1-Pepboy-Mäusen nach experimentell induzierter Kolitis in einem adoptiven Knochenmarkstransfer Modell mit *tp53*<sup>R270H/+</sup>-defizienten Donorzellen.**

An drei konsekutiven Tagen wurden 5,5 Millionen Zellen des Knochenmarks von *tp53*<sup>R270H/+</sup>-defizienten (n= 6, 6) oder den Wildtypgeschwistertieren (n= 5, 5) retrobulbär in CD45.1 *Pepboy* Empfängertiere injiziert. Die experimentelle Kolitis wurde sechs Wochen nach der Transplantation mit einer 2%igen DSS-Lösung in den CD45.1 Mäusen in drei Zyklen über einen Zeitraum von 7 Wochen induziert. Die Behandlungsgruppe ist als gefüllte Form dargestellt, die Kontrollen als Ungefüllte. Die grauen Säulen repräsentieren das Intervall in dem DSS mit dem Trinkwasser appliziert wurde. (a) Gewichtszunahme im Behandlungsverlauf, (b) Kolon Ratio und (c) Milzgewicht nach sieben Behandlungswochen der CD45.1 *Pepboy* Mäuse mit CD45.2 *tp53*<sup>R270H/+</sup>-defizienten oder CD45.2 Wildtyp Chimären. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung. \*\*\* P < 0.001 (basierend auf einer zweifaktoriellen Varianzanalyse).

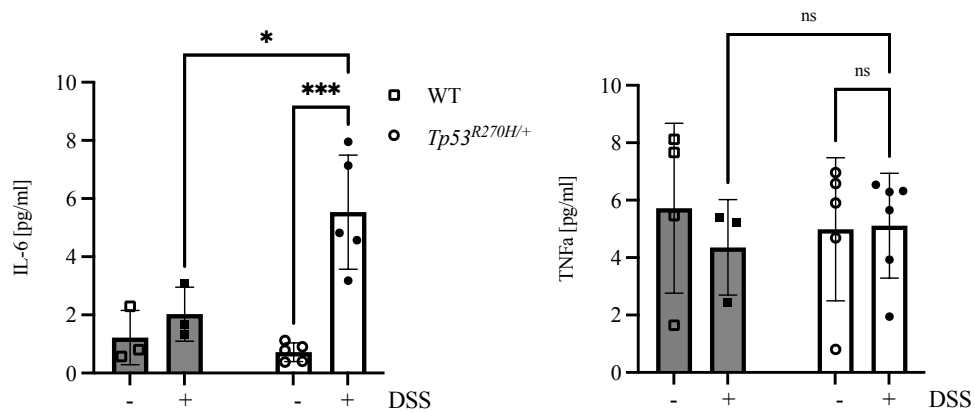
Die Untersuchung der Immunzellzusammensetzung des Bluts zeigte im Modell mit *tp53*<sup>R270H/+</sup>-Mutation eine verstärkte Expansion unabhängig von der experimentell-induzierten Kolitis auf (Abb. 32). Am Ende des dritten Zyklus befand sich die Menge *tp53*-mutierter Zellen in einer Größenordnung von zirka 10%, und betraf - anders als bei der CH von *Tet2*-defizienten Immunzellen - im gleichen Maße lymphoide sowie myeloide Zellreihen.



**Abbildung 32 Keine verstärkte klonale Expansion  $Tp53^{R270H/+}$ -defizienter Leukozyten im Blut während der experimentell-induzierten Kolitis.**

Die experimentelle Kolitis wurde sechs Wochen nach der Transplantation mit einer 2%igen DSS-Lösung in den CD45.1-Mäusen in drei Zyklen über einen Zeitraum von sieben Wochen induziert. Die Behandlungsgruppe ist als gefüllte Form dargestellt, die Kontrollen als Ungefüllte. Die grauen Säulen repräsentieren das Intervall in dem DSS mit dem Trinkwasser appliziert wurde. Zu Beginn und Ende eines jeweiligen Zyklus wurde retrobulbäres Blut der  $Tp53^{R270H/+}$ -defizienten ( $n=6, 6$ ) oder der Wildtypgeschwister (n= 5, 5) isoliert und auf die Immunzellzusammensetzung durchflusszytometrisch untersucht und die relative CD45.2 Zellanzahl quantifiziert. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. ns (basierend auf einer zweifaktoriellen Varianzanalyse).

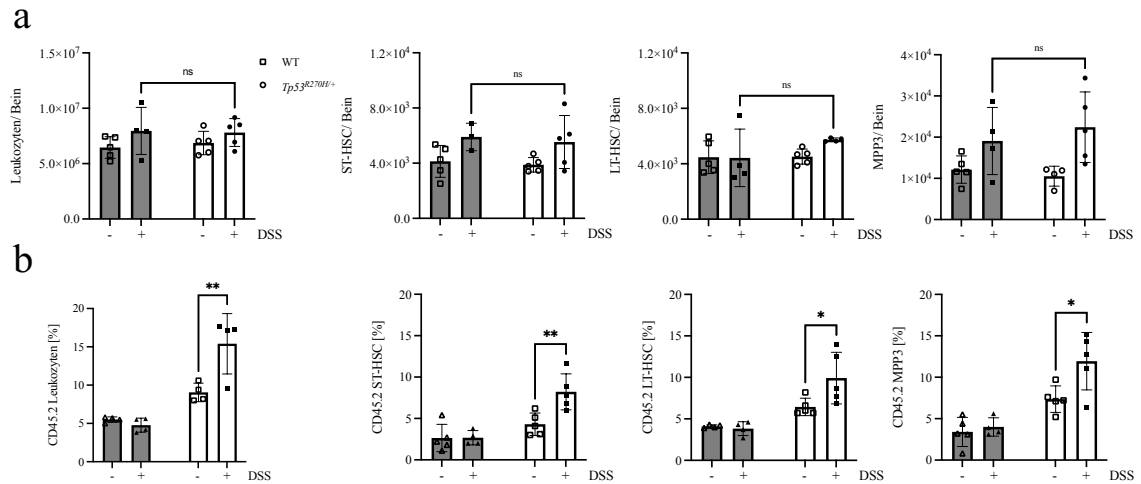
Im Gegensatz zu den anderen Modellen wurde bei Betrachtung der Konzentration der Zytokine IL-6 und TNF-alpha im Blutplasma ein deutlicher Effekt der  $Tp53^{R270H/+}$ -Mutation sichtbar (Abb. 33). Die mit DSS-behandelten  $Tp53^{R270H/+}$ -Empfänger wiesen eine signifikante Erhöhung der Konzentration von IL-6 im Vergleich zu behandelten Wildtypgeschwistern auf.



**Abbildung 33 Erhöhte IL-6 Konzentration in CD45.1-Pepboy-Mäusen nach experimentell induzierter Kolitis in einem adoptiven Knochenmarkstransfer Modell mit  *Tp53<sup>R270H/+</sup>*-mutierten Donorzellen.**

Sieben Wochen nach Behandlung wurde das kardiale Blut der  *Tp53<sup>R270H/+</sup>*-defizienten (n= 6, 6) oder der Wildtypgeschwistertiere (n= 5, 5) isoliert und die Proteinkonzentration von IL-6 und TNF-alpha mittels ELISA im Plasma quantifiziert. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 (basierend auf einer zweifaktoriellen Varianzanalyse).

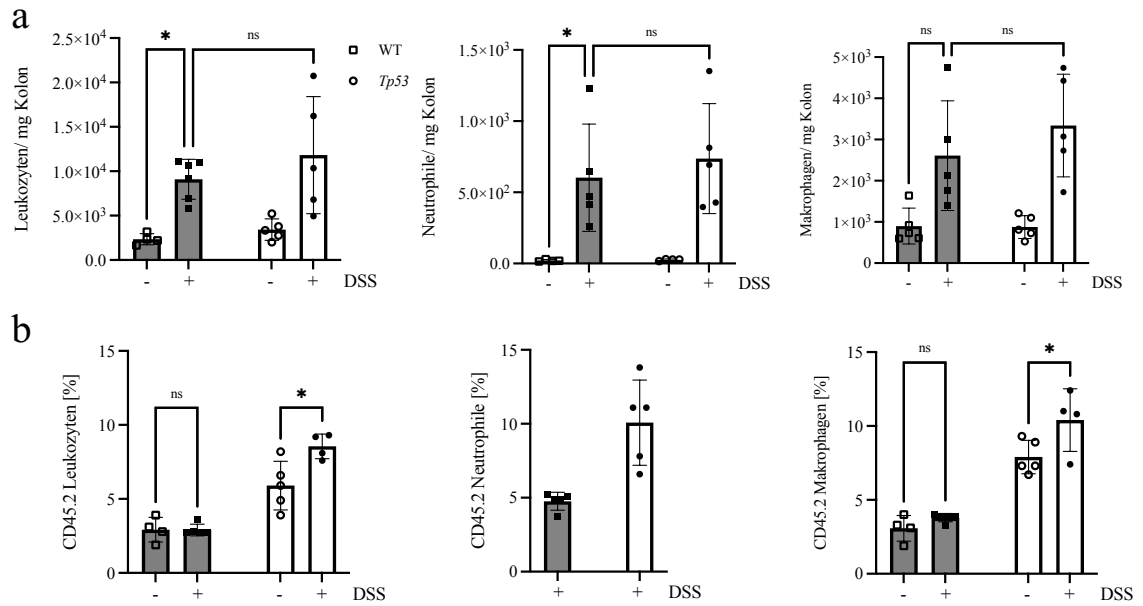
Die potenzielle Beeinflussung der Immunzellkomposition hämatopoetischer Stammzellen wurde nachfolgend detaillierter untersucht. Die absoluten Zellzahlen zeigten keinen Mutanten-bedingten Effekt (Abb. 34a). Bei Betrachtung des Chimärenverhältnis konnte in deutlicher Abgrenzung zu den vorherigen Treiber-Genen jedoch ein expansionsbedingter Effekt beobachtet werden. Unter Behandlung kam es zu einer präferierten Expansion  *Tp53<sup>R270H/+</sup>*-mutierter Zellen in die Populationen der LT-HSC und ST-HSC (Abb. 34b). Zusätzlich war der Anteil der  *Tp53<sup>R270H/+</sup>*-Zellen an der Gesamtpopulation der myeloiden Vorläufer (MPP3) unter Behandlungsbedingungen erhöht. Die Fraktion der knochenmarksresidenten reifen Leukozyten zeigte ebenfalls eine Anreicherung der mutierten Zellen, die im peripheren Blutbild noch nicht gefunden werden konnte.



**Abbildung 34** Verstärkte klonale Expansion CD45.2 *Tp53<sup>R270H/+</sup>*-defizienter hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen im Knochenmark nach experimentell-induzierter Kolitis.

Sieben Wochen nach Behandlung wurde das Knochenmark der *Tp53<sup>R270H/+</sup>*-defizienten (n= 6, 6) oder der Wildtypgeschwistertiere (n= 5, 5) isoliert und auf die (a) absolute Immunzellzusammensetzung durchflusszytometrisch untersucht sowie die (b) relative CD45.2-Zellanzahl quantifiziert. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 (basierend auf einer zweifaktoriellen Varianzanalyse).

Neben dem Effekt auf das Knochenmark wurde ein Effekt auf das intestinale Gewebe gefunden (Abb. 37a). Die Kombination aus induzierter Kolitis und der klonalen Expansion *Tp53<sup>R270H/+</sup>*-mutierter Zellen sorgte für eine Anreicherung dieser (Abb. 37b). Insbesondere die Makrophagen waren, bei unverändert bleibender absoluter Immunzellzahl, davon betroffen.



**Abbildung 35 Verstärkte Anreicherung CD45.2 *Tp53*<sup>R270H/+</sup>-mutierter Leukozyten im Kolongewebe nach experimentell-induzierter Kolitis.**

Sieben Wochen nach Behandlung wurde das Kolon der *Tp53*<sup>R270H/+</sup>-defizienten (n= 6, 6) oder der Wildtypgeschwistertiere (n= 5, 5) entnommen und auf die (a) absolute Immunzellzusammensetzung durchflusszytometrisch untersucht sowie die (b) relative CD45.2-Zellanzahl quantifiziert. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung. \* P < 0.05 (basierend auf einer zweifaktoriellen Varianzanalyse).

## 4 Diskussion

Die CH hämatologischer Treibergene ist ein altersabhängiges Phänomen und stellt neben den klassischen Faktoren des metabolischen Syndroms einen unabhängigen Risikofaktor für Erkrankungen des kardiovaskulären Systems dar<sup>9</sup>. Voruntersuchungen zur CED konnten ein vergleichbares Profil ohne gängige Risiken bei erhöhtem BMI, Hyperlipidämie, Diabetes und Hypertonie bestätigen<sup>116</sup>.

Diskutiert wird in dieser Arbeit ein möglicher synergistischer Einfluss der CED und CHIP, der die Prognose in Bezug auf chronisch entzündliche Erkrankungen zusätzlich verschlechtert. Zur Klärung der Frage, ob es im Verlauf der CED zu funktionellen Veränderungen auf der Ebene der hämatopoetischen Stammzellen kommt, untersuchte die vorliegende Arbeit die klonale Expansion von Treiber-Genen in einem kombinierten Modell der induzierten Kolitis und etablierten Transplantationsmethoden. Tatsächlich konnte ein begünstigender Einfluss der chronischen Darmentzündung auf *Tp53* als Treiber-Gen nachgewiesen werden. Die hier gewonnenen Ergebnisse sollen nachfolgend im Kontext der aktuellen Literatur umfassend diskutiert und die angewandten Methoden auf Stärken und Schwächen sowie dem klinischen Zusatznutzen hin analysiert werden.

### 4.1 Vergleichende Untersuchung einer experimentell-induzierten Kolitis in C57BL/6J und *ApoE*-defizienten Mäusen

Zur experimentellen Untersuchung der intestinalen Inflammation stehen zahlreiche Modelle zur Verfügung, welche neben chemischer Induktion gentechnische Veränderungen umfassen<sup>135</sup>. Jede dieser Methoden weist bestimmte Limitierungen hinsichtlich der Übertragbarkeit auf das humane Szenario auf.

