

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus der Klinik für Hämatologie und Stammzelltransplantation in Essen

**Interaktion zwischen mesenchymalen Zellen und AML-Blasten
- die Rolle des Transkriptionsfaktors Gfi1**

In a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Maren Nicola Fiori
aus Essen

2023

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Offen im Denken

ub | universitäts
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/81868

URN: urn:nbn:de:hbz:465-20240513-093026-5

Alle Rechte vorbehalten.

Dekan:	Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer
1. Gutachter:	Herr Prof. Dr. med. C. Khandanpour
2. Gutachter:	Herr Prof. Dr. rer. nat. A. Schramm

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Februar 2024

Inhalt

1	Einleitung	6
1.1	Hämatopoese	6
1.2	Akute myeloische Leukämie (AML)	6
1.3	Die Nische der hämatopoetischen Stammzellen	7
1.4	Die Interaktion von Leukämie-Zellen und mesenchymalen Zellen im KM.....	8
1.5	Knochenstoffwechsel & Genexpression in der osteogenen Differenzierung.....	9
1.6	Growth Factor Independence 1 (Gfi1).	10
1.7	Zielsetzung	11
2	Material und Methoden	12
2.1	Materialien	12
2.1.1	Medien, Reagenzien und Lösungen	12
2.1.2	Selbst angesetzte Lösungen und Medien.....	14
2.1.3	Fluoreszenzantikörper	15
2.1.4	Kits	16
2.1.5	Gebrauchs- und Verbrauchsmaterial	16
2.1.6	Maschinen und Geräte.....	18
2.1.7	Software	20
2.2	Mauslinien und Haltung der Mäuse	20
2.2.1	C57BL/6-Mäuse = wildtyp (wt)-Mäuse	21
2.2.2	<i>Gfi1</i> -KO-Mäuse.....	21
2.2.3	<i>GFII</i> -KI-Mäuse.....	21
2.2.4	<i>GFII</i> -KD-Mäuse	21
2.2.5	<i>NUP98/HOXD13</i> -Mäuse.....	22
2.3	Patientenproben.....	22
2.4	<i>In-vivo</i> Experimente	22
2.4.1	Induktion der Leukämie	22
2.4.2	Euthanasie und Gewebeaufbereitung	23
2.4.3	Lebendzellzählung mit Trypanblau und Hämozytometer	24
2.4.4	Hämogramm, Blutausstrich & Knochenmarkszytologie.....	24
2.5	Durchflusszytometrie und Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung (FACS).....	24
2.6	Zellkultur.....	25
2.6.1	Kultivierung primärer muriner mesenchymaler Zellen	26
2.6.2	Osteogener Differenzierungs-Assay.....	26
2.6.3	Adipogener Differenzierungsassay	27
2.6.4	Isolation von Lineage-negativen KM-Zellen (Lin ⁻ KM).....	27
2.6.5	Kultivierung leukämischer und gesunder muriner Knochenmarkszellen.....	28
2.6.6	Kokultur von MSPC und leukämischen KM-Zellen bzw. Lin ⁻ KM-Zellen.....	28
2.6.7	Kryokonservierung primärer und kultivierter Zellen	29

2.7	Molekularbiologische Methoden.....	29
2.7.1	RNA-Extraktion	29
2.7.2	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren	30
2.7.3	RT-PCR (Real time Polymerasekettenreaktion)	30
2.8	Analyse des Mitochondrialen Stoffwechsels	32
2.9	Immunfluoreszenz zum Nachweis von γ H2AX	33
2.10	Knochen-Histomorphometrie.....	33
2.10.1	Knochenhistologie – Paraffin-Einbettung	33
2.10.2	Knochenhistologie – Calcein-Färbung und MMA-Einbettung	34
2.11	Micro-Computertomographie (μ CT) muriner Femora.....	35
2.12	Auswertung: Statistik und Darstellung.....	35
3	Ergebnisse.....	36
3.1	In Vitro-Experimente	36
3.1.1	Vorausgehende Daten	36
3.1.2	Charakterisierung der MSPC.....	37
3.1.3	Genexpression der MSPC vor und nach Osteodifferenzierungsassay.....	39
3.1.4	Mitochondriale Funktion der MSPC in vitro	41
3.1.5	γ H2AX - DNA-Schäden und DNA-Reparatur	44
3.2	<i>In vivo</i> Experimente	46
3.2.1	Durchflusszytometrie des Gewebes langer Röhrenknochen - Methodvalidierung.....	46
3.2.2	Reduktion und Ausschalten von <i>Gfi1</i> erhöhen OBC-Zahl in murinen Knochen	48
3.2.3	Induktion von AML in wt und <i>Gfi1</i> -KO Mäusen.....	50
3.2.4	Nachweis der Leukämie im Mausmodell - Durchflusszytometrie	51
3.2.5	Durchflusszytometrischer Ausschluss einer lymphatischen Leukämie.....	54
3.2.6	Knochenmark, Blutbild und krankheitsfreies Überleben	54
3.2.7	Körper-, Milz- und Leber-Gewicht	56
3.2.8	Geringere Milz-Infiltration mit myeloischen Blasten in <i>Gfi1</i> -KO Mäusen	57
3.2.9	Leukämische <i>Gfi1</i> -KO Mäuse haben mehr OBC im Knochengewebe als wt Mäuse	58
3.2.10	μ CT – Porosität des kortikalen Knochens bei <i>Gfi1</i> -KO Mäusen	59
3.2.11	Knochenhistologie – In <i>Gfi1</i> -KO Mäusen steigert die Leukämie Porosität und Fläche des kortikalen Knochens	63
3.2.12	Calcein-Färbung – Erhöhte Knochenbildungsrate <i>Gfi1</i> -KO Mäusen mit Leukämie	66
3.2.13	Erhöhte Osteoklastenzahl und -Aktivität in <i>Gfi1</i> -KO Mäusen.....	67
4	Diskussion	70
4.1	<i>In vitro</i> Daten	70
4.1.1	Die <i>Gfi1</i> -Expression in MSPC scheint vorteilhaft für AML-Blasten zu sein	70
4.1.2	Eigenschaften der untersuchten stromalen Zellpopulation - MSPC.....	70
4.1.3	Osteogene Differenzierung in <i>Gfi1</i> -KO MSPC und <i>NUP98-HOXD13</i> AMSPC.....	71
4.1.4	Mitochondriale Funktion unter dem Einfluss von AML und <i>Gfi1</i> -Defizienz.....	71