Das am weitesten verbreitete Modell stellt die Gabe von DSS mit dem Trinkwasser dar, da es dem klinischen Bild akuter Kolitis-Phasen, bestehend aus den charakteristischen Erosionen, einem morphologischen Kryptenverlust und Infiltration naiver Immunzellen am nächsten kommt<sup>136</sup>. Der Effekt des DSS entsteht über die Bindung zu mittelkettigen Fettsäuren im Epithel des Kolons und sich anschließender Induktion einer akuten Inflammation aufgrund einer erhöhten Permeabilität der epithelialen Barriere. Durch eine persistierende, schädigende Wirkung auf das Darmepithel kommt es zur Infiltration kommensaler Darmbakterien sowie derer Metabolite in die Wandschichten der Darmsubmukosa und reflektorischer Aktivierung der nativen, lokal-residenten Immunzellen über TLR mit der Folge der Ausschüttung von Zytokinen. Die Zytokinsekretion aktivierter Immunzellen resultiert weitergehend in einer TNF-induzierten

Apoptose intestinaler Epithelzellen und chronischen Inflammation<sup>137</sup>. Die Ausprägung der Kolitis steht im Zusammenhang mit der Molekülmasse des DSS, wobei es bei einer zu niedrigen Masse zu keiner ausreichenden Bindung von Fettsäuren kommt und ein zu hohes Molekulargewicht (MG) die Absorption ins Epithel unterbindet. Neben dem MG stellen die verwendete Konzentration des DSS, der Genotyp und die applizierte Diät-Form kritische Faktoren zur geeigneten Kolitisinduktion im Versuch dar. Für eine optimale Wirksamkeit wurde für die Versuchsreihen dieselbe Charge mit einem MG des Polymers von 36 bis 50 kDa eingesetzt<sup>138</sup>. Ungleich der humanen Pathologie führt DSS jedoch auch zu einer T-Helferzellen-vermittelten Immunantwort<sup>123</sup>. Bei entsprechender Molekülmasse und adaptierter Konzentration konnte eine verstärkte lymphatische Immunzellaktivierung, wie durchflusszytometrisch bewiesen, aber auf ein Minimum reduziert werden (Abb. 17). Die chemisch induzierte Kolitis stellt ein robustes, reproduzierbares und leicht handhabbares Modell zur Untersuchung der Ätiologie der intestinalen Entzündung dar. Das Inflammationsmuster zeigt zudem eine große Übereinstimmung zur Pathologie im menschlichen GIT und ist somit hinsichtlich immunologischer und histologischer Übertragbarkeit eine bevorzugt angewandte Methode<sup>123</sup>. Durch die hohe Molekülmasse und stark negative Ladung des Polysaccharides sowie einer nicht perforierenden Membranschädigung kann eine gastrointestinale Resorption weitestgehend ausgeschlossen werden. Die systemischen Effekte beruhen demnach primär auf der reflektorischen Aktivierung der nativen Immunantwort.

C57BL/6J-Mäuse finden ein breites Verwendungsspektrum als Hintergrundstamm zur Erzeugung von Kongenen und als Allzweckstamm zur Untersuchung des Einflusses diverser Umweltfaktoren auf die kardiovaskuläre<sup>139</sup> und Stoffwechselbiologie<sup>140</sup>, Genetik<sup>141</sup>, Immunologie<sup>142</sup> und Weitere. Der Stamm lässt die Forschung an einem mutationsunabhängigen Phänotypen zu. Die Voruntersuchungen zur Präaktivierung der neutrophilen Granulozyten im Modell der DSS-induzierten Kolitis fanden jedoch auf Grundlage der notwendigen Prädisposition in *ApoE*-defizienten Versuchstieren statt, da C57BL/6J im verwendeten juvenilen Alter von 20-22 Wochen keine atherosklerotischen Gefäßplaques ausbilden<sup>143, 144</sup>. Die verstärkte Plaquebelastung bei gleichzeitig bestehender Kolitis in den *ApoE*-Tieren konnte in dieser Studie bestätigt werden (Abb. 16). Im klinischen Kontext limitieren wachsende atherosklerotische Ablagerungen, bestehend aus glatten Muskelzellen und Lipiden, den arteriellen Blutfluss. Das erhöhte Risiko für KVE wie Schlaganfälle<sup>145</sup>, einen Myokardinfarkt<sup>146</sup> oder einer instabilen Angina pectoris<sup>147</sup>, steht im Zusammenhang mit der Oberflächenruptur der Ablagerungen und Freisetzung des prothrombotischen Kerns in den luminalen Blutfluss<sup>148</sup>. Die erhöhte Plaquebelastung in der Aorta der *ApoE*-defizienten Tiere deckt sich mit dem proatherogenen Phänotyp bedingt durch proinflammatorische Zytokine, sowie hohen Lipidkonzentrationen<sup>149</sup> und bestätigt das verstärkte Risiko für KVE bei Plaque-Ruptur in dieser Kohorte. Die *ApoE*-Defizienz



geht allerdings bereits mit regulatorischen Modifikationen der myeloiden Hämatopoese, im Speziellen einer supprimierten Monozyten-Rekrutierung, einher<sup>150</sup>. Zudem zeigt sich das klinische Bild der CED unterschiedlich in Abhängigkeit polymorpher APOE-Varianten<sup>151</sup>. Um diese Variable mit Relevanz innerhalb der Blutbildung und CED-Ausprägung zu umgehen, wurden zu Beginn verschiedene Surrogatmarker dem systemischen Effekt der DSS-Behandlung der C57BL/6J und *ApoE*-defizienten Mäuse gegenübergestellt. Zur verbesserten Einschätzung langfristiger Effekte, erfolgt der Beurteilungsendpunkt in der Remissionsphase nach 15 Wochen. Das Überwachen des Gewichtsverlaufs stellt in den Versuchstieren ein geeignetes Verfahren zur Bewertung des Schweregrads der experimentellen Kolitis während der Behandlung dar und diente als Surrogatmarker einer erfolgreichen Induktion der Kolitis für weiterführende Untersuchungen<sup>152</sup>. Die Behandlungsgruppen wiesen einen identischen Verlauf nach akuten und remittierenden Phasen auf, so dass der Schweregrad der Kolitis unabhängig vom gewählten Genotyp auftrat (Abb. 12). Da diese Parameter zur Diagnose unspezifisch sind wurde, wie auch klinisch angewandt, die intestinale Morphologie beurteilt. Im CED-Patienten findet dies mittels endoskopischer Methoden statt<sup>153</sup>. Die *in vivo* Bewertung des Schweregrads im Mausmodell gestaltet sich indes komplizierter und liefert weniger präzise Ergebnisse als am entnommenen Organ<sup>154</sup>. Der Verlust der intestinalen Architektur konnte anhand des Verhältnisses von Masse zu Länge als Maß für die induzierte Kolitis angenommen und mittels H&E-Färbung ergänzend visualisiert werden (Abb. 13). Die bereits geschilderte Immunzellaktivierung der in Reaktion auf das DSS konnte mit der Aufnahme spezifischer Größen der Milz bestätigt werden (Abb. 15). Die Milz ist neben der Reifung von Lymphozyten, auch verantwortlich für die Speicherung myeloider Immunzellen, wie zum Beispiel der Population der Monozyten<sup>155, 156</sup>. Dieses Reservoir an Monozyten bietet eine beschleunigte Bereitstellung der nativen Immunabwehr in Folge auf eine akute Gewebeschädigung<sup>156</sup>. Diese auftretende Splenomegalie in der Kolitis Kohorte ist in den *ApoE*-defizienten Mäusen verstärkt im Vergleich zur Gruppe der C57BL/6J Population. Eine Größenzunahme der Milz lässt eine verstärkte Immunzellaktivierung und -speicherung in diesen Tieren vermuten. Die Speicherung von Immunzellen könnte erklären, inwiefern es zu einer zunehmend verschlechterten Gewichtsadaption bei rezidivierenden akuten Schüben kommt (Abb. 12). Wiederholter inflammatorischer Stress fördert die Mobilisierung von Immunzellen zum Inflammationsgeschehen über eine stimulierte extramedulläre Hämatopoese in der Milz<sup>156</sup>. Limitierend muss jedoch festgestellt werden, dass das Immunsystem von Mäusen und Menschen bezüglich der Rolle der Milz nicht vollständig verglichen werden kann, da neben strukturellen Unterschieden auch Differenzen innerhalb der Rezirkulation diverser Immunzellpopulationen relevant sind<sup>157</sup>. So ist im Menschen eine Splenomegalie nicht zwangsläufig mit einer angeregten Hämatopoese innerhalb des Milzgewebes assoziiert, wohingegen in der Maus akute Infektionen, Autoimmunerkrankungen und metabolische Syndrome durch die erhöhte Zellbereitstellung das

Milzwachstum fördern<sup>158</sup>. Die Kolitis ulzerosa weist zudem, im Gegensatz zu Morbus Crohn, nachgewiesenermaßen im Patienten keine generelle Verbindung von Milzvolumen zur generellen Krankheitsaktivität auf<sup>159</sup>.

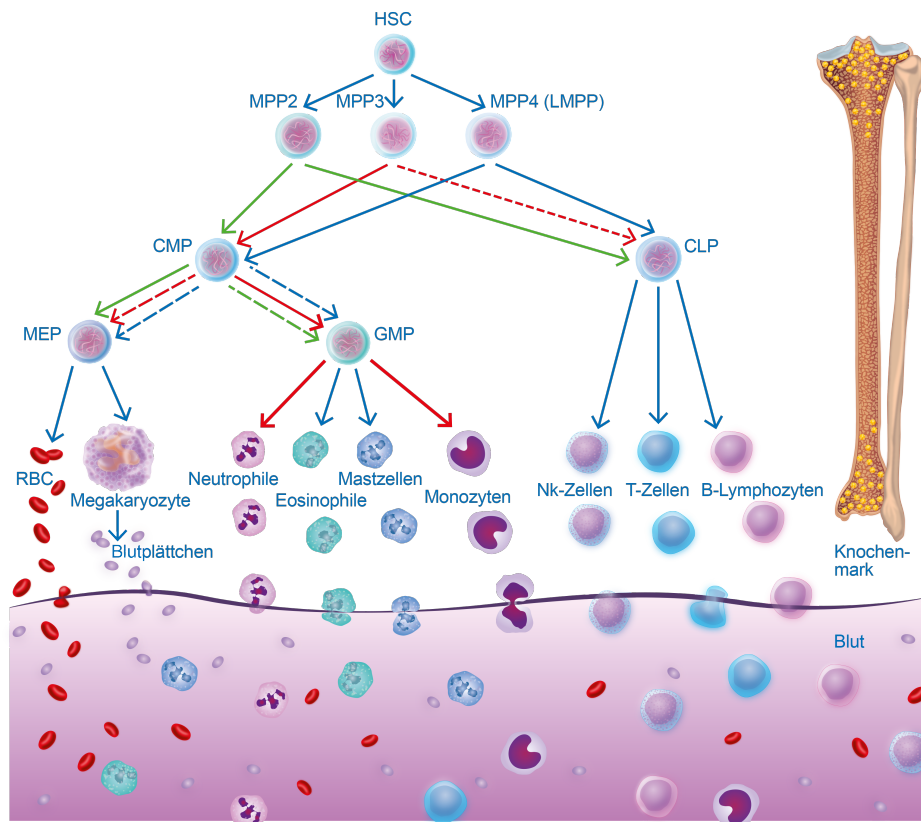
Die erwähnte Rezirkulation findet in einer vorgegebenen circadianen Rhythmik statt<sup>160</sup>. Neben der Indizierung proinflammatorischer Zustände ist die Bestimmung eines ausgewogenen Tag-Nacht-Rhythmus auch bezüglich des zeitlichen Unterschieds im murinen und humanen Modell beachtenswert, da die Wachphasen von Mäusen auf die Nachtstunden fallen und sich bei entsprechender Nichtbeachtung phänotypische Muster verändern könnten<sup>161</sup>. Wichtig in diesem Zusammenhang ist der Einfluss erwähnter Zeitgeber-Gene auf die myeloiden Zellen in der hämatopoetisch aktiven Knochenmarksnische. *BMAL1* reguliert beispielsweise die tägliche Fluktuation innerhalb der Migration proinflammatorischer *Ly6C<sup>hi</sup>*-Monozyten zu Entzündungsherden<sup>162</sup>. Zusätzlich begünstigen verringerte Level von *BMAL1* eine metabolische Verschiebung in Makrophagen, die einen proinflammatorischen Phänotypen über vermehrte Produktion von *IL-1 $\beta$*  fördern<sup>163</sup>. *IL-1 $\beta$*  konnte bereits im Zuge der *Canakinumab anti-inflammatory thrombosis outcomes* (CANTOS)-Studie bezüglich des Auftretens von KVE eine Relevanz zugeordnet werden<sup>164</sup>. Im Zuge der Untersuchung von CHIP anhand des Treiber-Gens *Tet2* konnte ebenfalls eine Überschneidung dieser nachgewiesen werden und zeigt die enge Wechselbeziehung zwischen chronisch entzündlichen Erkrankungen, CHIP und Disruption der molekularen inneren Uhr<sup>31</sup>. Aus der Literatur ist der Effekt der CHIP auf das myeloide System, wie bereits geschildert, bekannt. Experimentell konnten im hier genutzten Tiermodell der experimentellen Kolitis tatsächlich verringerte mRNA-Expressionen von *Per2* und *Bmal1* nachgewiesen werden (Abb. 14). Neben den Effekten auf Kolonlänge und -gewicht können somit auch veränderte intrazelluläre Mechanismen mit systemischem Einfluss ausgemacht werden. Dieses Ergebnis indiziert eine Störung des normalen Tag-Nacht-Rhythmus in den Versuchstieren und begünstigt zusätzlich den proinflammatorischen Zustand. Zur Minimierung dieses Effekts wurde das Probenmaterial möglichst früh zum Ende der aktiven Nachtphase immer zum gleichen Zeitpunkt gewonnen.