4.1.5	DNA-Reparatur unter dem Einfluss von AML und Gfi1-Defizienz	72
4.2	<i>In vivo</i> Daten	73
4.2.1	Aussagekraft der Knochenzell-Durchflusszytometrie.....	73
4.2.2	Repression osteogener Faktoren durch Gfi1	73
4.2.3	<i>MLL-AF9</i> -transplantierte Mäuse entwickelten eine AML, Blutbildinterpretation... 74	
4.2.4	Das symptomfreie Überleben nach Transplantation	75
4.2.5	Geringere Infiltration extramedullärer Organe durch AML bei Gfi1-KO Mäusen.. 75	
4.2.6	<i>Gfi1</i> -KO Mäuse wiesen mehr OBC auf – mit und ohne AML.....	75
4.2.7	Dicker und poröser kortikaler Knochen in leukämischen <i>Gfi1</i> -KO Mäusen	76
4.2.8	Steigerung des Knochenmetabolismus in <i>Gfi1</i> -KO Mäusen mit AML.....	76
4.2.9	Knochenmetabolismus in wt Mäusen mit AML	77
4.3	Bedeutung der Arbeit und Ausblick.....	78
4.3.1	Möglicher Nutzen eines KO von <i>Gfi1</i> in der KM-Nische bei AML.....	78
4.3.2	Gfi1 beeinflusst die Regulation des Knochenstoffwechsels	79
5	Zusammenfassung	80
6	Literatur	81
7	Anhang	91
7.1	Zuordnung der Mäuse zu Experimenten, für die sie verwendet wurden.....	91
7.2	Zuordnung der durchgeführten statistischen Tests zu den Abbildungen	92
7.3	Signifikanzniveaus zum Vergleich der medianen γ H2AX-Foci-Zahl.....	93
7.4	Getrennte Darstellung von bestrahlten und unbestrahlten Kontrollen	94
7.5	Abkürzungsverzeichnis	95
7.6	Tabellenverzeichnis.....	97
7.7	Abbildungsverzeichnis	97
8	Danksagung	99
9	Curriculum vitae.....	100
	Ausbildung.....	100
	Dissertation	100
	Berufliche Tätigkeit	100
	Stipendien	100

1.1 HÄMATOPOESE

Die Hämatopoese bezeichnet den Vorgang der Blutzellbildung und findet im Knochenmark (KM) statt. Am Anfang des hierarchisch organisierten Prozesses stehen die multipotenten hämatopoetischen Stammzellen (HSC, hematopoietic stem cells), die aus dem ventralen Mesoderm entstammen. Die HSC haben die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und können zu multipotenten Progenitorzellen (MPP) ausdifferenzieren. Zu den MPP zählen die gemeinsam myeloiden Progenitoren (CMP, common myeloid progenitors) und die gemeinsam lymphoiden Progenitoren (CLP, common lymphoid progenitors). Mit diesem Differenzierungsschritt geht der Verlust der Selbsterneuerungsfähigkeit einher. Die weitere Differenzierung der CMP erfolgt über das Stadium der Megakaryozyten-Erythrozyten-Progenitoren zu Megakaryozyten-Progenitoren und Erythrozytenprogenitoren und über die Granulozyten-Monozyten-Progenitoren zu Granulozytenprogenitoren und Monozytenprogenitoren. Diese Progenitorzellen proliferieren stark und differenzieren dann über die im konventionellen KM-Ausstrich erkennbaren Vorstufen zu reifen Blutzellen wie Erythrozyten, Makrophagen, Granulozyten und Monozyten aus. Es gibt auch die Hypothese, dass die Progenitoren bereits direkt nach dem HSC-Stadium den Differenzierungsweg zu einer bestimmten Zellreihe einschlagen und sich die Blutzellen parallel statt in einer hierarchischen Verzweigung entwickeln (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019b). Die zentralen Mechanismen der Hämatopoese sind also die Selbsterneuerung der HSC, die starke Proliferation der Progenitorzellen, die Weichenstellung für die Linien-spezifische Differenzierung und die Ausreifung in die Zellreihen. Die Regulation dieses Zusammenspiels wird durch Zytokine und Transkriptionsfaktoren gesteuert (Aiuti et al., 1997; Scott et al., 1994). Die Zellen der Knochenmarknische wie Adipozyten, Osteoblasten und deren Progenitoren üben nicht nur ein Stütz- und Adhäsionsfunktion aus, sondern spielen auch eine große Rolle bei der Regulation der hämatopoetischen Zellen (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019b).

1.2 AKUTE MYELOISCHE LEUKÄMIE (AML)

Akute Leukämien sind durch starke Proliferation maligner Klone unreifer hämatopoetischer Zellen charakterisiert. Diese Zellklone breiten sich zunächst im blutbildenden KM aus, schwimmen dann ins Blut aus und infiltrieren lymphatische Organe, oft auch nicht-lymphatische Organe.

Bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) entwickelt sich die Neoplasie aus Vorläuferzellen der myeloischen Reihe. Die Leukämiezellen sind unreife Blasten, die Mutationen zweier Arten aufweisen: Erstens eine konstitutive Aktivierung von Proliferations- und Überlebenssignalwegen durch Mutationen in Zelloberflächenrezeptoren oder Tyrosinkinasen wie FLT-3 oder c-Kit, zweitens eine Blockade der Differenzierung zum Beispiel durch Überexpression von HOX-Genen oder Bildung von Fusionsgenen. Zudem spielt die Hypermethylierung von Promotern verschiedener

Tumorsuppressoren eine Rolle (Toyota et al., 2001). Akute Leukämien werden meist durch die Folgen einer gestörten Hämatopoese symptomatisch, denn leukämische Blasten schwimmen als funktionslose Zellen ins Blut aus und hemmen über verschiedene Wege die Ausdifferenzierung der gesunden Vorläuferzellen. Die Folgen davon sind Infektionen durch die Neutropenie, ein erhöhtes Blutungsrisiko durch die Thrombozytopenie sowie die Anämie.

Die AML ist mit einer Prävalenz von 3,7 / 100 000 Einwohnern in Deutschland die häufigste akute Leukämie im Erwachsenenalter (Juliussen et al., 2012). Sie kann sich aus einer anderen Erkrankung der Hämatopoese, wie z.B. einem Myelodysplastischen Syndrom (MDS) oder einer Myeloproliferativen Neoplasie (MPN) entwickeln, kann durch vorausgegangene Chemotherapie ausgelöst werden oder kann primär entstehen. Die Standardtherapie der AML erfolgt klassischerweise mit einer Induktionstherapie aus Cytarabin und einem Anthrazyklin, mit einer anschließenden Konsolidierungstherapie. Diese besteht je nach Risikokonstellation der AML und dem Gesundheitszustand des Patienten aus Chemotherapie, Stammzelltransplantation und / oder zielgerichtete Therapie. Mit diesen Therapiekonzepten ist jedoch nur eine Heilungsrate von etwa 40% bei Patienten unter 60 Jahren zu verzeichnen, und bei Patienten über 60 Jahren, die die Mehrheit der AML-Patienten abbilden, liegt die Heilungschance nur bei etwa 10% (Döhner et al., 2015). Daher sind Innovationen in der Therapie der AML notwendig.

1.3 DIE NICHE DER HÄMATOPOETISCHEN STAMMZELLEN

Als hämatopoetische Nische wird die direkte Umwelt der hämatopoetischen Zellen im Knochenmark bezeichnet, die auch den Namen „Bone Marrow Microenvironment“ trägt. Sie besteht unter anderem aus Leptin-Rezeptor-positiven (LEPR⁺) mesenchymalen Stammzellen (MSC), Osteoblasten und Adipozyten sowie deren Progenitoren, aber auch aus Endothelzellen (Calvi et al., 2003; Tikhonova et al., 2019). Weiter gefasst gehören auch Chondrozyten, Fibroblasten wie die MSC-ähnlichen Nestin-positiven Zellen und sympathischen Nervenfasern dazu (Baryawno et al., 2019; Hanoun et al., 2014; Méndez-Ferrer et al., 2008). All diese Zelltypen lassen sich in weitere Subpopulationen unterteilen, die über Sekretionsfaktoren aber auch durch direkte Zell-Zell-Kontakte die Hämatopoese regulieren. So exprimieren LEPR⁺ MSC den Stammzellfaktor (SCF) und das Chemokin Stromal Cell Derived Factor 1 (SDF-1; auch CXCL-12), die für die Rekrutierung und Verankerung von HSC zuständig sind, aber auch Regulatoren der myeloiden und lymphoiden Differenzierung wie Interleukin (IL) -7 und Macrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF; (Baryawno et al., 2019; Sugiyama et al., 2006)). Bestimmte Osteoprogenitoren hingegen unterstützen beispielsweise die Ruhephase von HSC (Tikhonova et al., 2019). Andere Osteoprogenitoren produzieren, wie auch Nestin⁺-MSC-ähnliche Fibroblasten, den Liganden Jagged-1, der über den Notch-Signalweg die Proliferation von HSC fördert (Calvi et al., 2003). Die Rezeptoren Notch1 und Notch2 aktivieren nach Bindung von Liganden wie Jagged-1 einen intrazellulären Signalweg, der mit einer Transkriptionsregulation endet. Der Notch-Signalweg beeinflusst so die Zellproliferation, das

Zellüberleben, die Differenzierung und die Selbsterneuerung der Zellen (Ferrando, 2010; Takam Kamga et al., 2016). Diese Funktion der Jagged-1-Bildung wird vor allem Zellen der osteoblastischen Linie (OBC, osteoblastic lineage cells) mit hoher Expression des Runt-verwandten Transkriptionsfaktors 2 (Runx2) zugesprochen (Chitteti et al., 2010). Reife Osteoblasten scheinen eine Favorisierung der Lymphopoese und Erythropoese gegenüber der Myelopoese zu bewirken (Krevvata et al., 2014).

Endotheliale Zellen (EC), insbesondere die arteriolären, wirken ebenfalls über Notch-Liganden, SDF-1, SCF, verschiedene Interleukine und weitere Faktoren auf die Hämatopoese ein (Baryawno et al., 2019; Tikhonova et al., 2019). Für viele dieser Signalwege, insbesondere für SCF, bildet der Janus kinase/signal transducer and activator of transcription (JAK-STAT) -Signalweg die intrazelluläre Endstrecke der Informationsübertragung bis zur Transkriptionsregulation für Zellproliferation und Zellüberleben, wobei in Hämatopoese und Leukämogenese vor allem Stat3, Stat5a und Stat5b eine Rolle spielen (Maurer et al., 2019; Wang et al., 2009). Teil dieses Regulationsmechanismus sind auch Transkriptionsfaktoren wie das Proto-Onkogen *myc*, dessen Amplifikation eine unkontrollierte Zellproliferation zur Folge hat (Satoh et al., 2004). Es wird deutlich, dass in der hämatopoetischen Nische ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Zellpopulationen stattfindet.

1.4 DIE INTERAKTION VON LEUKÄMIE-ZELLEN UND MESENCHYMALEN ZELLEN IM KM

Bei AML kommt es zu Veränderungen in der KM-Nische. Aus dem KM von Patienten isolierte AML-assoziierte MSC (AMSC) weisen Mutationen auf, die sich von denen in AML-Blasten unterscheiden und Genexpressionsprofile der AMSC sind gegenüber normalen MSC verändert (Blau et al., 2011). Vorwiegend sind mit Zellüberleben, Angiogenese und osteogener Differenzierung assoziierte Genexpressionsprogramme in AMSC erhöht (Chen et al., 2020).

Auch im Mausmodell verstärkt AML in mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen (MSPC) die osteogene Differenzierung. Es kommt allerdings zusätzlich zu einem Differenzierungsblock, sodass es in der leukämischen Nische einen Mangel an reifen Osteoblasten gibt: Durch die vermehrte Induktion der Differenzierung schrumpft die Population der MSC zugunsten der mesenchymalen Progenitoren (Battula et al., 2017). Insbesondere ein Verlust der SDF-1-exprimierenden MSC ist zu beobachten und IL-7 wird in der leukämischen Nische vermindert exprimiert, stärker als in der hämatopoetischen Nische hingegen ist beispielsweise Jag1 vertreten (Xiao et al., 2018). Durch diese Veränderungen kommt es zu Funktionseinbußen bezüglich der Regulation der Hämatopoese, die bei Restitution von Bestandteilen der Nische reversibel sind (Battula et al., 2017; Krevvata et al., 2014). Stattdessen formen sich die Leukämiezellen eine Nische, die ihre eigene Proliferation fördert und sie vor Apoptose schützt (Konopleva et al., 2002). Denn die AML-bedingten Modulationen an mesenchymalen Zellen der KM-Nische sind nur eine Seite einer bidirektionalen Interaktion. Ebenso können Veränderungen in mesenchymalen Zellen, insbesondere in Osteoprogenitoren, eine maligne

Transformation in den hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen (HSPC) bis hin zur Entwicklung einer AML auslösen. So konnte im Mausmodell eine einzige aktivierende β -Catenin-Mutation in Osteoblasten über eine Überexpression von Jag-1 und das dadurch erhöhte Notch-Signaling in HSPC ein MDS und in einigen Fällen eine AML induzieren (Kode et al., 2014). Ein weiteres Beispiel ist das Schwachmann-Bodian-Diamond-Syndrom (SBDS). Diese Erkrankung wird durch eine heterozygote Mutation im *SBDS*-Gen ausgelöst und führt neben einer Osteoporose bei reduziertem Knochenstoffwechsel zu einer Prädisposition, bereits im jungen Erwachsenenalter an einem MDS oder einer AML zu erkranken. Mit selektiver Deletion des *SBDS*-Gens in Mäusen konnte gezeigt werden, dass diese Mutation in HSPC lediglich eine Neutropenie auslöst (Zambetti et al., 2015). Das Fehlen des *SBDS*-Gens in Osterix-positiven mesenchymalen Zellen löste genotoxischen Stress und Veränderungen der Genexpression in den HSPC aus, wie sie auch in humanen präleukämischen KM-Zellen beobachtet wurden (Zambetti et al., 2016). Die Komplexität der hämatopoetischen Nische steigert sich noch, wenn sie zur leukämischen Nische wird.

1.5 KNOCHENSTOFFWECHSEL & GENEXPRESSION IN DER OSTEOGENEN DIFFERENZIERUNG

Die Osteoblasten und Osteoprogenitoren spielen eine zentrale Rolle in der hämatopoetischen aber auch in der leukämischen Nische. Zum besseren Verständnis soll hier kurz auf wichtige Punkte der Osteogenese und der Genexpression in Osteoprogenitoren und Osteoblasten eingegangen werden.

Osteoblasten differenzieren über einige Vorstufen, Osteoprogenitoren, aus MSC. Sie sind für die Produktion von Kollagen und Osteoid zuständig und werden von der eigens produzierten Knochenmatrix umgeben, die anschließend ausmineralisiert, woraufhin ein Großteil der Osteoblasten in die Apoptose geht und ein kleiner Anteil zu Osteozyten ausdifferenziert. Die Osteozyten regulieren den Knochenabbau durch Osteoklasten, indem sie deren hämatopoetische Vorläufer Granulozyten-Monozyten-Progenitoren mit dem M-CSF zu Osteoklasten-Vorläufern differenzieren lassen (Menaar et al., 2000). Osteozyten oder Osteoblasten binden mit dem Liganden RANKL an RANK (receptor activator of NF- κ B), einen Rezeptor auf den einkernigen Osteoklasten-Vorläufern, woraufhin sie zu mehrkernigen funktionsfähigen Osteoklasten verschmelzen (Hsu et al., 1999; Kong et al., 1999). Osteozyten können mit Osteoprotegerin, einem löslichen Rezeptor für RANKL, den Knochenabbau hemmen (Yasuda et al., 1998; Yavropoulou & Yovos, 2008).