## 4.2 Einfluss einer experimentell-induzierten Kolitis auf die myeloide Hämatopoese

Die Zirkulation von Leukozyten im Kreislaufsystem wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse bewertet und konnte einen Effekt auf die absolute Zellzahl myeloider Zellen nachweisen, wie es auch im klinischen CED-Bild gefunden werden kann (Abb. 17)<sup>165</sup>. Die Erhöhung der sich im Kreislauf befindlichen Neutrophilen und Monozyten im Modell der chronischen Kolitis zeigt die systemische Belastung des gesamten Organismus auf. Zusätzlich waren die Ly6C<sup>high</sup>- und Ly6C<sup>low</sup>-Monozyten-Subpopulationen signifikant im Blut erhöht, so dass neben der akuten Entzündung wohl auch bereits Reparaturmechanismen einsetzen. Die Ly6C<sup>high</sup>-Monozyten fungieren im akuten Inflammationsgeschehen der Kolitis als Quelle für IL-1 $\beta$  und TNF, wodurch die Immunantwort verstärkt wird<sup>166</sup>. Dementgegen fördern Ly6C<sup>low</sup>-Monozyten über Sekretion diverser Faktoren die Wundheilung und Regeneration von geschädigtem Gewebe<sup>167</sup>. Die lymphatischen Zellpopulationen, bestehend aus B- und T-Zellen, waren indes von der Behandlung nicht betroffen und befanden sich bei Behandlungs- und Kontrolltieren auf einem vergleichbaren Niveau. Die generelle erhöhte Anzahl der im Kreislaufsystem befindlichen Leukozyten lässt sich auf die dem Knochenmark entstammenden Immunzellen zurückführen und kann, wie es auch dem klinischen Bild der Kolitis entspricht, dem angeborenen Immunsystem zugeordnet werden<sup>168</sup>. Da es sich bei dem untersuchten Zeitpunkt um die Remissionsphase zwei Wochen nach der letzten akuten Kolitisinduktion handelt persistiert die systemische Belastung demnach auch noch eine gewisse Zeit außerhalb des aktiven entzündlichen Zustands. Diese Beobachtung indiziert eine funktionelle Änderung der myeloiden Zelllinie, da sich die Lebenszeit von Zellen des angeborenen Immunsystems in Mäusen auf weniger als 24 Stunden begrenzt<sup>169</sup>. Der Vergleich des C57BL/6J- und *ApoE*<sup>-/-</sup>-Stamms zeigte eine signifikant verringerte Anzahl im blutbefindlicher Leukozyten beim *ApoE*-Hintergrund auf. Diese Abnahme ließ sich spezifisch auf die reduzierte Zahl an Lymphozyten zurückführen und deckt sich mit dem in der Literatur beschriebenen suppressiven Effekts des defizienten Hintergrunds auf die Fraktion der Lymphozyten<sup>170</sup>. Trotz des supprimierten Effekts auf die lymphoiden Zellen bildet der *ApoE*-defiziente Hintergrund wie beschrieben vermehrt Plaques aus. Dem lymphatischen System der adaptiven Immunabwehr kommt dementsprechend bezüglich der Inflammation eine untergeordnete Rolle zu<sup>171</sup>, weshalb anschließend der Fokus auf Veränderung des hämatopoetischen Systems der myeloiden Linien im Knochenmark gelegt wurde.

Die Rekrutierung von Immunzellen beginnt bereits auf der hämatopoetischen Ebene über eine erhöhte Bereitstellung dieser und beschleunigter Freisetzung in die Peripherie bei Stimulation. Die Stimulation findet über Freisetzung diverser Chemokine, wie IL-8, dem *Macrophage inflammatory protein-1* (MIP1) oder dem *Monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), statt,

die über Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (*G protein-coupled receptor*, GPCR), beispielsweise den *CXC chemokine receptor 2* (CXCR2), die Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten und Monozyten induzieren<sup>172</sup>. Eine erhöhte Bereitstellung für den Kreislauf verfügbarer Leukozyten beschleunigt diesen Ablauf<sup>173</sup>. Da Oberschenkel- und Schienbeinknochen die größten hämatopoetisch aktiven Gebiete darstellen, wurden diese für die Analyse der Hämatopoese verwendet<sup>172</sup>. Die Analyse, der im Knochenmark befindlichen Leukozyten bestätigte, den in der Zirkulation beobachteten, Phänotyp einer angeregten Hämatopoese myeloider Zellfraktionen, bestehend aus Neutrophilen und Monozyten (Abb. 18). C57BL/6J und *ApoE*-defiziente Gruppen zeigten ein analoges Muster bei der Verteilung ausdifferenzierter Leukozyten in Reaktion auf das DSS, sodass die Zusammensetzung der Stammzellen lediglich für den unmodifizierten Genotyp der C57BL/6J beurteilt wurde. Die steigende Anzahl hämatopoetischer Stammzellen mit Einfluss auf die Reifung von Neutrophilen und Monozyten, wie es bei den multipotenten Vorläuferzellen der Gruppe 2 & 3 sowie der Granulozyten-Monozyten Vorläuferzellen der Fall war, deckt sich mit dem postulierten Effekt der Kolitis auf das Knochenmark (Abb. 19). Aufgrund der Bedeutung innerhalb der immunologischen Homöostase hat die Akkumulation myeloider Vorläuferzellen diesbezüglich einen wichtigen Effekt auf die Immunabwehr<sup>174</sup>. Das vermehrte Vorkommen von vor allem der Population der GMP begünstigte die verstärkte Immunantwort in akuten CED-Phasen durch eine beschleunigte und erhöhte Bereitstellung ausdifferenzierter myeloider Leukozyten ins periphere Kreislaufsystem (Abb. 36). Der damit einhergehende proinflammatorische Phänotyp spiegelt sich wie geschildert im gesamten Organismus wider. Aus anderen Studien ist bereits bekannt, dass eine Hochregulation von GMPs vor allem im Zusammenhang mit der sogenannten trainierten Immunität (*trained immunity*) steht und ein verbessertes Reaktionsvermögen auf wiederholten Pathogenkontakt, wie bei der rezidivierenden Kolitis-Induktion beobachtet, ermöglicht<sup>175</sup>. Dies erklärt die verstärkte Immunreaktion der wiederholten akuten Kolutisschübe. Der protektive, von der adaptiven Immunabwehr unabhängige Effekt auf Pathogenkontakt steht im Zusammenhang mit genetischen Modifikationen und folgender metabolischer Phänotypveränderung betroffener Zellen<sup>176</sup>. Eine Gedächtnisfunktion von Zellen des nativen Immunsystems könnte durch Expansion einzelner proinflammatorischer Populationen zusätzlich begünstigt werden und wurde weitergehend untersucht. Die rezidivierende Inflammation geht somit nachgewiesenermaßen mit einer chronischen Veränderung der zellulären HSPC-Zusammensetzung im Knochenmark einher. Der *ApoE*-Defizienz kommt in Hinblick auf die Fragestellung zur Untersuchung der Modifikation der myeloiden Hämatopoese eine untergeordnete Rolle zu, da keine Unterschiede in den Vorläuferzellen, sowie den ausdifferenzierten Immunzellen im Kreislaufsystem, gefunden wurden. Auf Basis dieser Ergebnisse wurde für die Transplantationsuntersuchungen diese Variable ausgeschlossen und nur Tiere auf C57BL/6J Hintergrund verwendet.



**Abbildung 36 Hierarchie der Vorläuferzellen des hämatopoetischen Systems.**

Die myeloide Hämatopoese folgt einer hierarchischen Struktur ausgehend von langlebigen Stammzellen, und multipotenten Vorläuferzellen hin zu den myeloiden und lymphoiden Zelllinien. Die Blutzellen werden nach Ausdifferenzierung in das Kreislaufsystem freigesetzt. CLP, Gemeinsame Lymphoide Vorläuferzellen (*common lymphoid progenitors*); CMP, Gemeinsame Myeloide Vorläuferzellen (*common myeloid progenitors*); GMP, Granulozyten-Monozyten-Vorläuferzellen (*granulocyte monocyte progenitors*); HSC, Hämatopoetische Stammzellen (*long term hematopoietic stem cells*); MEP, Megakaryocyten-Erythrocyten Vorläuferzellen (*megakaryocytic-erythroid progenitors*); MPP, Multipotente Vorläuferzellen (*multipotent progenitors*); NK, Natürliche Killerzellen; RBC, Rote Blutkörperchen (*Red blood cells*).

### 4.3 Die Analyse der klonalen Expansion innerhalb akuter CED-Phasen

Die CH stellt, wie eingangs erwähnt, ein primär altersbedingtes sowie bei Chemotherapien induziertes Phänomen dar und beschränkt sich auf hämatologische Treiber-Gene (Abb. 1). Neben dem altersspezifischen statistischen Auftreten von Mutationen kommt chronischen Entzündungen eine zunehmende Relevanz in der Mutagenese diverser Gene zu<sup>177, 178</sup>. Humane Studien haben bereits Assoziationen zwischen altersabhängigen Mutationen und dem Risiko verschiedener Erkrankungsbilder, vor allem entzündlicher kardiovaskulärer Erkrankungen, aufgezeigt<sup>9</sup>. Neben epigenetischen und metabolischen Veränderungen kommt auch der Expansion somatischer Mutationen im Zuge chronisch entzündlicher Erkrankungen eine Relevanz innerhalb klinischer Prognosen zu<sup>9</sup>.

Die Auswahl der verwendeten Treiber-Gene erfolgte anhand der epidemiologischen Daten zu *DNMT3A* und *PPM1D*, da mutierte Klone insbesondere in Patienten mit Kolitis ulzerosa detektiert werden konnten<sup>179</sup>, sowie des generell vermehrten Vorhandenseins von *TET2* und *TP53* in Untersuchungen zur CHIP. Außerdem stehen etablierte Mauslinien zur experimentellen Modellierung der Defizienz oder Überaktivierung bestimmter Gene im Zuge von Mutationen zur Verfügung, die zur Untersuchung einer ursächlichen Rolle im Krankheitszustand mit zugrundeliegenden Mechanismen geeignet sind. Auf Grundlage der Rolle von *PPM1D* im Zusammenhang mit chronischer Kolitis wurde dieses Treiber-Gen der CH auf DNS-Ebene isolierter knochenmarksresidenter Neutrophilen und Monozyten von C57BL/6J-Tieren untersucht<sup>180</sup>. Das Primerdesign erfolgte anhand der ausgemachten Mutation Cluster Region auf Exon 6 des *Ppm1d*-Genabschnitts. Induzierte *Ppm1d*-Mutationen konnten nach 15 Wochen im Modell der experimentellen Kolitis in den myeloiden Zellfraktionen nicht gefunden werden (Abb. 20). Da es sich bei der CH jedoch um ein statistisch eher selten vorkommendes Ereignis handelt, können größere Probenanzahlen notwendig sein, um Mutationen feststellen zu können. Zusätzlich könnte das Alter der verwendeten Tiere unzureichend sein, da, wie eingangs erwähnt, die CH ein altersabhängiges Phänomen darstellt, beziehungsweise die fünf DSS-Zyklen keinen ausreichenden Einfluss auf das Entzündungsaltern haben und der Behandlungszeitraum keine ausreichende Länge zur Entwicklung der CH widerspiegelt. Da die Induktion sowie der Nachweis der CH genannte methodische Grenzen aufweist, wurde zur Untersuchung des Einflusses der chronischen Kolitis auf die klonale Expansion ein alternatives Modell mit bekannten Mutationen herangezogen. *Pepboy*-Mäuse, welche ein modifiziertes CD45.1-Antigen auf der Oberfläche tragen, wurden einem Knochenmarkstransfer mit CD45.2 exprimierenden Donorzellen eines veränderten Treiber-Gens unterzogen. Zur Gewährleistung einer ausreichenden Transplantationseffektivität wurde der Transfer sechs Wochen vor Induktion der Kolitis

durchgeführt und der Endpunkt nach dem dritten Zyklus beziehungsweise nach sieben Wochen festgelegt. Zu diesem Zeitpunkt begrenzt sich die Fraktion der Spenderzellen auf das hämatopoetische System und verhindert einen Einfluss nicht hämatopoetischer Zellen als Störfaktor<sup>125</sup>. Inwiefern die CED die CH antreiben kann, wurde nachfolgend unter Verwendung zweier im Aufbau verschiedener Transplantationsstudien untersucht. Wie bereits unter 2.2.4. beschrieben, gibt es verschiedene Ansätze zur Modellierung der CH mittels Transplantation knochenmarksresidenter Zellen von CD45.2-Mutanten in naive CD45.1-*Pepboy* Empfänger<sup>126</sup>. Da ohne vorherige genetische Modifizierung der CD45.2-Leukozyten-Oberflächenmarker von den Immunzellen exprimiert wird, lassen sich die Spenderzellen anhand dessen von den CD45.1 Antigenen der *Pepboy*-Mäuse differenzieren<sup>181</sup>. Die Transplantationsstudien können je nach Aggressivität der Treiber-Gen Expansion mit oder ohne strahlungsbedingter Präkonditionierung des Knochenmarks durchgeführt werden. Ohne vorherige Präkonditionierung ist die Annahme der Spenderzellen relativ gering, da die Knochenmarksnische eine limitierte Aufnahmekapazität für hämatopoetische Zellen besitzt und es durch die Empfängerimmunreaktion zur Abweisung der Donorzellen kommen kann<sup>182</sup>. Um ein Milieu für eine möglichst hohe Donorzellakzeptanz im Knochenmark zu schaffen, wurden die knochenmarksresidenten Zellen des Empfängers im Vorfeld des Knochenmarktransfers weitestgehend mittels Bestrahlung eliminiert. Die Strahlungsmenge bestimmt das Ausmaß der Rekonstitution und wurde mit einer Intensität von 5,5 Gy über 150 Sekunden bei zweimaliger Bestrahlung für die Versuche festgelegt<sup>183</sup>. Die limitierte Aufnahmekapazität der hämatopoetischen Nische im Knochenmark wird somit zugänglicher für die Spenderzellen und der systemische Einfluss der Mutanten kann besser untersucht werden und eignet sich entsprechend vor allem für Treiber-Gene mit geringer Expansion. Zur Generierung aussagekräftiger Ergebnisse fand die quantitative Depletion der knochenmarksresidenten HSPC im Fall von *Dnmt3a*<sup>*fl-R878H+*</sup> und *Ppm1d*<sup>*mut/mut*</sup> Verwendung. Da diese unabhängig von äußeren Faktoren keine verstärkte Expansion aufweisen, sind erhöhte Level an Spenderchimären zu Beginn der Kolitisinduktion notwendig. Wie in der Immunzellzusammensetzung des Bluts beobachtet werden konnte, befand sich die Annahme der transplantierten Zellen auf einem Niveau von 20-25% bezogen auf die Population der Leukozyten im Modell mit *Dnmt3a*<sup>*fl-R878H+*</sup>- und *Ppm1d*<sup>*mut/mut*</sup>-CD45.2-Spenderzellen, so dass der mehrheitliche Anteil weiterhin die physiologischen nativen Leukozyten darstellte (Abb. 22). Das dadurch gewonnene somatische Mosaik, bestehend aus der dominanten Wildtyp-Population und mutierten Empfängerzellen, lässt eine Aussage über den Einfluss der chronischen Kolitis auf die Expansion mutierter Zellen im Knochenmark treffen. Die direkte Injektion, ohne Bestrahlung, führte zu einer Annahme von zirka 2-5% in Bezug auf die Wildtyp-Zellen und würde bei niedriger Expansion der Mutanten keine konkrete Aussage zulassen können, ob ein mutationsbedingter Effekt vorhanden ist (Abb. 27, 32).