Runx2 induziert in Osteoprogenitoren die Expression osteogener Proteine. Runx2 leitet bereits die osteogene Differenzierung in MSC ein und seine Expression steigt mit zunehmender Reife der Osteoprogenitoren (Lian et al., 2004). Das Osteoblasten-Protein Osteopontin (codiert durch *secreted phosphoprotein 1 = Spp1*) wird vor allem in der Proliferationsphase der Osteoprogenitoren und erneut während der Mineralisierungsphase in Osteoblasten produziert, sinkt aber in der postproliferativen Phase ab. Osteocalcin (codiert durch bone γ -carboxylglutamic acid-containing protein – *Bglap*) kommt vor allem in reifen Osteoblasten in der Mineralisierungsphase vor (Owen et al., 1990).

1.6 GROWTH FACTOR INDEPENDENCE 1 (GFI1).

Das nukleäre Protein Growth factor independence 1 (Gfi1) ist ein transkriptionaler Repressor, der aus sechs C-terminalen Zinkfingern, von denen drei für die spezifische Desoxyribonukleinsäure (DNA deoxyribonucleic acid) -Bindung notwendig sind, und einer N-terminalen SNAG-Domäne besteht (Grimes et al., 1996; Zweidler-Mckay et al., 1996). Diese SNAG-Domäne übt die repressive Funktion über Rekrutierung von Histon-modifizierenden Enzymen wie der Lysin-spezifischen Histondemethylase 1 aus (Saleque et al., 2007). Zunächst wurde die Rolle von Gfi1 in der frühen lymphozytären Differenzierung untersucht. Doch Gfi1 ist ebenfalls entscheidend für die myeloische Differenzierung wegen seiner Notwendigkeit für die Differenzierung neutrophiler Granulozyten aus myeloischen Vorläufern und Hemmung der Differenzierung in Monozyten (Hock et al., 2003). Vassen et. al. unterschieden die Population der granulozytär-monozytären Progenitoren mit den Oberflächenmarkern Gr1^{low} Mac1⁺ in eine Population mit hoher *Gfi1*-Expression, die sich unter Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) zu Granulozyten entwickelt, und eine Population mit geringer *Gfi1*-Expression, die unter GM-CSF zu Makrophagen ausdifferenzieren (Vassen et al., 2012). Es konnte ferner gezeigt werden, dass Mäuse mit einer *Gfi1*-Defizienz (*Gfi1*-KO, *Gfi1*-knockout) wenig bis keine neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut oder im Knochenmark aufweisen, dafür aber vermehrt atypische oder „blastoide“ monozytäre Zellen im KM akkumulieren (Karsunky et al., 2002). Weitere phänotypische Besonderheiten von *Gfi1*-KO Mäusen sind eine Neigung zu Infektionen, die sich als logische Konsequenz aus einer gestörten Immunabwehr bei Neutropenie ergibt, sowie ein deutlich vermindertes Körpergewicht gegenüber dem Wildtyp (wt); wohingegen die Erythrozytenzahl, der Hämoglobingehalt und die Thrombozyten bei *Gfi1*-KO Mäusen normal sind (Hock et al., 2003; Karsunky et al., 2002). Ein weiterer Prozess der Hämatopoese, auf den Gfi1 einen Einfluss hat, ist die Selbsterneuerung von HSC. Gfi1 limitiert die Proliferation von HSC, um deren Selbsterneuerungskapazität zu schonen (Zeng et al., 2004). Zugleich ist Gfi1 daran beteiligt, die HSC vor Apoptose zu schützen (Khandanpour et al., 2011). Mutationen im *Gfi1*-Gen oder quantitative Veränderungen der *Gfi1*-Expression sind an der Entstehung verschiedener hämatologischer Krankheiten wie T-Zell- akuter lymphatischer Leukämie, AML, hereditärer Neutropenie und MPN beteiligt (Khandanpour et al., 2011; Khandanpour et al., 2012; Person et al., 2003). Der Single Nucleotid Polymorphismus *GFII* 36N, bei dem das Serin an Position 36 des Proteins durch Asparagin ersetzt ist, kommt bei 3-7 % der Kaukasier vor, aber in 11% der AML-Patienten. Außerdem beschleunigt die *GFII*-36N-Variante im Vergleich zum humanen wt *GFII*-36S den Verlauf einer MPN im Mausmodell mit *kras*-Mutation (Khandanpour et al., 2011; Khandanpour et al., 2012; Person et al., 2003).

Eine reduzierte Expression von *Gfi1* kann im Mausmodell eine MPN auslösen und ist mit einer schlechteren Prognose in AML-Mausmodellen und AML-Patienten assoziiert. Ein kompletter Verlust von *GFII* in AML-Patientenproben wurde hingegen noch nicht beschrieben. Vermutlich

muss für die vermehrte Proliferation von Blasten eine Restfunktion von Gfi1 vorhanden sein, die einer Apoptose entgegenwirkt (Fraszczak et al., 2018; Hones et al., 2016).

Gfi1 ist aber nicht nur an der Regulation der Hämatopoese beteiligt, sondern spielt auch eine Rolle in der Differenzierung von MSPC zu Osteoblasten. Der Transkriptionsfaktor reprimiert *Spp1* und *Runx2*, die beide wiederum wichtige Faktoren in der Knochendifferenzierung sind (D'Souza et al., 2011; Y. G. Wang et al., 2016).

1.7 ZIELSETZUNG

Die komplexen Abläufe der Leukämogenese sind seit Jahrzehnten Gegenstand der Grundlagenforschung und translationalen Forschung, doch bisher nur in Teilen verstanden. In den letzten Jahren wurde zunehmend die Interaktion von AML-Blasten mit mesenchymalen Zellen der KM-Nische untersucht. So ist bekannt, dass AML-Blasten genetische Veränderungen in MSC herbeiführen (Blau et al., 2011) und dass *in vitro* die Kokultur mit MSC AML-Zellen vor spontaner und Chemotherapie-assoziiierter Apoptose schützt (Garrido et al., 2001; Konopleva et al., 2002; Moschoi et al., 2016). Neben MSC beeinflussen unter anderem auch Osteoprogenitoren die Leukämogenese (Chen et al., 2020; Krevvata et al., 2014).

Gfi1 ist ein wichtiger hämatopoetischer Transkriptionsfaktor, der in myeloischen Blasten eine bedeutende Rolle spielt. Eine verminderte Expression oder die Variante *GFII* 36N sind prognostisch ungünstig (Khandanpour et al., 2010). Hingegen ist bei einigen Mutationen und Fusionsgenen wie *NUP98-HOXD13* und *AML-Eto9* die Gfi1-Expression für die Progression der Leukämie notwendig (Hones et al., 2016). Da Gfi1 auch die Osteogenese beeinflusst (D'Souza et al., 2011; Y. G. Wang et al., 2016), ergab sich die Frage, in welcher Form Gfi1 sich auf die Stroma-Leukämie-Interaktion auswirkt. Ein Einfluss auf die Interaktion zwischen Stroma- und Myelomzellen ist bereits beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass ein KO von *Gfi1* in MSCP die Suppression von Multiplen Myelomzellen auf deren osteogene Differenzierung inhibiert (D'Souza et al., 2011). Es ist ferner bekannt, dass mesenchymale Zellen die mitochondriale Funktion und Veränderungen in den DNA-Reparaturgenen von HSPC und AML-Blasten beeinflussen (Marlein et al., 2017; Moschoi et al., 2016; Zambetti et al., 2016). Ob solche Veränderungen auch umgekehrt von dysfunktionalen HSPC und AML-Blasten in MSCP ausgelöst werden, ist bisher wenig untersucht. Auch Gfi1 spielt in hämatopoetischen Zellen eine Rolle bei der DNA-Reparatur (Khandanpour, 2013; Vadnais 2018). Zudem interessierte uns die mitochondriale Funktion, die eine Grundvoraussetzung für Proliferation ist.