Des Weiteren muss der verwendete CD45-Isotyp bei den Transplantationen beachtet werden. Die Verwendung von CD45.1-*Pepboy*-Mäusen stellt ein etabliertes Modell dar, um die Empfänger- und Spenderzellen durchflusszytometrisch differenzieren zu können. Der Effekt des CD45-Antigenhintergrunds begrenzt sich weitestgehend auf die lymphatische Zelllinie und stellt einen überschaubaren Einflussfaktor dar<sup>184</sup>. Um diesen Einfluss weitergehend bei der Auswertung zu minimieren, wurde mit den entsprechenden Wildtyp-Geschwistertieren als Kontrolle gearbeitet. Da *Tet2*-defiziente und *Tp53*<sup>R270H/+</sup>-mutierte Zellen unabhängig eines Umweltfaktoreinflusses expandieren, wurden diese ohne vorherige Bestrahlung untersucht. *TET2* stellt als erstes identifiziertes Gen mit somatischen Mutationen in Blutzellen, von Patienten mit CH, ohne hämatologische Erkrankungsfaktoren einen aggressiven Treiber dar, der im Zusammenhang mit CED untersucht werden sollte<sup>185</sup>. In verschiedenen Studien konnte hinsichtlich der CH von *Tet2* bereits ein kausaler Zusammenhang bezüglich des kardialen Remodelings innerhalb der Herzinsuffizienz<sup>186</sup> und kardialen Dysfunktion<sup>187</sup> sowie der erhöhten Plaqueausbildung im Zuge verstärkter Atherosklerose<sup>188</sup> beobachtet werden. Die Transplantation *Tet2*-defizienter Zellen stellt diesbezüglich eine etablierte Modellierung der CH zur Imitation des menschlichen Szenarios dar<sup>188</sup>. Neben *Tet2* als aggressiven Treiber der altersabhängigen CH stellt die CH von *Tp53* mit erhöhter Prävalenz nach erfolgreicher Chemotherapie einen wichtigen Vertreter der t-CH dar<sup>105</sup>. Die *Tp53*-Expansion wurde bereits in einer Studie zur Doxorubicin-induzierten Kardiomyopathie mit verlängerter Neutrophileninfiltration und nachfolgender verschlechterter kardialer Funktionsfähigkeit untersucht<sup>189</sup>. Vergleichbar dazu erhöht das Vorhandensein dieser Mutation das Risiko für periphere Arterienerkrankungen und Atherosklerose durch erhöhte Bildung von *Tp53*-defizienten Makrophagenpools<sup>190</sup>. Beide Studien geben einen Aufschluss über substanzielle Veränderungen myeloider Zellen innerhalb der CHIP, welche eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung und Aktivierung dieser in chronischen Phasen der CED haben. Auf Grundlage dessen wurde analog zu *Tet2* das Verfahren des adoptiven Knochenmarktransfers gewählt, um die entsprechenden Mutationen bei unbeeinträchtigter Knochenmarksnische beurteilen zu können. Die adoptive Transplantation in nicht konditionierte Mäuse gibt den transplantierten HSPC die Möglichkeit in einem Wettbewerb mit den Nativen zu stehen, ohne die hämatopoetische Nische zu beeinflussen. Zusätzlich werden die unerwünschten Effekte der Bestrahlung wie Gewebsschäden, Eliminierung residenter Immunzellen und die Destruktion der nativen Knochenmarksnische verhindert<sup>182</sup>. Pro Versuchsgruppe wurden vier verschiedene Konditionen untersucht, bestehend aus dem modifizierten Treiber-Gen unter DSS-Behandlung und Kontrolle und den für das Treiber-Gen Wildtypgeschwistertierzellen unter Behandlungs- und Kontrollbedingungen. Hinsichtlich phänotypischer Veränderungen muss die Bestrahlung bei einem Vergleich der einzelnen Treiber-Gene berücksichtigt werden. Innerhalb der Gruppen kann aber ein vollumfänglicher Vergleich angestellt werden, da sowohl in Behandlungs- als auch



Kontrollgruppen eine entsprechende Prozedur durchgeführt wurde. Die mit der Bestrahlung einhergehenden Limitierungen in Bezug auf geweberesidente Zellen und die potenzielle Ausbildung eines Tumors des Kolons wurden durch die abgeschirmte Bestrahlung auf ein Minimum reduziert. Zusätzlich fand die Bestrahlung mit der minimal notwendigen Intensität zur Gewährleistung einer ausreichenden Präkonditionierung der Stammzellen statt. Der bereits geschilderte destruktive Einfluss der Bestrahlung auf die native Knochenmarksnische stellt innerhalb der Bestrahlungsstudie einen nicht unerheblichen Einfluss auf die Homöostase des hämatopoetischen Systems dar, ein Effekt auf die Knochenmarksnische kann demnach nicht vollständig ausgeschlossen werden<sup>191</sup>.

Beide Modelle wurden in der vorliegenden Arbeit genutzt, um das proinflammatorische periphere als auch knochenmarksspezifische Zellbild der DSS-Behandlung zu untersuchen und konnte in allen Gruppen bestätigt werden. Im Modell mit *Tet2*-defizienten und *Tp53*<sup>R270H/+</sup>-mutierten Zellen ohne Präkonditionierung konnte im Gegensatz zu *Dnmt3a*<sup>fl-R878H+</sup>- und *Ppm1d*<sup>mut/mut</sup>-Spenderzellen eine Expansion im Kreislaufsystem im Zuge der CED beobachtet werden (Abb. 22, 27, 32). Innerhalb des untersuchten Behandlungszeitraums von sieben Wochen, nach drei aktiven CED-Phasen, war die Expansion der Spenderzellen in den mit DSS-behandelten und unbehandelten Tiere in beiden Modellen jedoch auf einem vergleichbaren Niveau. Erwähnenswert ist eine verstärkte Expansion in die Linie der myeloiden Fraktionen aus Monozyten und Neutrophilen im Modell mit *Tet2* Mutation, wie es auch in humanen Studien beobachtet wurde<sup>192</sup>. Es ist bekannt, dass ein Funktionsverlust von *Tet2* mit einer erhöhten Selbsterneuerung sowie bevorzugt myeloiden Transformation einhergeht<sup>193</sup>. Da es sich bei der CH um ein zeitlich abhängiges Phänomen handelt, könnte sich die Expansion im Kreislaufsystem gegebenenfalls erst nach einem längeren Zeitraum manifestieren. Deshalb wurde neben dem Blutbild auch das Knochenmark hinsichtlich der Expansion auf einen behandlungsspezifischen Einfluss untersucht. Das Verhältnis der lokalen hämatopoetischen Stammzellen stellt einen wichtigen Faktor der CED-induzierten Entzündung auf die myeloide Zelllinie dar. Die Stammzellpopulationen verhielten sich in den Modellen mit *Dnmt3a*, *Ppm1d*- und *Tet2*-Spenderzellen analog zum Kreislaufsystem ebenfalls unbeeinträchtigt von der Behandlung (Abb. 24). Eine erhöhte absolute Anzahl der LT-HSC konnte im Modell mit den *Dnmt3a*-defizienten Zellen beobachtet werden und deckt sich mit der verlängerten Lebenszeit von Stammzellen bei einem genetischen *Dnmt3a knock-out*<sup>194</sup>. Im Gegensatz dazu, konnte mit *Tp53* eine signifikant verstärkte Expansion in allen untersuchten HSPC-Populationen festgestellt werden (Abb. 34b). Vor dem Hintergrund, dass p53 die Zellteilung von Stammzellen sowie Differenzierung fördert<sup>195</sup>, begünstigt die mit einem *knock-out* einhergehende Mutation die Akkumulation der Stammzellen. *Tp53*-Mutationen verschaffen den betroffenen Zellen einen Überlebensvorteil über

epigenetische Modulation der *Enhancer of zeste homolog 2* (EZH2)-Methyltransferase mit nachfolgender veränderter Genregulation<sup>196</sup>. Diese modifizierte Expression wird durch die experimentelle Kolitis zusätzlich verstärkt und bestätigt den Effekt der CED auf die *Tp53*-Expansion. Die negative Regulation von p53 durch *PPM1D* lässt eine Auswirkung auf die CH *Ppm1d*-mutierter Zellen vermuten<sup>197</sup>. Wie bereits geschildert, konnte jedoch ein HSPC-spezifischer Einfluss im Modell mit *Ppm1d* nicht gefunden werden, so dass diese Treiber-Gene trotz gegenseitiger Beeinflussung scheinbar unterschiedliche Rollen in der Steuerung der CH einnehmen. Hinzukommend ist der relative Anteil der *Tp53*-modifizierten Spenderzellen bei gleichbleibender absoluter Anzahl erhöht, was auf eine aggressivere Expansion der *Tp53*-CH hinweist. Trotz erfolgreicher Therapieeinstellung mit langfristiger Remission kommt es bei einem Großteil der Kolitis-Patienten zu Rückfällen mit verstärkten Entzündungsreaktionen, die unspezifisch wöchentlich, monatlich oder erst nach Jahren auftreten können<sup>198</sup>. Im Behandlungszeitraum von sieben Wochen konnte keine verstärkte Expansion im Blutkreislauf gefunden werden (Abb. 32). Die Betrachtung eines ausgeweiteten Untersuchungszeitraums mit *Tp53*<sup>R270H/+</sup>-mutierten Zellen könnte Aufschluss über die Expansion im Kreislaufsystem und die Remissionsrate geben.

#### 4.4 Die Analyse der CED im Zuge der klonalen Expansion

Neben den Effekten der CED auf die CH wurde auch der umgekehrte Effekt, nämlich der mögliche Einfluss der CH auf die CED bzw. die Inflammation des Kolongewebes untersucht. Der generelle systemische Effekt der DSS-Behandlung auf Veränderungen des Kolons wie Länge und Gewicht konnte in allen Gruppen analog zum vergleichenden Modell mit C57BL/6J und *ApoE*-defizienten Mäusen bestätigt werden. Des Weiteren konnte im Vergleich der Daten von bestrahlten und unbestrahlten CD45.1-Tieren keine strahlungsabhängigen morphologischen Veränderungen von Kolon- und Milzgewebe beobachtet werden (Abb. 21, 26, 31). Ein möglicherweise vorhandener strahlungsabhängiger Effekt auf das Kolon kann im Modell mit *Dnmt3a*<sup>fl-R878H+</sup> - und *Ppm1d*<sup>mut/mut</sup>-Spenderzellen somit als vernachlässigbar angesehen werden. Die DSS-Behandlung ging bei allen untersuchten Treiber-Genen mit einer verstärkten Migration von Neutrophilen und Makrophagen in das Kolongewebe einher (Abb. 25, 30, 35), welche sich aber im erwartbaren Rahmen und im gleichen Niveau unbestrahlter Tiere bewegte. Innerhalb der absoluten als auch relativen Anzahl von Spender- und Empfängerzellen konnte kein Einfluss von *Dnmt3a* und *Ppm1d* auf die Anreicherung lokaler Leukozyten im Kolongewebe festgestellt werden (Abb. 25). Im Unterschied zur klonalen Expansion im Kreislaufsystem und Knochenmark konnte eine verstärkte Anreicherung *Tet2*-defizienter Spenderzellen im Kolongewebe

nachgewiesen werden (Abb. 30). Eine Anreicherung im Kolongewebe konnte auch im Modell mit *Tp53*<sup>R270H/+</sup>-mutierten Spenderzellen gefunden werden (Abb. 35). Die lokale Entzündung begünstigte für beide Treiber-Gene im adoptiven Transplantationsmodell eine verstärkte Anreicherung der mutierten Zellen. Um zu bestimmen, inwiefern dieser Effekt einen Einfluss auf das systemische Inflammationsgeschehen hat, wurden die Konzentrationen der für die Kolitis charakteristischen Zytokine IL-6 und TNF-alpha im Blut innerhalb der Transplantationsstudien bestimmt<sup>199</sup>. Erhöhte relative Blutplasmalevel für IL-6 und TNF-alpha konnten im Vergleich der Mutanten zu den Wildtypgeschwistern für *Dnmt3a*-, *Ppm1d*- und *Tet2*-Spenderzellen nicht nachgewiesen werden (Abb. 23, 28). Absolut erhöhte Level, insbesondere von TNF-alpha, begünstigen jedoch die klonale Expansion *Tet2*-defizienter Zellen und könnten die Migration in periphere Gewebe, wie im Kolon beobachtet, zusätzlich beschleunigen<sup>32</sup>. Da die unbehandelten Tiere keine erhöhten Entzündungsmarkerwerte aufwiesen, blieb eine Anreicherung in diesen aus. Das festgestellte Ergebnis kann somit hauptsächlich auf die erhöhten TNF-alpha-Spiegel in akuten CED-Phasen zurückgeführt werden. Die proinflammatorischen Eigenschaften *Tet2*-defizienter Zellen legen eine zusätzliche Verstärkung der Entzündung nahe. Eine verstärkte Inflammation des Darms konnte zwar nicht festgestellt werden, aber auf Grundlage des proinflammatorischen Phänotyps, der bei einem *Tet2 knock-out* auftritt<sup>200</sup>, könnte dies Auswirkungen auf den Schweregrad der Entzündung haben. Die begünstigenden Faktoren eines *knock-out* in diesem Gen auf das NLRP3 (*nucleotide-binding domain-like receptor protein 3*)-Inflammasom System könnten sich zusätzlich negativ auf die vorhandenen entzündlichen Charakteristika der induzierten Kolitis auswirken<sup>186</sup>. Der proinflammatorische Charakter von *Tet2* könnte neben der akuten Phase auch Auswirkungen auf ein mögliches Inflammationsgeschehen in der Remission haben, die Anreicherung im Kolongewebe stellt dahingehend einen entsprechenden Ansatz dar. Dieses Ergebnis bedarf zur verbesserten Verständlichkeit weiterer Untersuchungen, bestätigt aber die Hypothese, der hier vorliegenden Arbeit, eines generellen Zusammenhangs zwischen chronisch-entzündlichen Erkrankungen in Form der experimentell-induzierte Kolitis und der klonalen Expansion hämatologischer Treiber-Gene.

Als Transkriptionsfaktor beeinflusst p53 maßgeblich die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine aus Makrophagen<sup>201</sup>. Daneben supprimiert eine reduzierte p53-Aktivität die Polarisation zu M2-Makrophagen, welche wichtig zur Entzündungsaflösung und Initiation körpereigener Reparaturprozesse sind<sup>202</sup>. Die erhöhte Chimärenanzahl der *Tp53*<sup>R270H/+</sup>-defizienten Spenderzellen im entzündeten Kolongewebe fördert somit das durch die Rekrutierung von Makrophagen induzierte Entzündungsgeschehen. Daneben stehen IL-6 und p53 in einem autoregulatorischen Verhältnis zueinander<sup>203</sup>. Die ausbleibende Regulation über p53 führte zu

erhöhten IL-6-Leveln im Blutbild im Vergleich zur nicht mutierten Kontrollgruppe (Abb. 33). Die mit CED einhergehende akute Entzündung förderte zusätzlich die Verstärkung der IL-6 Expression, mit resultierender beschleunigter Migration der mutierten Zellen in das entzündete Gewebe. Des Weiteren konnte IL-6 bereits eine Relevanz in der Tumorgenese in Bezug auf eine verstärkte Proliferation und einer unterbundenen Apoptose zugeschrieben werden<sup>204</sup>. Hohe Konzentrationen von IL-6 stehen außerdem in enger Korrelation zu einem verstärktem Auftreten kolorektaler Tumore<sup>205</sup>, als auch einer verminderten Expression von Tp53<sup>203</sup>. Der hier aufgezeigte Effekt der Expansion mutierter *Tp53*-Zellen zeigt zusätzlich den umgekehrten Weg auf die IL-6 Konzentration auf, die neben dem präkanzerogenen Potential auch einen CHIP bedingten Einfluss hat. Unabhängig von der Ausbildung maligner Tumore können erhöhte IL-6-Level bereits Einfluss auf die lokale Inflammation sowie Rekrutierung myeloider Zellen aus dem Knochenmark haben. Unter inflammatorischen DSS-induzierten Bedingungen migrieren die modifizierten neutrophilen Granulozyten und Monozyten bevorzugt zum Ursprung der Entzündung, spezifisch in dem gewählten Modell in das Kolongewebe. Ein langfristiger Effekt der klonalen Expansion der *Tp53*-Zellen könnte sich demnach auch auf die Anteile innerhalb peripherer Leukozyten auswirken. Dieser Vorgang geht zwangsläufig aufgrund des IL-6 bedingten proinflammatorischen Phänotyps dieser Zellen mit einer verstärkten Inflammation einher und könnte sich zusätzlich negativ auf den Krankheitsverlauf innerhalb der chronischen CED auswirken.

#### 4.5 Offene Fragen und Ausblick

Die hier erhobenen Daten weisen auf einen Einfluss chronisch-entzündlicher Erkrankungen am Beispiel der Kolitis ulerosa auf die klonale Expansion hämatologischer Treiber-Gene. Interessanterweise konnte keine generell verstärkte Expansion im Zuge von Inflammation beobachtet werden. Nicht alle Treiber-Gene erwiesen sich als gleichermaßen moduliert, sondern es konnten spezifisch Effekte einer verstärkten Differenzierung von Stammzellen, erhöhten Kolonmigration und IL-6 abhängigen Inflammation bei den Treiber-Genen *Tp53* und *Tet2* festgestellt werden. Um verschiedene Treiber-Gene vergleichend beurteilen zu können, sollte für *Ppm1d<sup>mut/mut</sup>* und *Dnmt3a<sup>fl-R878H+</sup>* das Modell ohne vorherige Präkonditionierung ebenfalls in Betracht gezogen werden. Die Ausprägung der CH erfolgt hauptsächlich in Abhängigkeit der Lokalisation des Entzündungsherd und des vorhandenen Zytokinprofils. Inwiefern die CH das Kreislaufsystem betrifft, konnte nicht abschließend geklärt werden. Da die CED eine lebenslange Erkrankung darstellt, können konkrete Aussagen nur anhand der Datenerhebung über einen verlängerten Zeitraum getroffen werden. Die Untersuchung nach fünf Zyklen und einer

ausreichenden Remission stellt einen wichtigen Ansatz für Folgeuntersuchungen dar, um den genauen Hintergrund des alternierenden Verlaufs von akuten Phasen und Remissionen zu verstehen, dar. Die Aufnahme der zellulären Parameter des Kolons bietet eine geeignete Beurteilung der relevanten lokalen Entzündungsmarker. Zur abschließenden Bewertung des Schweregrads sollten zusätzlich auch histologische Untersuchungen durchgeführt werden. In der Gesamtheit dieser Arbeit lässt sich als Schlusspunkt die Übertragbarkeit auf die humane Situation darlegen. Die erhaltenen Daten wurden alle im Mausmodell generiert und lassen sich nicht vollständig auf den Menschen übertragen. Trotz alledem bilden die Ergebnisse im Sinne der Grundlagenforschung einen wichtigen Ansatz zum verbesserten Verständnis physiologischer Mechanismen und den Grundstein für klinische Untersuchungen im humanen Modell. Vor allem *Tp53<sup>R270H/+</sup>*-Mutationen als auch IL-6 könnten zukünftig als potenzielle genetische und diagnostische Biomarker, unabhängige Risikofaktoren oder auch als pharmakologische Zielstrukturen bei gemeinsamem Auftreten von CED und CHIP fungieren.

## 5 Zusammenfassung

Die Akquirierung somatischer DNA-Mutationen einzelner Blutzellpopulationen im Kreislaufsystem stellt einen natürlichen Prozess des Alterns dar. Das Auftreten dieser Mutationen in Genen mit Einfluss auf die Selbsterneuerung, Proliferation und Apoptose betroffener hämatopoetischer Zellen korreliert mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung hämatologischer Erkrankungen. Neben diesem Effekt geht das generierte Zellmosaik mit einer Zunahme der Prävalenz an chronisch-entzündlichen Erkrankungen, im Speziellen bezüglich einer atherosklerotischen, kardiovaskulär bedingten Mortalität, einher und wird dementsprechend als klonale Hämatopoese mit unbestimmtem Potential (CHIP) bezeichnet. Die chronisch-entzündliche Darmerkrankung (CED) charakterisiert sich durch das Auftreten rezidivierender Entzündungsschübe mit systemischen Auswirkungen. Ähnlich wie das Altern stehen chronische entzündliche Konditionen im Verdacht den Selektionsdruck auf Stammzellen und somit eine bestehende Mutation zu fördern.

Die vorliegende Studie versucht dahingehend Evidenz zu schaffen und eine generelle Kausalität zwischen der CHIP und CED zu bestätigen. Dementsprechend wurde im tierexperimentellen Modell der experimentell-induzierten Kolitis mit Dextrannatriumsulfat (DSS) der systemische Effekt der intestinalen Entzündung sowie die Expansion mutierter Treibergene untersucht. Die experimentelle Kolitis geht demnach mit einer verminderten Gewichtszunahme und erhöhter Mortalität einher. Lokal bedingt die Induktion einen Verlust der intestinalen Morphologie, weitergehend können auch ubiquitäre Effekte wie eine Splenomegalie mit herbeigeführter extramedullärer Hämatopoese und eine erhöhte arterielle Plaquelastung mikroskopisch festgestellt werden. Auf zellulärer Ebene kommt es zu einer angeregten Neubildung myeloider Zellen, die sich zusätzlich in einer Zunahme der für diese wichtigen Granulozyten-Monozyten-Vorläuferzellen (GMP) im Knochenmark zeigt. Im Modell der Knochenmarkstransplantation mit den am häufigsten auftretenden Treibergenen, konnte das für das Tumorprotein p53 (Tp53) kodierende Gen *Tp53* als vielversprechender Kandidat ausgemacht werden. Mechanistisch fördert die CED die Ausschüttung von Interleukin 6 (IL-6) im Blutplasma und die Migration der proinflammatorischen Zellen in das intestinale Gewebe. Des Weiteren expandieren die für *Tp53*-modifizierten Stammzellen in die myeloide Zellreihe der multipotenten Vorläuferzellen-Gruppe 3 (MPP3, *Multipotent progenitor group 3*) und können langfristig das Blutbild als Reaktion auf die rezidivierende Inflammation beeinflussen. Die Ergebnisse dieser Arbeit widerlegen somit die generelle Pauschalisierung einer verstärkten CH unter inflammatorischen Bedingungen, zeigen jedoch die hohe Bedeutung der durch IL-6 geförderten Entzündung im Zuge der Expansion *Tp53*-mutierter Zellen auf.

## 6 Summary

Acquiring somatic DNA mutations of individual blood cell populations in the circulatory system is a natural aging process. The occurrence of these in genes affecting self-renewal, proliferation, and apoptosis of hematopoietic cells correlates with an increased risk for the development of hematological diseases. In addition to this effect, the generated cell mosaic is associated with an increase in the prevalence of chronic inflammatory diseases, especially regarding to atherogenic cardiovascular mortality, and is accordingly referred to as clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP). Chronic inflammatory bowel disease (IBD) is characterized by the occurrence of recurrent inflammatory episodes with systemic effects. Like aging, chronic inflammatory conditions are suspected to promote selection pressure on stem cells and thus an existing mutation. The present study tries to create evidence and to confirm a general causal relationship between IBD and CHIP. Accordingly, the systemic effect of intestinal inflammation and the expansion of mutated driver genes were investigated in the model of experimentally induced colitis with dextran sodium sulfate (DSS). Experimental colitis is therefore associated with reduced weight gain and increased mortality. Locally, the induction causes a loss of intestinal morphology. Furthermore, ubiquitous effects such as splenomegaly with induced extramedullary hematopoiesis and increased arterial plaque load can be detected microscopically. At the cellular level, there is a stimulated formation of myeloid cells, which is also reflected in an increase in the granulocyte-monocyte progenitor cells (GMP) in the bone marrow, which are important for these cells. In the model of bone marrow transplantation with the most frequently occurring driver genes, the gene *Tp53*, which encodes for the tumor protein p53 (Tp53), could be identified as a promising candidate. Mechanistically, IBD promotes the release of interleukin 6 (IL-6) in the blood plasma and the migration of pro-inflammatory cells into the intestinal tissue. Furthermore, the *Tp53*-modified stem cells expand into the myeloid lineage of multipotent progenitor group 3 (MPP3) and can long-term affect the blood count in response to recurrent inflammation. The results of this work thus refute the general generalization of an increased CH under inflammatory conditions but show the importance of the IL-6-promoted inflammation in the course of the expansion of *Tp53*-mutated cells.

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Verschiedene Arten der klonalen Hämatopoese.....	2
Abbildung 2 Modifizierte S3-Leitlinie zur Behandlung der Kolitis ulcerosa. ....	9
Abbildung 3 Zusammenhang zwischen der chronisch-entzündlichen Darmerkrankung (CED) und der Entwicklung/ Progression der Atherosklerose.....	17
Abbildung 4 Versuchsaufbau der experimentell-induzierten chronischen Kolitis.....	23
Abbildung 5 Schematischer Versuchsaufbau des myeloablativen Knochenmarktransfers in Kombination mit der experimentell-induzierten Kolitis.....	25
Abbildung 6 Schematischer Versuchsaufbau des adoptiven Knochenmarktransfers (AKMT) in Kombination mit der experimentell-induzierten Kolitis. ....	26
Abbildung 7 Gating-Schema zur Differenzierung myeloider und lymphoider Leukozyten im Knochenmark und Blutkreislaufsystem. ....	32
Abbildung 8 Gating-Schema zur Differenzierung der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen im Knochenmark. ....	34
Abbildung 9 Gating-Schema zur Differenzierung der klonalen Expansion der CD45.2 mutierten Donorzellen im Blutkreislauf. ....	36
Abbildung 10 Gating-Schema zur Differenzierung der klonalen Expansion der CD45.2 mutierten Donorzellen im Knochenmark. ....	38
Abbildung 11 Gating-Schema zur Differenzierung der klonalen Expansion der CD45.2 mutierten Donorzellen im Kolongewebe.....	40
Abbildung 12 Reduzierte Gewichtszunahme in C57BL/6J und <i>ApoE</i> -defizienten Mäusen nach experimentell induzierter Kolitis.....	46
Abbildung 13 Morphologische Veränderungen des Kolons in DSS-behandelten C57BL/6J und <i>ApoE</i> -defizienten Mäusen. ....	47
Abbildung 14 Verringerte mRNA-Level von <i>Bmal1</i> und <i>Per2</i> im intestinalen Gewebe DSS-behandelter <i>ApoE</i> -defizienter Mäuse. ....	48
Abbildung 15 Morphologische Veränderungen der Milz in DSS-behandelten C57BL/6J und <i>ApoE</i> -defizienten Mäusen. ....	49
Abbildung 16 Erhöhte Plaquebelastung der Aorta in DSS-behandelten <i>ApoE</i> -defizienten Mäusen.....	50
Abbildung 17 Erhöhte Anzahl zirkulierender Leukozyten in experimentell-induzierter Kolitis. ....	51
Abbildung 18 Erhöhte knochenmarksresidente Leukozyten in experimentell-induzierter Kolitis. ....	52
Abbildung 19 Erhöhte Vorläuferzellanzahl der neutrophilen Granulozyten und Monozyten im Knochenmark in experimentell-induzierter Kolitis.....	53
Abbildung 20 <i>Ppm1d</i> -Sequenzierung knochenmarksresidenter neutrophiler Granulozyten und Monozyten zeigt keine Evidenz induzierter somatischer Mutationen.....	55