Ziel dieser Arbeit war es daher, den Einfluss von AML-Blasten und gesunden hämatopoetischen Zellen auf verschiedene Funktionen in MSPC zu untersuchen und dabei wt MSPC und *Gfi1*-KO MSPC zu vergleichen, um den vermuteten Einfluss des Transkriptionsfaktors Gfi1 auf die Stroma-Leukämie-Interaktion herauszuarbeiten.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIALIEN

2.1.1 Medien, Reagenzien und Lösungen

Table 1 Liste der verwendeten Medien, Reagenzien und Lösungen

Reagenz	Firma
2-Mercaptoethanol 99%	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Adipogenic supplement (aus R&D systems MSC identification kit)	Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA
AF488 anti- γ -H2AX	BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA
Alizarin-Rot	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Aqua, steriles Wasser	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Ascorbinsäure	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Beads for FACS, invitrogen	Thermo Fischer Sc., Waltham, MA, USA
Benzylperoxid (BPO) anhydrisch	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Cell Counter Solution	Beckmann Coulter, Brea, CA, USA
DEPC-treated water	Thermo Fischer Sc., Waltham, MA, USA
Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP)	Thermo Fischer Sc., Waltham, MA, USA
Dexamethason 4 milligramm (mg) inject Jenapharm	mibe GmbH, Sandersdorf-Brehna, DE
D-Glukose	BioShop Canada, Burlington, ON, CA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	PAN Biotech, Aidenbach, DE BioShop Canada, St Laurent, QC, Ca
Dithiothreitol (DTT)	Thermo Fischer Sc., Waltham, MA, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS), Multicell or Gibco	Thermo Fischer Sc., Waltham, MA, USA WISENT Inc., Montreal, Ca
EDTA (Ethylindiamintetraacetat)	Thermo Fischer Sc., Waltham, MA, USA
EDTA	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ammonium Chloride Lysing Agent	BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA
Ethanol 99 %	Honeywell Speciality Chemicals, Seelze, DE
FACS Flow / Clean / Rinse	BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA
Fetal Bovine Serum (FCS) South American origin, 0,2 Micrometer (μ m) sterile filtered	Pan-Biotech, Aidenbach, Deutschland
Fetalgro	RMBIO, Missoula, MT, USA
Formaldehyd 4% Methanol-haltig	R. Langenbrinck, Emmendingen, DE

Giemsa StainRITE	PolyScience Inc., Warrington, PA, USA
Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Hank Balanced Salt Solution (HBSS) Gibco	Thermo Fischer Sc., Waltham, MA, USA
Horse Serum, US origin, Corning	Thermo Fischer Sc., Waltham, MA, USA
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Thermo Fischer Sc., Waltham, MA, USA
Isofluran, FORENE	AbbVie Deutschland, Wiesbaden, DE
Isopropanol / 2-Propanol	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
Kollagenase 1 (>125 U/ mg)	Worthington, Lakewood, NJ, USA
L-Glutamine 200 millimolar (mM), Multicell	WISSENT Inc., Montreal, QC, CA
Masson-Goldner-Trichromfärbung (MG)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
May Grünwald Färbung	PolyScience Inc., Warrington, PA, USA
Minimal-Essential Medium alpha (MEM- α)	Thermo Fischer Sc., Waltham, MA, USA
MesenCult Expansion Kit Mouse	StemCell Technologies, Vancouver, Ca
Methanol	Thermo Fischer Sc., Waltham, MA, USA
Methylmethacrylat (MMA)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Mounting Medium mit DAPI	Vector, Burlingame, CA, USA
muriner Stem Cell Factor (SCF)	Miltenyi, Bergisch Gladbach, DE
murines IL-3, murine IL-6	Miltenyi, Bergisch Gladbach, DE
N, N Dimethyl-p-Toluidin 99%	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Nagellack klar	Essie, Las Vegas, NV, USA
Natriumpyruvat 100 mM, Multicell	WISSENT Inc., Montreal, QC, CA
NH ₄ Cl	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Nonylphenyl-Polyethyleneglycol (NPG)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Oil Red O solution 0,5% in isopropanol	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Oligo-dT	Thermo Fischer Sc., Waltham, MA, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Thermo Fischer Sc., Waltham, MA, USA
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA WISSENT Inc., Montreal, Ca
Permout Mounting Medium	Thermo Fischer Sc., Waltham, MA, USA
pH Kalibrierlösungen IUPAC pH-Standard	Hach Lange GmbH, Düsseldorf, DE
RNase Out	Thermo Fischer Sc., Waltham, MA, USA
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium Gibco / Multicell	Thermo Fischer Sc., Waltham, MA, USA WISSENT Inc., Montreal, Ca
β -Glycerophosphat disodium salt	MerckMilipore, Burlington, MA, USA
StemXVivo Osteogenic Base Medium	Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA

Super Script Reverse Transkriptase II	Thermo Fischer Sc., Waltham, MA, USA
Triton X	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypan blue Solution	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA MerckMilipore, Burlington, MA, USA
TrypLE Express, Gibco	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
Trypsin EDTA, Multicell	WISENT Inc., Montreal, Ca
XF calibrant pH 7,4	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
XF-Base Medium	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA

2.1.2 Selbst angesetzte Lösungen und Medien

Tabelle 2 Liste der selbst angesetzten Lösungen und Medien

Adipogenes Differenzierungsmedium	StemXVivo Osteogenic/Adipogenic Base Medium 1% P/S 1% Adipogenic Supplement
Alizarin-Rot Färbelösung	1 % Alizarin-Rot in destilliertem Wasser HCl zur pH Adjustierung
Einfriermedium	40 % Medium (je nach Zelllinie, s.u.) 10 % DMSO 50 % hitzeinaktiviertes (hi) Fetalgro / FCS
FACS-Puffer	PBS 2,5% Hitze-inaktiviertes (hi) Fetalgro / FCS 1 % ml P/S
Fc-Block Maus	Ratte Anti-Maus CD16/CD32 1:400 in PBS
HBSS-Puffer	HBSS 2,5 % hiFCS / Fetalgro 1 % P/S
Immun-Fluoreszenz-Puffer (IF-Puffer)	PBS 0,5 % Triton X 5 % Fetalgro
MACS-Puffer	PBS 2 % BSA 1 mM EDTA
Medium für C1498-Zellen	IMDM 20 % hi Fetalgro (Montreal) / FCS (Essen) 1 % P/S

Medium für murine MSC	IMDM 5 % Horse Serum 10 % hi Fetalgro (Montreal) / FCS (Essen) 1 % P/S
Medium für primäre murine/ humane Knochenmarkzellen	IMDM 10 % hi FCS / Fetalgro 1 % P/S 10 ng/ml Interleukin (IL)-6 10 ng/ml IL-3 20 ng/ml SCF
Methylmethacrylat-Einbettungslösung	100 ml Methylmethacrylat (MMA) 14 ml Nonylphenyl-Polyethyleneglycol Azetat (NPG) 0.55 g BPO (Benzylperoxid) 500 Microliter (µl) N,N Dimethyl-p-Toluidin 99%
Methylmethacrylat-Infiltrationslösung	100 ml MMA 14ml NPG 0.33g BPO
Osteo-Differenzierungsmedium	MEM-alpha Medium 20 % hi FCS 1 % P/S 10 mM β-Glycerophosphat 0,2 mM Ascorbinsäure 5*10 ⁻⁸ M Dexamethason
Seahorse Medium	XF-Base Medium 0,2 % mg D-Glukose 0,5 mM Natriumpyruvat 0,2 mM L-Glutamine