Abbildung 21 Keine reduzierte Gewichtszunahme in CD45.1-Pepboy-Mäusen nach experimentell induzierter Kolitis in einem myeloablativen Knochenmarkstransfer-Modell mit <i>Ppm1d</i> <sup>mut/mut</sup> -punktmutierten und <i>Dnmt3a</i> <sup>fl-R878H+</sup> -defizienten Donorzellen.....	57
Abbildung 22 Keine verstärkte klonale Expansion <i>Ppm1d</i> <sup>mut/mut</sup> -punktmutierter oder <i>Dnmt3a</i> <sup>fl-R878H+</sup> -defizienter CD45.2 Leukozyten im Blut während der experimentell-induzierten Kolitis. ....	58
Abbildung 23 Keine erhöhte Entzündungsmarkerkonzentration durch <i>Ppm1d</i> <sup>mut/mut</sup> -punktmutierten und <i>Dnmt3a</i> <sup>fl-R878H+</sup> -defizienten Donorzellen in CD45.1-Pepboy-Mäusen nach experimentell induzierter Kolitis .....	59
Abbildung 24 Keine verstärkte klonale Expansion CD45.2 <i>Ppm1d</i> <sup>mut/mut</sup> -punktmutierter oder <i>Dnmt3a</i> <sup>fl-R878H+</sup> -defizienter hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen im Knochenmark nach experimentell-induzierter Kolitis.....	60
Abbildung 25 Keine verstärkte Anreicherung CD45.2 <i>Ppm1d</i> <sup>mut/mut</sup> -punktmutierter oder <i>Dnmt3a</i> <sup>fl-R878H+</sup> -defizienter Leukozyten im Kolongewebe nach experimentell-induzierter Kolitis. ....	61
Abbildung 26 Keine reduzierte Gewichtszunahme in CD45.1 Pepboy-Mäusen nach experimentell induzierter Kolitis in einem adoptiven Knochenmarkstransfer Modell mit <i>Tet2</i> -defizienten Donorzellen. ....	63
Abbildung 27 Keine verstärkte klonale Expansion <i>Tet2</i> -defizienter Leukozyten im Blut während der experimentell-induzierten Kolitis. ....	64
Abbildung 28 Keine erhöhte Entzündungsmarkerkonzentration in CD45.1-Pepboy-Mäusen nach experimentell induzierter Kolitis in einem adoptiven Knochenmarkstransfer Modell mit <i>Tet2</i> -defizienten Donorzellen. ....	65
Abbildung 29 Keine verstärkte klonale Expansion CD45.2 <i>Tet2</i> -defizienter hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen im Knochenmark nach experimentell-induzierter Kolitis.....	66
Abbildung 30 Verstärkte Anreicherung CD45.2 <i>Tet2</i> -defizienter Leukozyten im Kolongewebe nach experimentell-induzierter Kolitis. ....	67
Abbildung 31 Keine reduzierte Gewichtszunahme in CD45.1-Pepboy-Mäusen nach experimentell induzierter Kolitis in einem adoptiven Knochenmarkstransfer Modell mit <i>Tp53</i> <sup>R270H/+</sup> -defizienten Donorzellen. ....	68
Abbildung 32 Keine verstärkte klonale Expansion <i>Tp53</i> <sup>R270H/+</sup> -defizienter Leukozyten im Blut während der experimentell-induzierten Kolitis. ....	69
Abbildung 33 Erhöhte IL-6 Konzentration in CD45.1-Pepboy-Mäusen nach experimentell induzierter Kolitis in einem adoptiven Knochenmarkstransfer Modell mit <i>Tp53</i> <sup>R270H/+</sup> -mutierten Donorzellen. ....	70
Abbildung 34 Verstärkte klonale Expansion CD45.2 <i>Tp53</i> <sup>R270H/+</sup> -defizienter hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen im Knochenmark nach experimentell-induzierter Kolitis. ....	71
Abbildung 35 Verstärkte Anreicherung CD45.2 <i>Tp53</i> <sup>R270H/+</sup> -mutierter Leukozyten im Kolongewebe nach experimentell-induzierter Kolitis. ....	72
Abbildung 36 Hierarchie der Vorläuferzellen des hämatopoetischen Systems.....	79

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Verwendete Reagenzien .....	18
Tabelle 2 Material.....	19
Tabelle 3 Geräte.....	20
Tabelle 4 Programme.....	20
Tabelle 5 Herstellerverzeichnis .....	21
Tabelle 6 Verwendete Mauslinien.....	22
Tabelle 7 Verwendete Antikörper zur durchflusszytometrischen Analyse von Leukozyten und Stammzellen .....	29
Tabelle 8 Markerkombination zur Unterscheidung der Leukozytenpopulationen.....	32
Tabelle 9 Markerkombination zur Unterscheidung der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen im Knochenmark. ....	33
Tabelle 10 Markerkombination zur Unterscheidung der CD45.1 und CD45.2 positiven Leukozytenpopulationen.....	35
Tabelle 11 Markerkombination zur Unterscheidung der CD45.1 und CD45.2 positiven hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen im Knochenmark.....	37
Tabelle 12 Markerkombination zur Unterscheidung der CD45.1 und CD45.2 positiven Leukozytenpopulationen im Kolongewebe .....	39
Tabelle 13 Eingesetzte Primersequenzen zur <i>Ppm1d</i> -Sequenzierung.....	41
Tabelle 14 Verwendetes Programm am Bio-Rad T100 Cycler.....	42
Tabelle 15 Eingesetzte qPCR-Primersequenzen .....	43

## 9 Literaturverzeichnis

1. Steensma, D. P. *et al.* Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood* **126**, 9–16 (2015).
2. Shlush, L. I., Zandi, S., Itzkovitz, S. & Schuh, A. C. Aging, clonal hematopoiesis and preleukemia: not just bad luck? *Int. J. Hematol.* **102**, 513–522 (2015).
3. Welch, J. S. *et al.* The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell* **150**, 264–278 (2012).
4. Genovese, G. *et al.* Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence. *N. Engl. J. Med.* **371**, 2477–2487 (2014).
5. Kowalski, J. *et al.* Heat-shock promoter-driven synthesis of secreted bovine herpesvirus glycoproteins in transfected cells. *Vaccine* **11**, 1100–1107 (1993).
6. Marnell, C. S., Bick, A. & Natarajan, P. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP): Linking somatic mutations, hematopoiesis, chronic inflammation and cardiovascular disease. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **161**, 98–105 (2021).
7. Forsberg, L. A., Gisselsson, D. & Dumanski, J. P. Mosaicism in health and disease - clones picking up speed. *Nat. Rev. Genet.* **18**, 128–142 (2017).
8. Robertson, N. A. *et al.* Longitudinal dynamics of clonal hematopoiesis identifies gene-specific fitness effects. *Nat. Med.* **28**, 1439–1446 (2022).
9. Jaiswal, S. *et al.* Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes. *N. Engl. J. Med.* **371**, 2488–2498 (2014).
10. P Wright, D. *et al.* Physiological Migration of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells *Science*. **294**, 1933-1936 (2021).
11. Biechonski, S., Yassin, M. & Milyavsky, M. DNA-damage response in hematopoietic stem cells: an evolutionary trade-off between blood regeneration and leukemia suppression. *Carcinogenesis* **38**, 367–377 (2017).
12. Cook, E. K., Luo, M. & Rauh, M. J. Clonal hematopoiesis and inflammation: Partners in leukemogenesis and comorbidity. *Exp. Hematol.* **83**, 85–94 (2020).
13. Avagyan, S. *et al.* Resistance to inflammation underlies enhanced fitness in clonal hematopoiesis. *Science* **374**, 768–772 (2021).
14. Champion, K. M., Gilbert, J. G., Asimakopoulos, F. A., Hinshelwood, S. & Green, A. R. Clonal haemopoiesis in normal elderly women: implications for the myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Br. J. Haematol.* **97**, 920–926 (1997).
15. Martínez-Jiménez, F. *et al.* A compendium of mutational cancer driver genes. *Nat. Rev. Cancer* **20**, 555–572 (2020).
16. Kishtagari, A., Levine, R. L. & Viny, A. D. Driver mutations in acute myeloid leukemia. *Curr. Opin. Hematol.* **27**, 49 (2020).
17. Mardis, E. R. *et al.* Recurring Mutations Found by Sequencing an Acute Myeloid Leukemia Genome. *N. Engl. J. Med.* **361**, 1058–1066 (2009).

18. Grabek, J., Straube, J., Bywater, M. & Lane, S. W. MPN: The Molecular Drivers of Disease Initiation, Progression and Transformation and their Effect on Treatment. *Cells* **9**, 1901 (2020).
19. Togasaki, E. *et al.* Frequent somatic mutations in epigenetic regulators in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *Blood Cancer J.* **7**, e559–e559 (2017).
20. Lee, M. K. S. *et al.* Interplay between Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential and Metabolism. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* **31**, 525–535 (2020).
21. Pasupuleti, S. K. *et al.* Obesity-Induced Inflammation Co-Operates with Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential (CHIP) Mutants to Promote Leukemia Development and Cardiovascular Disease. *Blood* **138**, 1094 (2021).
22. Wong, W. *et al.* Clonal hematopoiesis and risk of chronic liver disease. (2022). doi:10.1101/2022.01.17.22269409.
23. Wu, D. *et al.* Glucose-regulated phosphorylation of TET2 by AMPK reveals a pathway linking diabetes to cancer. *Nature* **559**, 637–641 (2018).
24. Xu, W. *et al.* Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of  $\alpha$ -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell* **19**, 17–30 (2011).
25. Cardiovascular diseases. <https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases>.
26. Roth, G. A. *et al.* Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet* **392**, 1736–1788 (2018).
27. GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Lond. Engl.* **396**, 1204–1222 (2020).
28. Jaiswal, S. *et al.* Clonal Hematopoiesis and Risk of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *N. Engl. J. Med.* **377**, 111–121 (2017).
29. Jaiswal, S. *et al.* Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N. Engl. J. Med.* **371**, 2488–2498 (2014).
30. Svensson, E. C. *et al.* TET2-Driven Clonal Hematopoiesis and Response to Canakinumab: An Exploratory Analysis of the CANTOS Randomized Clinical Trial. *JAMA Cardiol.* **7**, 521–528 (2022).
31. Fuster, J. J. *et al.* Clonal hematopoiesis associated with TET2 deficiency accelerates atherosclerosis development in mice. *Science* **355**, 842–847 (2017).
32. Abegunde, S. O., Buckstein, R., Wells, R. A. & Rauh, M. J. An inflammatory environment containing TNF $\alpha$  favors Tet2-mutant clonal hematopoiesis. *Exp. Hematol.* **59**, 60–65 (2018).
33. Korzenik, J. R. Past and current theories of etiology of IBD: toothpaste, worms, and refrigerators. *J. Clin. Gastroenterol.* **39**, S59–65 (2005).
34. Sloan, W. P., Bagen, F. A. & Gage, R. P. Life Histories of Patients With Chronic Ulcerative Colitis: A Review of 2,000 Cases\*†. *Gastroenterology* **16**, 25–38 (1950).
35. Molodecky, N. A. *et al.* Increasing Incidence and Prevalence of the Inflammatory Bowel Diseases With Time, Based on Systematic Review. *Gastroenterology* **142**, 46–54.e42 (2012).

36. Piovani, D. *et al.* Environmental Risk Factors for Inflammatory Bowel Diseases: An Umbrella Review of Meta-analyses. *Gastroenterology* **157**, 647-659.e4 (2019).
37. Cleynen, I. *et al.* Inherited determinants of Crohn's disease and ulcerative colitis phenotypes: a genetic association study. *Lancet Lond. Engl.* **387**, 156–167 (2016).
38. Elsherif, Y., Alexakis, C. & Mendall, M. Determinants of Weight Loss prior to Diagnosis in Inflammatory Bowel Disease: A Retrospective Observational Study. *Gastroenterol. Res. Pract.* **2014**, 762191 (2014).
39. Wittkower, E. Ulcerative Colitis: Studies of Personality. *Br. Med. J.* **2**, 1356–1360 (1938).
40. Baumgart, D. C. & Carding, S. R. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet Lond. Engl.* **369**, 1627–1640 (2007).
41. Podolsky, D. K. Inflammatory bowel disease. *N. Engl. J. Med.* **347**, 417–429 (2002).
42. Stange, E. F. & Schroeder, B. O. Microbiota and mucosal defense in IBD: an update. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **13**, 963–976 (2019).
43. Wehkamp, J. *et al.* NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* **53**, 1658–1664 (2004).
44. Wehkamp, J. & Stange, E. F. An Update Review on the Paneth Cell as Key to Ileal Crohn's Disease. *Front. Immunol.* **11**, (2020).
45. Gersemann, M. *et al.* Differences in goblet cell differentiation between Crohn's disease and ulcerative colitis. *Differ. Res. Biol. Divers.* **77**, 84–94 (2009).
46. Wark, G., Samocha-Bonet, D., Ghaly, S. & Danta, M. The Role of Diet in the Pathogenesis and Management of Inflammatory Bowel Disease: A Review. *Nutrients* **13**, 135 (2020).
47. Authors & Collaborators: Updated S3-Guideline Ulcerative Colitis. German Society for Digestive and Metabolic Diseases (DGVS). *Z. Gastroenterol.* **57**, 162–241 (2019).
48. Svartz, M. The treatment of 124 cases of ulcerative colitis with salazopyrine and attempts of desensibilization in cases of hypersensitiveness to sulfa. *Acta Med. Scand.* **131**, 465–472 (1948).
49. Truelove, S. C. & Witts, L. J. Cortisone in ulcerative colitis; final report on a therapeutic trial. *Br. Med. J.* **2**, 1041–1048 (1955).
50. Jewell, D. P. & Truelove, S. C. Azathioprine in ulcerative colitis: final report on controlled therapeutic trial. *Br. Med. J.* **4**, 627–630 (1974).
51. Bean, R. H. D. Treatment of Ulcerative Colitis with Antimetabolites. *Br. Med. J.* **1**, 1081–1084 (1966).
52. Vedolizumab as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23964932/>.
53. Ustekinumab as Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis | NEJM. <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1900750>.
54. Sandborn, W. J. *et al.* Tofacitinib as Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis. *N. Engl. J. Med.* **376**, 1723–1736 (2017).
55. Chandan, S. *et al.* Safety and Efficacy of Biological Therapy in Chronic Antibiotic Refractory

- Pouchitis: A Systematic Review With Meta-analysis. *J. Clin. Gastroenterol.* **55**, 481–491 (2021).
56. Kruis, W. *et al.* Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* **53**, 1617–1623 (2004).
57. Vavricka, S. R. *et al.* Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **21**, 1982–1992 (2015).
58. Vavricka, S. R. *et al.* Frequency and risk factors for extraintestinal manifestations in the Swiss inflammatory bowel disease cohort. *Am. J. Gastroenterol.* **106**, 110–119 (2011).
59. Veloso, F. T., Carvalho, J. & Magro, F. Immune-related systemic manifestations of inflammatory bowel disease. A prospective study of 792 patients. *J. Clin. Gastroenterol.* **23**, 29–34 (1996).
60. Bourikas, L. A. & Papadakis, K. A. Musculoskeletal manifestations of inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **15**, 1915–1924 (2009).
61. Harbord, M. *et al.* The First European Evidence-based Consensus on Extra-intestinal Manifestations in Inflammatory Bowel Disease. *J. Crohns Colitis* **10**, 239–254 (2016).
62. Rudwaleit, M. & Baeten, D. Ankylosing spondylitis and bowel disease. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **20**, 451–471 (2006).
63. Trost, L. & McDonnell, J. Important cutaneous manifestations of inflammatory bowel disease. *Postgrad. Med. J.* **81**, 580–585 (2005).
64. Thrash, B., Patel, M., Shah, K. R., Boland, C. R. & Menter, A. Cutaneous manifestations of gastrointestinal disease: part II. *J. Am. Acad. Dermatol.* **68**, 211.e1–33; quiz 244–246 (2013).
65. Troncoso, L. L., Biancardi, A. L., de Moraes, H. V. & Zaltman, C. Ophthalmic manifestations in patients with inflammatory bowel disease: A review. *World J. Gastroenterol.* **23**, 5836–5848 (2017).
66. Fausa, O., Schrumpf, E. & Elgjo, K. Relationship of inflammatory bowel disease and primary sclerosing cholangitis. *Semin. Liver Dis.* **11**, 31–39 (1991).
67. Kulnigg, S. & Gasche, C. Systematic review: managing anaemia in Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **24**, 1507–1523 (2006).
68. Guidelines on the diagnosis and management of iron deficiency and anemia in inflammatory bowel diseases - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17985376/>.
69. Greuter, T. *et al.* Emerging treatment options for extraintestinal manifestations in IBD. *Gut* **70**, 796–802 (2021).
70. Scheiermann, C., Gibbs, J., Ince, L. & Loudon, A. Clocking in to immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 423–437 (2018).
71. Panda, S., Hogenesch, J. B. & Kay, S. A. Circadian rhythms from flies to human. *Nature* **417**, 329–335 (2002).
72. Man, K., Loudon, A. & Chawla, A. Immunity around the clock. *Science* **354**, 999–1003 (2016).
73. Ko, C. H. & Takahashi, J. S. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum. Mol. Genet.* **15 Spec No 2**, R271–277 (2006).

74. Weintraub, Y. *et al.* Clock Gene Disruption Is an Initial Manifestation of Inflammatory Bowel Diseases. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* **18**, 115–122.e1 (2020).
75. Franceschi, C. *et al.* Inflamm-aging: An Evolutionary Perspective on Immunosenescence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **908**, 244–254 (2000).
76. Quezada, S. M. & Cross, R. K. Association of Age at Diagnosis and Ulcerative Colitis Phenotype. *Dig. Dis. Sci.* **57**, 10.1007/s10620-012-2081-z (2012).
77. Mikkola, H. K. A. & Orkin, S. H. The journey of developing hematopoietic stem cells. *Dev. Camb. Engl.* **133**, 3733–3744 (2006).
78. Scadden, D. T. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature* **441**, 1075–1079 (2006).
79. Morrison, S. J. & Scadden, D. T. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* **505**, 327–334 (2014).
80. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15989959/>.
81. Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M. & Nagasawa, T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* **25**, 977–988 (2006).
82. Xavier, R. J. & Podolsky, D. K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* **448**, 427–434 (2007).
83. Phillipson, M. & Kubes, P. The neutrophil in vascular inflammation. *Nat. Med.* **17**, 1381–1390 (2011).
84. Rosales, C. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? *Front. Physiol.* **9**, 113 (2018).
85. Scapini, P. & Cassatella, M. A. Social networking of human neutrophils within the immune system. *Blood* **124**, 710–719 (2014).
86. Auffray, C., Sieweke, M. H. & Geissmann, F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 669–692 (2009).
87. Nahrendorf, M. *et al.* The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J. Exp. Med.* **204**, 3037–3047 (2007).
88. Serbina, N. V. & Pamer, E. G. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat. Immunol.* **7**, 311–317 (2006).
89. Andoh, A. *et al.* Mucosal cytokine network in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* **14**, 5154–5161 (2008).
90. Principi, M. *et al.* Endothelial function and cardiovascular risk in active inflammatory bowel diseases. *J. Crohns Colitis* **7**, e427–433 (2013).
91. Mitroulis, I., Kalafati, L., Bornhäuser, M., Hajishengallis, G. & Chavakis, T. Regulation of the Bone Marrow Niche by Inflammation. *Front. Immunol.* **11**, 1540 (2020).
92. Zhang, C. R. C. *et al.* Inflammatory cytokines promote clonal hematopoiesis with specific

- mutations in ulcerative colitis patients. *Exp. Hematol.* **80**, 36-41.e3 (2019).
93. Sano, S. *et al.* CRISPR-Mediated Gene Editing to Assess the Roles of Tet2 and Dnmt3a in Clonal Hematopoiesis and Cardiovascular Disease. *Circ. Res.* **123**, 335–341 (2018).
94. Cumbo, C. *et al.* Clonal Hematopoiesis at the Crossroads of Inflammatory Bowel Diseases and Hematological Malignancies: A Biological Link? *Front. Oncol.* **12**, 873896 (2022).
95. Okano, M., Xie, S. & Li, E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat. Genet.* **19**, 219–220 (1998).
96. Jia, Y. *et al.* Negative regulation of DNMT3A de novo DNA methylation by frequently overexpressed UHRF family proteins as a mechanism for widespread DNA hypomethylation in cancer. *Cell Discov.* **2**, 16007 (2016).
97. Shih, A. H., Abdel-Wahab, O., Patel, J. P. & Levine, R. L. The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 599–612 (2012).
98. Russler-Germain, D. A. *et al.* The R882H DNMT3A mutation associated with AML dominantly inhibits wild-type DNMT3A by blocking its ability to form active tetramers. *Cancer Cell* **25**, 442–454 (2014).
99. Loberg, M. A. *et al.* Sequentially inducible mouse models reveal that Npm1 mutation causes malignant transformation of Dnmt3a-mutant clonal hematopoiesis. *Leukemia* **33**, 1635–1649 (2019).
100. Kim, S. J. *et al.* A DNMT3A mutation common in AML exhibits dominant-negative effects in murine ES cells. *Blood* **122**, 4086–4089 (2013).
101. Tahiliani, M. *et al.* Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* **324**, 930–935 (2009).
102. Langemeijer, S. M. C. *et al.* Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nat. Genet.* **41**, 838–842 (2009).
103. Ko, M. *et al.* Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature* **468**, 839–843 (2010).
104. Ko, M. *et al.* Ten-Eleven-Translocation 2 (TET2) negatively regulates homeostasis and differentiation of hematopoietic stem cells in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 14566–14571 (2011).
105. Coombs, C. C. *et al.* Therapy-Related Clonal Hematopoiesis in Patients with Non-hematologic Cancers Is Common and Associated with Adverse Clinical Outcomes. *Cell Stem Cell* **21**, 374-382.e4 (2017).
106. Toufektchan, E. & Toledo, F. The Guardian of the Genome Revisited: p53 Downregulates Genes Required for Telomere Maintenance, DNA Repair, and Centromere Structure. *Cancers* **10**, 135 (2018).
107. Kern, S. E. *et al.* Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science* **252**, 1708–1711 (1991).
108. Schmitt, C. A. *et al.* Dissecting p53 tumor suppressor functions in vivo. *Cancer Cell* **1**, 289–298 (2002).
109. Olive, K. P. *et al.* Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni



syndrome. *Cell* **119**, 847–860 (2004).

110. Boettcher, S. *et al.* A dominant-negative effect drives selection of TP53 missense mutations in myeloid malignancies. *Science* **365**, 599–604 (2019).

111. Takekawa, M. *et al.* p53-inducible wip1 phosphatase mediates a negative feedback regulation of p38 MAPK-p53 signaling in response to UV radiation. *EMBO J.* **19**, 6517–6526 (2000).

112. Hsu, J. I. *et al.* PPM1D Mutations Drive Clonal Hematopoiesis in Response to Cytotoxic Chemotherapy. *Cell Stem Cell* **23**, 700-713.e6 (2018).

113. Kahn, J. D. *et al.* PPM1D-truncating mutations confer resistance to chemotherapy and sensitivity to PPM1D inhibition in hematopoietic cells. *Blood* **132**, 1095–1105 (2018).

114. Yura, Y. *et al.* The Cancer Therapy-Related Clonal Hematopoiesis Driver Gene Ppm1d Promotes Inflammation and Non-Ischemic Heart Failure in Mice. *Circ. Res.* **129**, 684–698 (2021).

115. Risk of Myocardial Infarction in Inflammatory Bowel Disease: A Population-based National Study | Inflammatory Bowel Diseases | Oxford Academic. <https://academic.oup.com/ibdjournal/article/25/6/1080/5220868?login=false>.

116. Baena-Díez, J. M. *et al.* Association between chronic immune-mediated inflammatory diseases and cardiovascular risk. *Heart Br. Card. Soc.* **104**, 119–126 (2018).

117. Cainzos-Achirica, M. *et al.* Inflammatory Bowel Disease and Atherosclerotic Cardiovascular Disease: JACC Review Topic of the Week. *J. Am. Coll. Cardiol.* **76**, 2895–2905 (2020).

118. Silvestre-Roig, C., Braster, Q., Ortega-Gomez, A. & Soehnlein, O. Neutrophils as regulators of cardiovascular inflammation. *Nat. Rev. Cardiol.* **17**, 327–340 (2020).

119. Semerad, C. L., Liu, F., Gregory, A. D., Stumpf, K. & Link, D. C. G-CSF is an essential regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood. *Immunity* **17**, 413–423 (2002).

120. Piedrahita, J. A., Zhang, S. H., Hagan, J. R., Oliver, P. M. & Maeda, N. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 4471–4475 (1992).

121. A, J.-W. *et al.* Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment. *Blood* **98**, (2001).

122. Okayasu, I. *et al.* A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* **98**, 694–702 (1990).

123. Chassaing, B., Aitken, J. D., Malleshappa, M. & Vijay-Kumar, M. Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis in Mice. *Curr. Protoc. Immunol. Ed. John E Coligan Al* **104**, Unit-15.25. (2014).

124. Ramakers, J. D. *et al.* The PPAR $\gamma$  Agonist Rosiglitazone Impairs Colonic Inflammation in Mice with Experimental Colitis. *J. Clin. Immunol.* **27**, 275–283 (2007).

125. Mp, de W. & P, H. Bone marrow transplantations to study gene function in hematopoietic cells. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **693**, (2011).

126. Park, E. *et al.* Bone Marrow Transplantation Procedures in Mice to Study Clonal

Hematopoiesis. *J. Vis. Exp. JoVE* (2021) doi:10.3791/61875.

127. Kim, S. B. *et al.* Radiation Promotes Colorectal Cancer Initiation and Progression by Inducing Senescence-Associated Inflammatory Responses. *Oncogene* **35**, 3365–3375 (2016).
128. Ginhoux, F. & Williams, M. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity* **44**, 439–449 (2016).
129. Wang, Y. *et al.* Tet2-mediated clonal hematopoiesis in nonconditioned mice accelerates age-associated cardiac dysfunction. *JCI Insight* **5**, e135204, 135204 (2020).
130. Chan, J. K. C., Ng, C. S. & Hui, P. K. A simple guide to the terminology and application of leucocyte monoclonal antibodies. *Histopathology* **12**, 461–480 (1988).
131. Valle-Noguera, A., Gómez-Sánchez, M. J., Girard-Madoux, M. J. H. & Cruz-Adalia, A. Optimized Protocol for Characterization of Mouse Gut Innate Lymphoid Cells. *Front. Immunol.* **11**, (2020).
132. Breslin, W. L., Strohacker, K., Carpenter, K. C., Haviland, D. L. & McFarlin, B. K. Mouse blood monocytes: standardizing their identification and analysis using CD115. *J. Immunol. Methods* **390**, 1–8 (2013).
133. Body Weight Information for C57BL/6J (000664). *The Jackson Laboratory* <https://www.jax.org/jax-mice-and-services/strain-data-sheet-pages/body-weight-chart-000664>.
134. Pietras, E. M. *et al.* Functionally distinct subsets of lineage-biased multipotent progenitors control blood production in normal and regenerative conditions. *Cell Stem Cell* **17**, 35–46 (2015).
135. Baydi, Z. *et al.* An Update of Research Animal Models of Inflammatory Bowel Disease. *Sci. World J.* **2021**, 7479540 (2021).
136. Saleh, M. & Trinchieri, G. Innate immune mechanisms of colitis and colitis-associated colorectal cancer. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 9–20 (2011).
137. Zheng, Z. *et al.* Screening of an anti-inflammatory peptide from *Hydrophis cyanocinctus* and analysis of its activities and mechanism in DSS-induced acute colitis. *Sci. Rep.* **6**, 25672 (2016).
138. Bamba, S. *et al.* The severity of dextran sodium sulfate-induced colitis can differ between dextran sodium sulfate preparations of the same molecular weight range. *Dig. Dis. Sci.* **57**, 327–334 (2012).
139. Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3841001/>.
140. Black, B. L. *et al.* Differential effects of fat and sucrose on body composition in A/J and C57BL/6 mice. *Metabolism.* **47**, 1354–1359 (1998).
141. Simon, M. M. *et al.* A comparative phenotypic and genomic analysis of C57BL/6J and C57BL/6N mouse strains. *Genome Biol.* **14**, R82 (2013).
142. Welkos, S. L., Keener, T. J. & Gibbs, P. H. Differences in susceptibility of inbred mice to *Bacillus anthracis*. *Infect. Immun.* **51**, 795–800 (1986).
143. Piedrahita, J. A., Zhang, S. H., Hagaman, J. R., Oliver, P. M. & Maeda, N. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem

- cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 4471–4475 (1992).
144. Meir, K. S. & Leitersdorf, E. Atherosclerosis in the apolipoprotein-E-deficient mouse: a decade of progress. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 1006–1014 (2004).
145. Carr, S., Farb, A., Pearce, W. H., Virmani, R. & Yao, J. S. Atherosclerotic plaque rupture in symptomatic carotid artery stenosis. *J. Vasc. Surg.* **23**, 755–765; discussion 765–766 (1996).
146. Falk, E. Unstable angina with fatal outcome: dynamic coronary thrombosis leading to infarction and/or sudden death. Autopsy evidence of recurrent mural thrombosis with peripheral embolization culminating in total vascular occlusion. *Circulation* **71**, 699–708 (1985).
147. Libby, P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* **104**, 365–372 (2001).
148. Falk, E., Shah, P. K. & Fuster, V. Coronary plaque disruption. *Circulation* **92**, 657–671 (1995).
149. Hansson, G. K. & Hermansson, A. The immune system in atherosclerosis. *Nat. Immunol.* **12**, 204–212 (2011).
150. Murphy, A. J. *et al.* ApoE regulates hematopoietic stem cell proliferation, monocytosis, and monocyte accumulation in atherosclerotic lesions in mice. *J. Clin. Invest.* **121**, 4138–4149 (2011).
151. Glapa-Nowak, A. *et al.* Apolipoprotein E variants correlate with the clinical presentation of paediatric inflammatory bowel disease: A cross-sectional study. *World J. Gastroenterol.* **27**, 1483–1496 (2021).
152. Britto, S. L., Krishna, M. & Kellermayer, R. Weight loss is a sufficient and economical single outcome measure of murine dextran sulfate sodium colitis. *FASEB BioAdvances* **1**, 493–497 (2019).
153. Rodrigues, B. L. *et al.* Assessment of disease activity in inflammatory bowel diseases: Non-invasive biomarkers and endoscopic scores. *World J. Gastrointest. Endosc.* **12**, 504–520 (2020).
154. Brückner, M. *et al.* Murine Endoscopy for In Vivo Multimodal Imaging of Carcinogenesis and Assessment of Intestinal Wound Healing and Inflammation. *J. Vis. Exp. JoVE* 51875 (2014) doi:10.3791/51875.
155. Mitchell, J. Lymphocyte circulation in the spleen. *Immunology* **24**, 93–107 (1973).
156. Swirski, F. K. *et al.* Identification of Splenic Reservoir Monocytes and Their Deployment to Inflammatory Sites. *Science* **325**, 612–616 (2009).
157. Steiniger, B. S. Human spleen microanatomy: why mice do not suffice. *Immunology* **145**, 334–346 (2015).
158. Bronte, V. & Pittet, M. J. The spleen in local and systemic regulation of immunity. *Immunity* **39**, 806–818 (2013).
159. Kawashima, K. *et al.* Evaluation of the relationship between the spleen volume and the disease activity in ulcerative colitis and Crohn disease. *Medicine (Baltimore)* **101**, e28515 (2022).
160. Scheiermann, C., Kunisaki, Y. & Frenette, P. S. Circadian control of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 190–198 (2013).