2.1.3 Fluoreszenzantikörper

Tabelle 3 Liste der Fluoreszenzantikörper für Durchflusszytometrie

Antigen (Antikörper gegen)	Fluoreszenzmarker	Hersteller
B220 anti mouse	PerCP/Cy5.5	Biolegend (San Diego, CA, USA)
CD11b anti mouse	PerCP/Cy5.5	Biolegend (San Diego, CA, USA)
CD31 anti mouse	APC (Allophycocyanin)	Biolegend (San Diego, CA, USA)
CD4 anti mouse	PerCP/Cy5.5	Biolegend (San Diego, CA, USA)
CD51 anti mouse	PE (Phycoerythrin)	Biolegend (San Diego, CA, USA)
CD8a anti mouse	PE	Biolegend (San Diego, CA, USA)

c-Kit anti mouse	PE	Biolegend (San Diego, CA, USA)
Gr1 anti mouse	PE	Biolegend (San Diego, CA, USA)
Lineage cell detection cocktail - Biotin (mouse)		Miltenyi (Bergisch Gladbach, DE)
Nukleinsäure	Propidium Iodid	Biolegend (San Diego, CA, USA)
Nukleinsäure	DAPI	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Nukleinsäure	Helix-NP blue	Biolegend (San Diego, CA, USA)
Sca-1 anti mouse	APC/Cy7	Biolegend (San Diego, CA, USA)
Streptavidin	PerCP/Cy5.5 & BV711	Biolegend (San Diego, CA, USA)
Ter119 anti mouse	PE	Biolegend (San Diego, CA, USA)

2.1.4 Kits

Tabelle 4 Liste der verwendeten Kits

MACS Lineage Cell depletion Kit	Miltenyi, Bergisch Gladbach, DE
Power SYBR Green PCR Master Mix	Thermo Fisher Sc. Waltham, MA, USA
RNase-free DNase Set	Qiagen, Hilden, DE
RNeasy mini Kit	Qiagen, Hilden, DE
Seahorse XF Cell Mitostress Test Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
TaqMan Gene Expression Master Mix	Thermo Fisher Sc., Waltham, MA, USA
TRAP Kit	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

2.1.5 Gebrauchs- und Verbrauchsmaterial

Tabelle 5 Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Produkt	Firma
Adhesive Covers, PCR compatible	Thermo Fisher Sc., Waltham, MA, USA
Deckgläser, quadratisch 18 millimeter (mm)	Thermo Fisher Sc., Waltham, MA, USA
Deckgläser, quadratisch 18 mm	Thermo Fisher Sc., Waltham, MA, USA
Deckgläser, plan geschliffen 24x24 mm	Thermo Fisher Sc., Waltham, MA, USA
Deckgläser, rund 10 mm Durchmesser	NeoLab, Heidelberg, DE
Deckgläser, rund 18 mm Durchmesser	Thermo Fisher Sc., Waltham, MA, USA
EDTA tubes "MiniCollect"	GreinerBio One, Kremsmünster, AUT
Einfriergefäße CryoVials 1ml	GreinerBio One, Kremsmünster, AUT
Einfrier-Container Nalgene Mr. Frosty	Sigma Aldrich, St. Louis, MA, USA
Glasflaschen 250 ml / 100 ml	Schott Duran, Wertheim, DE
Glas-Röhrchen mit rundem Boden 5 ml	Thermo Fisher Sc., Waltham, MA, USA
Hämozytometer, Neubauerkammer 0,1mm	Assistant, Sondheim, DE

Haemocytometer bright line Reichert	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Histo-Einbettungs-Kassetten	Thermo Fisher Sc., Waltham, MA, USA
Insulinspritze 1ml	Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Kanüle BD Eclipse Needle 20G, 23G, 26G	Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
konische Zentrifugenröhrchen Cellstar tubes 50 ml /15 ml	GreinerBio One, Solingen, DE
Kulturflasche mit Filter 25 cm ² / 75 cm ² mit Filter cap (GreinerBio / Falcon)	GreinerBio One, Kremsmünster, AUT Thermo Fisher Sc., Waltham, MA, USA
Linsen-Reinigungspapier	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Micro Amplification 96-well reaction plate	Thermo Fisher Sc., Waltham, MA, USA
Micro Amplification optical adhesive film	Thermo Fisher Sc., Waltham, MA, USA
Mikrozentrifugenröhrchen 1,5 ml	StarLab, Hamburg, DE
Multiwellplatten Flachboden Tissue Culture, Falcon 6 / 12 / 24 / 96 wells	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Objektträger	Engelbrecht, Edermünde, DE Ulti Dent Scientific, St. Laurent, QC, CA
Parafil M	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
PCR stripe tubes 0,2 ml, Axygen PCR Tube 0,2 ml StarLab	Corning Incorporated, Corning, NY, USA StarLab, Hamburg, DE
Pipettenspitzen RNase-free 0,1-10µl / 1-100µl/ 1-200µl /101-1000µl	StarLab, Hamburg, DE
Polystyrene Round Bottom Tube 5 ml 12x7	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Polystyrene Tube mit Deckel 5ml	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Porzellan-Mörser & Porzellan-Stößel	Thermo Fisher Sc., Waltham, MA, USA
Reaction Plate 384-well, Life technologies	Thermo Fisher Sc., Waltham, MA, USA
Safe-Lock Tubes 1,5ml	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Spritze 1 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml	Thermo Fisher Sc., Waltham, MA, USA Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Stabpipetten Cellstar 5 ml, 10 ml, 25 ml	GreinerBio One, Kremsmünster, AUT
Waagschalen 85x85mm, antistatisch	Oehmen GmbH
XF cell culture microplate Tc treated	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Zellschaber 28 cm Grifflänge	GreinerBio One, Kremsmünster, AUT
Zell-Strainer 100 µm / 40 µm	GreinerBio One, Kremsmünster, AUT

2.1.6 Maschinen und Geräte

Tabelle 6 Liste der verwendeten Maschinen und Geräte

Mikroskope / Histologie	
MICROM HM360	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
Tissue-Tek TEC 5	Sakura Finetek Europe, Aalphen aan den Rijn, NL
Fluoreszenz Mikroskop LSM 710	Zeiss, Oberkochen, DE
Mikroskop Olympus BX53	Olympus, Waltham, MA, USA
Mikroskop-Digitalkamera SC50	Olympus, Waltham, MA, USA
Mikroskop-Digitalkamera S80/0.30	Leica microsystems, Wetzlar, DE
Mikroskop Leica DM10000	Leica microsystems, Wetzlar, DE
Mikroskop Leica DM10000 LED	Leica microsystems, Wetzlar, DE
Mikroskop Leica DM IL LED	Leica microsystems, Wetzlar, DE
Mikroskop Leica DM4000B	Leica microsystems, Wetzlar, DE
Mikroskop Olympus CK2	Olympus, Waltham, MA, USA
Durchflusszytometrie	
BD FACS Aria III	Becton Dickinson and Comp., Franklin Lakes, NJ, USA
FACS Vantage im Biosafetycabinet modifiziert von K. Lennartz	Becton Dickinson and Comp., Franklin Lakes, NJ, USA (Lennartz et al., 2005)
hämatologisches Durchflusszytometer ADVIA 120 Hematology Systems	Siemens und Bayer, München und Berlin, DE
hämatologisches Durchflusszytometer Sysmex XE 2100	Sysmex, Kōbe, JPN
Invitrogen Attune NxT	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
LSR II	Becton, Dickinson a. Comp. Franklin Lakes, NJ, USA
Sony Spectral Cell Analyzer A3800	Sony, Minato, Tokio, JPN
Molekularbiologie	
Nano Drop 2000 spectrophotometer	Thermo Fisher Sc., Waltham, MA, USA
Nanophotometer P330	Implen, Westlake Village, CA, USA
QuantStudio 5 Real-Time-PCR-System	Thermo Fisher Sc., Waltham, MA, USA
Thermo Flex Cyclor	Analytik Jena, Jena, DE
Thermozykler T3000, Biometra	Analytik Jena, Jena, DE
ViiA 7 Real-Time PCR System	Thermo Fisher Sc., Waltham, MA, USA
Zentrifugen	
Tischzentrifuge Sprout	Heathrow Scientific, Illinois, USA
Eppendorf Zentrifuge 5451C	Eppendorf, Hamburg, DE

Zentrifuge Allegra 6KR	Beckmann Coulter, Brea, CA, USA
Zentrifuge Mikro 200R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, DE
Zentrifuge Rotana 460R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, DE
Zytospin 4 Shandon	Marshall Scientific, Hampton, USA
Zytospin 2 Shandon	Marshall Scientific, Hampton, USA
Verschiedenes	
Analysewaage ABJ 220-4NM	Kern & Sohn GmbH, Balingen, DE
ErgoOne Pipetten, variable Volumina	StarLab, Hamburg, DE
Inkubator 100 Unimax 1010	Heidolph, Schwabach, DE
Autoflow water-jacked CO ₂ -Incubator NU-8700E	NuAire, MN, Plymouth
Inkubator Hera cell 150	Thermo Fisher Sc., Waltham, MA, USA
Inkubator Forma Scientific	Thermo Fisher Sc., Waltham, MA, USA
Kryo Einfriergerät NU 2000, NUNC	Thermo Fisher Sc., Waltham, MA, USA
pH-Meter inoLab Cond Level 1	Xylem Inc., Rye Brook, NY, USA
Pipetten, variable Volumina	Eppendorf, Hamburg, DE
Pipetten, variable Volumina	Thermo Fischer Sc., Waltham, MA, USA
Pipettierhilfe Pipetus Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, DE
Präzisionswaage EW 4200-LNM	Kern & Sohn GmbH, Balingen, DE
Präzisionswaage Precisa 1600C	Rigal Bennett, Goole, GBR
Schüttelwasserbad Julabo SW22	Julabo, Seelbach, DE
Seahorse xFe24 Analyzer	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Vortex Genius 3	IKA, Staufen, DE
Wasserbad Isotemp 210	Thermo Fisher Sc., Waltham, MA, USA
Wasserbad Typ 1004	Gesellschaft f. Labortechnik mbH, Burgwedel, DE
Z2 Particle Counter and Size Analyzer	Beckmann Coulter, Brea, CA, USA

2.1.7 Software

Table 7 Liste der verwendeten Software

Software	Herausgeber
CellSenseEntry	Olympus, Waltham, MA, USA
Excel, Word, Power Point Microsoft Office 365 ProPlus	Microsoft, Redmond, WA, USA
FlowJo_V10	Becton Dickinson and Comp., Franklin Lakes, NJ, USA
GraphPad Prism 6	GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA
Image J	W. Rasband, National Institute of Health, USA
IMARIS	Bitplane, Zürich, Schweiz
Leica Application Suite (LAS 4.0)	Leica microsystems, Wetzlar, DE
OsteoMeasure	Osteometrics, Decatur, GA, USA
QuantStudio Design and Analysis	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
ViiA7 Software	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
ZEN Zeiss Efficient Navigation	Karl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, DE

2.2 MAUSLINIEN UND HALTUNG DER MÄUSE

Die Mäuse waren unter „special pathogene free“ (SPF) Konditionen im Tierlabor des Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM) bzw. im Tierlabor des Universitätsklinikums Essen (UK Essen) im WTZ Forschungsgebäude untergebracht. In Münster erfolgte die Unterbringung in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung auf dem Campus des Universitätsklinikums Münster. Alle Mausexperimente wurden vom Ethik-Komitee des IRCM nach den Vorschriften des IRCM und des Canadian Council of Animal Care bzw. dem Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW nach dem Deutschen Tierschutzgesetz bewilligt. Die Versuche am IRCM wurden im Rahmen des Protokolls „II 2016-07 TM“ durchgeführt, am UK Essen und UK Münster liefen die Versuche unter den Dokumenten G1196/11 und G1438/14.

Um die Auswirkung verschiedener Expressionslevel des Transkriptionsfaktors Gfi1 zu untersuchen, wurden verschiedene Mausmutanten gezüchtet. Die Mäuse wurden im Alter von drei Wochen anhand des bei Ohrstanzen gewonnenen Materials genotypisiert. Dies wurde durch Mitarbeiter des zentralen Tierlabors in Essen, durch Mitarbeiter der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung in Münster bzw. in Montreal durch den Technischen Assistenten der Arbeitsgruppe (AG) Möröy, Mathieu Lapointe, durchgeführt. In Tabelle 8 sind alle verwendeten Mausstämme aufgeführt. Die Mausstämme wurden mehrere Jahre auf einem C57BL/6-Hintergrund (s.u.) mit Rückkreuzungen gezüchtet. Alle Mausstämme waren vor Beginn der Arbeit im Labor bereits etabliert, die beschriebenen Methoden zur Modifikation der Genexpression wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht erneut durchgeführt.

Tabelle 8 Liste der verwendeten Mauslinien

Mausstämme	Referenz
<i>Gfi1</i> knockout (KO)	(Fraszczak et al., 2018; Karsunky et al., 2002)
<i>GFII36S</i> knockdown (KD)	(Fraszczak et al., 2018)
<i>GFII36S</i> knockin (36S-KI)	(Khandanpour et al., 2012)
<i>GFII36N</i> knockin (36N-KI)	(Khandanpour et al., 2012)
<i>NUP98/HOXD13</i> transgen (tg)	(Hones et al., 2016)

2.2.1 C57BL/6-Mäuse = wildtyp (wt)-Mäuse

Die wt Mäuse tragen keine genetischen Veränderungen, womit sie als Kontrolle dienen. Sie wurden aus dem zentralen Tierlabor am UK Essen, der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung des UK Münster bzw. aus der Animal Facility im IRCM bezogen und stammen aus den The Harlan Laboratories (Horst, Niederlande).

2.2.2 *Gfi1*-KO-Mäuse

Durch Manipulation muriner embryonaler Stammzellen wurde eine vollständige Deletion des *Gfi1*-Gens herbeigeführt (Karsunky et al., 2002). Die in Essen verwendeten *Gfi1*-KO-Mäuse wurden mit Mäusen gezüchtet, die aus der AG von Professor Möröy in Montreal bezogen worden waren. Die *Gfi1*-KO-Mäuse in Münster wiederum wurden mit Embryonen-Transfer aus den Mausstämmen in Essen gezüchtet. Somit ist davon auszugehen, dass in Bezug auf die hier relevanten Aspekte alle verwendeten Mäuse einen vergleichbaren genetischen Hintergrund haben.