161. Eckel-Mahan, K. & Sassone-Corsi, P. Phenotyping Circadian Rhythms in Mice. *Curr. Protoc. Mouse Biol.* **5**, 271–281 (2015).
162. Nguyen, K. D. *et al.* Circadian gene *Bmal1* regulates diurnal oscillations of Ly6C(hi) inflammatory monocytes. *Science* **341**, 1483–1488 (2013).
163. Timmons, G. A. *et al.* The Circadian Clock Protein BMAL1 Acts as a Metabolic Sensor In Macrophages to Control the Production of Pro IL-1 $\beta$ . *Front. Immunol.* **12**, 700431 (2021).
164. Ridker, P. M. *et al.* Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N. Engl. J. Med.* **377**, 1119–1131 (2017).
165. Fournier, B. M. & Parkos, C. A. The role of neutrophils during intestinal inflammation. *Mucosal Immunol.* **5**, 354–366 (2012).
166. Jones, G.-R. *et al.* Dynamics of Colon Monocyte and Macrophage Activation During Colitis. *Front. Immunol.* **9**, 2764 (2018).
167. Li, Y. *et al.* Occurrences and Functions of Ly6Chi and Ly6Clo Macrophages in Health and Disease. *Front. Immunol.* **13**, 901672 (2022).
168. Davies, J. M. & Abreu, M. T. The innate immune system and inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.* **50**, 24–33 (2015).
169. Patel, A. A., Ginhoux, F. & Yona, S. Monocytes, macrophages, dendritic cells and neutrophils: an update on lifespan kinetics in health and disease. *Immunology* **163**, 250–261 (2021).
170. Laskowitz, D. T., Lee, D. M., Schmechel, D. & Staats, H. F. Altered immune responses in apolipoprotein E-deficient mice. *J. Lipid Res.* **41**, 613–620 (2000).
171. Dansky, H. M., Charlton, S. A., Harper, M. M. & Smith, J. D. T and B lymphocytes play a minor role in atherosclerotic plaque formation in the apolipoprotein E-deficient mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 4642–4646 (1997).
172. Me, D., L, R. & Dj, K. On the edge: the physiological and pathophysiological role of chemokines during inflammatory and immunological responses. *Semin. Immunol.* **11**, (1999).
173. Kawamoto, H. & Minato, N. Myeloid cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 1374–1379 (2004).
174. Griseri, T., McKenzie, B. S., Schiering, C. & Powrie, F. Dysregulated Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Activity Promotes Interleukin-23-Driven Chronic Intestinal Inflammation. *Immunity* **37**, 1116–1129 (2012).
175. Yáñez, A. *et al.* Granulocyte-Monocyte Progenitors and Monocyte-Dendritic Cell Progenitors Independently Produce Functionally Distinct Monocytes. *Immunity* **47**, 890-902.e4 (2017).
176. Goodridge, H. S. *et al.* Harnessing the beneficial heterologous effects of vaccination. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 392–400 (2016).
177. Baudisch, A. Hamilton's indicators of the force of selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 8263–8268 (2005).
178. Ferguson, L. R. Chronic inflammation and mutagenesis. *Mutat. Res.* **690**, 3–11 (2010).

179. Zhang, C. R. C. *et al.* Inflammatory cytokines promote clonal hematopoiesis with specific mutations in ulcerative colitis patients. *Exp. Hematol.* **80**, 36-41.e3 (2019).
180. Zhang, C. R. C. *et al.* Inflammatory cytokines promote clonal hematopoiesis with specific mutations in ulcerative colitis patients. *Exp. Hematol.* **80**, 36-41.e3 (2019).
181. Charbonneau, H., Tonks, N. K., Walsh, K. A. & Fischer, E. H. The leukocyte common antigen (CD45): a putative receptor-linked protein tyrosine phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 7182–7186 (1988).
182. Abbuehl, J.-P., Tatarova, Z., Held, W. & Huelsken, J. Long-Term Engraftment of Primary Bone Marrow Stromal Cells Repairs Niche Damage and Improves Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Cell Stem Cell* **21**, 241-255.e6 (2017).
183. Wang, Y. *et al.* Murine models of clonal haematopoiesis to assess mechanisms of cardiovascular disease. *Cardiovasc. Res.* **118**, 1413–1432 (2022).
184. Chisolm, D. A. *et al.* Defining Genetic Variation in Widely Used Congenic and Backcrossed Mouse Models Reveals Varied Regulation of Genes Important for Immune Responses. *Immunity* **51**, 155-168.e5 (2019).
185. Busque, L. *et al.* Recurrent somatic TET2 mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis. *Nat. Genet.* **44**, 1179–1181 (2012).
186. Sano, S. *et al.* Tet2-Mediated Clonal Hematopoiesis Accelerates Heart Failure Through a Mechanism Involving the IL-1 $\beta$ /NLRP3 Inflammasome. *J. Am. Coll. Cardiol.* **71**, 875–886 (2018).
187. Wang, Y. *et al.* Tet2-mediated clonal hematopoiesis in nonconditioned mice accelerates age-associated cardiac dysfunction. *JCI Insight* **5**, 135204 (2020).
188. Fuster, J. J. *et al.* Clonal hematopoiesis associated with TET2 deficiency accelerates atherosclerosis development in mice. *Science* **355**, 842–847 (2017).
189. Sano, S. *et al.* TP53-mediated therapy-related clonal hematopoiesis contributes to doxorubicin-induced cardiomyopathy by augmenting a neutrophil-mediated cytotoxic response. *JCI Insight* **6**, e146076 (2021).
190. Zekavat, S. M. *et al.* TP53-mediated clonal hematopoiesis confers increased risk for incident atherosclerotic disease. *Nat. Cardiovasc. Res.* **2**, 144–158 (2023).
191. Rafieemehr, H. *et al.* Chemo/radiotherapy-Induced Bone Marrow Niche Alterations. *Cancer Invest.* **39**, 180–194 (2021).
192. Buscarlet, M. *et al.* Lineage restriction analyses in CHIP indicate myeloid bias for TET2 and multipotent stem cell origin for DNMT3A. *Blood* **132**, 277–280 (2018).
193. Moran-Crusio, K. *et al.* Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. *Cancer Cell* **20**, 11–24 (2011).
194. Eudy, E., Loberg, M., Bell, R., Stearns, T. & Trowbridge, J. Dnmt3a Mutation Confers a Selective Advantage Specifically to Cells within the Long-Term Hematopoietic Stem Cell (LT-HSC) Compartment. *Blood* **134**, 448 (2019).
195. Levine, A. J., Puzio-Kuter, A. M., Chan, C. S. & Hainaut, P. The Role of the p53 Protein in Stem-Cell Biology and Epigenetic Regulation. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **6**, a026153

(2016).

196. Chen, S. *et al.* Mutant p53 drives clonal hematopoiesis through modulating epigenetic pathway. *Nat. Commun.* **10**, 5649 (2019).

197. Fiscella, M. *et al.* Wip1, a novel human protein phosphatase that is induced in response to ionizing radiation in a p53-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 6048–6053 (1997).

198. Jangi, S. *et al.* Risk of Relapse in Patients With Ulcerative Colitis With Persistent Endoscopic Healing: A Durable Treatment Endpoint. *J. Crohns Colitis* **15**, 567–574 (2020).

199. Reinecker, H. C. *et al.* Enhanced secretion of tumour necrosis factor- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin. Exp. Immunol.* **94**, 174–181 (1993).

200. Cull, A. H., Snetsinger, B., Buckstein, R., Wells, R. A. & Rauh, M. J. Tet2 restrains inflammatory gene expression in macrophages. *Exp. Hematol.* **55**, 56-70.e13 (2017).

201. Liu, G., Park, Y.-J., Tsuruta, Y., Lorne, E. & Abraham, E. p53 Attenuates lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation and acute lung injury. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **182**, 5063–5071 (2009).

202. Li, L. *et al.* A unique role for p53 in the regulation of M2 macrophage polarization. *Cell Death Differ.* **22**, 1081–1093 (2015).

203. Brighenti, E. *et al.* Interleukin 6 downregulates p53 expression and activity by stimulating ribosome biogenesis: a new pathway connecting inflammation to cancer. *Oncogene* **33**, 4396–4406 (2014).

204. Grivennikov, S. *et al.* IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* **15**, 103–113 (2009).

205. Kim, S. *et al.* Circulating levels of inflammatory cytokines and risk of colorectal adenomas. *Cancer Res.* **68**, 323–328 (2008).

## 10 Originalarbeiten

Hundhausen C, Schneckmann R, Ostendorf Y, Rimpler J, von Glinski A, Kohlmorgen C, Pasch N, **Rolauer L**, von Ameln F, Eckermann O, Altschmied J, Ale-Agha N, Haendeler J, Flögel U, Fischer JW, Grandoch M. (2021) *Endothelial hyaluronan synthase 3 aggravates acute colitis in an experimental model of inflammatory bowel disease*. Matrix Biol. 2021 Aug; 102:20-36.

Ostendorf Y, **Rolauer L**, Pasch N, Schaefer H, Heitmann S, Petzsch P, Poschmann G, Hartwig S, Lehr S, Koehrer S, Fischer JW, Grandoch M. (*unpublished*) *Neutrophils as major drivers of increased atherosclerosis in a murine model of chronic colitis*.

Brack F, **Rolauer L**, Niemann V, Kaczur J, Petzsch P, Köhrer K, Quast C, Gerdes N, Bouvain P, Voigt K, Krüger M, Fischer J, Brückner A, Fleischmann B, Wenzel D, Zimmermann LM, Sengle G, Flögel U, Suvorava T, Grandoch M (*unpublished*) *Lack of hyaluronan synthase 3 in mice attenuates ruptures of abdominal aortic aneurysms by reduced aortic monocyte infiltration*.

Polizio A, Marino L, Min KD, Yura Y, **Rolauer L**, Cochran J, Evans M, Park E, Doviak H, Miura-Yura E, Good M, Wolpe A, Grandoch M, Isakson B, Walsk K (*unpublished*) *Experimental TET2 clonal hematopoiesis predisposes to renal hypertension through an inflammasome-mediated mechanism*.

## 11 Posterpräsentationen

**Luca Rolauer**, Florian von Ameln, Judith Haendeler, Joachim Altschmied, Ulrich Flögel, Maria Grandoch

*Clonal hematopoiesis in experimentally-induced colitis*  
Cardiovascular Ageing: From Molecular biology to clinical perspectives, 2021, Haale (Saale)

**Luca Rolauer**, Ariel Polizio, Fedor Brack, Lucila Marino, Florian von Ameln, Judith Haendeler, Joachim Altschmied, Ulrich Flögel, Ken Walsh, Maria Grandoch

*Clonal hematopoiesis in experimentally-induced colitis*  
IRTG 1902 Summer school, 2022, Düsseldorf

**Luca Rolauer**, Ariel Polizio, Fedor Brack, Lucila Marino, Florian von Ameln, Judith Haendeler, Joachim Altschmied, Ulrich Flögel, Ken Walsh, Maria Grandoch

*Clonal hematopoiesis in experimentally-induced colitis*  
Discover BMB (American Society for Biochemistry and Molecular Biology), 2023, Seattle (USA)



---

## 12 Lebenslauf

### Person

Name	Luca Stephan Rolauer
Geburtsdatum	24.07.1995
Geburtsort	Lünen
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

---

### Promotion

01/2020 – 05/2023	Institut für Translationale Pharmakologie Universitätsklinikum Düsseldorf Thema: „Klonale Hämatopoese in experimentell induzierter Kolitis“
-------------------	---

---

### Studium

11/2019	Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung und Erteilung der Approbation als Apotheker
05/2019-10/2019	Pharmaziepraktikum, Ausbüttels Apotheke, Dortmund
11/2018-04/2019	Pharmaziepraktikum, Procter & Gamble Manufacturing GmbH, Groß- Gerau
10/2018	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
08/2016	Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
10/2014-10/2018	Pharmazie-Studium, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

---

### Schule

08/2006- 07/2014	Heisenberg-Gymnasium, Dortmund
08/2002 -07/2006	Dietrich-Bonhoeffer-Grundschule, Dortmund

---

## 13 Danksagung

Für die Unterstützung in den vergangenen Jahren zur Gewinnung der Daten dieser Arbeit, möchte ich einige Personen namentlich hervorheben. Allem voran danke ich Frau Prof. Maria Grandoch für die Betreuung der Arbeit und für die Möglichkeit, in einem neuwachsenden Institut die Chance bekommen zu haben, Forschung auf einem außerordentlichen Level betreiben zu können. Die vielen konstruktiven Gespräche ermöglichten in kurzer Zeit eine immense Weiterbildung in diversen Themenbereichen. Neben den fachlichen Kernkompetenzen erhielt ich eine Menge Unterstützung von Frau Grandoch, mich persönlich und beruflich weiterzuentwickeln, um optimal auf meinen kommenden Werdegang vorbereitet zu sein. In diesem Zusammenhang bedanke ich mich auch bei Prof. Kenneth Walsh dafür, die Möglichkeit des sechsmonatigen Aufenthalts in den USA im CVRC der UVA gehabt zu haben, und bei Herrn Prof. Jörg Breitzkreutz für die Betreuung des Promotionsvorhabens. Des Weiteren möchte ich meinen Dank für die praktische Unterstützung im Labor an der HHU an Herrn Fedor Brack, sowie an Frau Lucila Marino und Herrn Ariel Polizio an der UVA, aussprechen. Ob es die Entnahme und Aufbereitung der Proben, Messungen am Durchflusszytometer oder fachliche Nachfragen waren, die genannten Personen standen mir jederzeit tatkräftig zur Seite. Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Petra Pieres für die Hilfestellung zur Erstellung der grafischen Darstellungen dieser Arbeit. Unabhängig von der universitären Arbeit danke ich meinen Eltern Andrea und Knut Rolauer für die Begleitung meines akademischen Weges, über Schule und Studium bis hin zur Promotion. In den verschiedenen Phasen des Lebens waren und sind sie stets der wichtigste Rückhalt für mich.

## **14 Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Ich versichere, dass ich diese Arbeit nur an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vorgelegt habe.

Düsseldorf, den 24.10.2023

Luca Rolauer