2.2.3 *GFII*-KI-Mäuse

Damit homozygote Mäuse zu 100% humanes *GFII* exprimieren, wurde das murine *Gfi1*-Gen gegen humanes *GFII*-Gen mittel homologer Rekombination ausgetauscht, wie in verschiedenen Publikationen beschrieben wurde (Fiolka et al., 2006; Hones et al., 2016).

2.2.4 *GFII*-KD-Mäuse

Eine fünf- bis 15- prozentige Expression des humanen *GFII* verglichen mit der *GFII*-Expression bei *GFII*-KI-Mäusen wurde durch die Bildung hypomorpher Allele erreicht. Dafür werden Neokassetten in Introns des entsprechenden Gens der embryonalen Stammzellen eingesetzt. Die Neokassetten enthalten kryptische Splicing-Stellen, die den normalen Splicing-Vorgang der Messenger Ribonukleinsäure (mRNA) des Zielgens stören. So entsteht in den sogenannten hypomorphen Allelen Splicing-Fehler in der mRNA für die Proteinproduktion, die somit auf 10-15 % des üblichen Niveaus sinkt (Holzenberger et al., 2000).

2.2.5 NUP98/HOXD13-Mäuse

Durch die Expression des Fusionsgens aus dem humanen Gen für *Nukleoporin 98 Da (NUP98)* und des humanen *Homebox D13-Gens (HOXD13)* entwickeln die Mäuse zunächst ein Krankheitsbild, das dem menschlichen Myelodysplastischen Syndrom (MDS) entspricht, und im Verlauf bei exzessiver Blastenproliferation eine AML (Lin et al., 2005). Der C57BL/6-tg (Vav1-NUP98/HOXD13) G2Apl/J -Stamm wurde mit Tieren aus dem Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) gezüchtet.

2.3 PATIENTENPROBEN

Aus dem im Rahmen notwendiger diagnostischer Punktionen gewonnenen Knochenmark von AML-Patienten wurde nach deren Einverständnis entsprechend der Richtlinien der Ethikkommission des Universitätsklinikums Essens (11-4702; 2018-452-f-S) MSPC gewonnen und mittels RT-PCR auf ihre Gfi1-Expression untersucht.

2.4 IN-VIVO EXPERIMENTE

2.4.1 Induktion der Leukämie

Wie oben beschrieben kann die Expression von *NUP98/HOXD13* über ein MDS zu einer AML führen, was wir für ein Mausmodell der AML nutzten. Eine weitere Option zur Induktion der Leukämie stellte die Transplantation genetisch veränderter Knochenmarkszellen dar. Knochenmarkszellen von wt Mäusen wurden viral mit dem Onkofusionsgen *MLL-AF9* transduziert, das Resultat einer Translokation t(9;11) p(22;23) ist. Diese Translokation kommt gehäuft bei AML-Patienten vor und die Transplantation von murinen Zellen mit diesem humanen Onkofusionsgen ist eine etablierte Methode zur AML-Induktion in Mäusen (Krivtsov et al., 2006). In unserem Modell wurde das Green-Fluorescence Protein (GFP) über eine interne ribosomale Einheit gemeinsam mit der *MLL-AF9* Sequenz codiert. Den Mäusen, die am vorherigen Tag mit 10 Gray (Gy) bestrahlt worden waren, wurden 100 000 GFP⁺ transduzierten Zellen in 0,1-0,3 ml PBS in eine Schwanzvene injiziert. Sobald diese primär transplantierten Mäuse Zeichen von Leukämie wie Schwäche und Hepatosplenomegalie zeigten, wurden sie getötet und ihr Knochenmark entnommen. Die Tötung der Mäuse und Aufbereitung des Knochenmarkes erfolgte, wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben. Die KM-Zellen wurden analog zum oben genannten (o.g.) Procedere Mäusen, die am Vortag mit 2 Gy bestrahlt worden waren, intravenös transplantiert. Nach diesem Prinzip wurde in weiteren Mäusen mit leukämischem Knochenmark von sekundär transplantierten Mäusen eine AML induziert. Die sekundär und höhergradig transplantierten Mäuse wurden für die Versuche verwendet und werden in der vorliegenden Arbeit als leukämische Mäuse bezeichnet. Für die Kontrollgruppe erfolgte die Transplantation von Knochenmark gesunder Mäuse desselben Genotyps nach der Bestrahlung mit 2 Gy. Alle bestrahlten Mäuse wurden in Essen ab dem Tag der Bestrahlung für drei Wochen, in

Montreal ab drei Tagen vor der Bestrahlung, prophylaktisch mit Antibiotika im Trinkwasser behandelt, um Infektionen durch die Immundefizienz zu vermeiden.

2.4.2 Euthanasie und Gewebeaufbereitung

Leukämische Mäuse wurden täglich kontrolliert und euthanasiert, wenn sie eine Verschlechterung des Allgemeinzustandes beispielsweise durch Aktivitätsminderung oder Zeichen einer Leukämie wie Hepatosplenomegalie zeigten. Die Euthanasie der Mäuse erfolgte durch Kohlenstoffdioxid (CO₂)-Zufuhr in einer luftdichten Kammer bis zur Bewusstlosigkeit der Maus und anschließender zervikaler Dislokation. Die Bewusstlosigkeit der Maus wurde durch Prüfung des Kornealreflexes und des Zwischenzehenreflexes bestätigt.

Jede Maus wurde vor Organentnahme gewogen. Zur Organentnahme wurde das Abdomen mit einem Medianschnitt eröffnet. Die Eröffnung des Thoraxes erfolgte von dort mittels Durchtrennung des Diaphragmas. Das periphere Blut wurde mit einer 1 ml Spritze und einer 26G-Nadel aus dem Herzen aspiriert und in EDTA-Röhrchen gesammelt. Milz und Leber wurden nach der Entnahme gewogen. Milz und Knochen mit Knochenmark wurden auf Eis in FACS-Puffer gelagert und am selben Tag analysiert. Die weiteren Schritte erfolgten, sofern nicht anders angegeben, auf Eis. Die Milz wurde zur Zellgewinnung zwischen zwei Objektträgern in FACS-Puffer zerrieben, das Gewebe durch mehrmaliges Aufziehen durch eine 20G Kanüle in FACS-Puffer resuspendiert und durch 40 µm Zellsiebe gefiltert.

Die langen Röhrenknochen (Humeri, Femora, Tibiae) wurden von Weichteilen gereinigt und die Epiphysen wurden entfernt, sodass das Knochenmark mithilfe einer 10 ml Spritze und einer 23G Kanüle ausgespült werden konnte. Bei einigen Mäusen wurde das rechte Femur für die Histologie oder die Microcomputertomographie (µCT) verwendet. Dann wurden jeweils nur die Röhrenknochen der linken Körperhälfte verwendet, um die Gesamtzahl der Knochenzellen vergleichen zu können. Das herausgespülte Knochenmark wurde mechanisch homogenisiert und durch einen 40 µm Filter gegeben. Pro Maus wurden hier etwa 10⁶ bis 10⁷ KM-Zellen gewonnen.

Die gespülten Diaphysen der Röhrenknochen wurden mechanisch mit Stößel und Mörser zerkleinert und zweimal mit HBSS-Puffer gewaschen. Die Waschlösung wurde durch ein 100 µm Zellsieb in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben. Die Knochensplinter wurden in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt und für eine Stunde mit 3 mg/ml Kollagenase I in HBSS-Puffer bei 37 Grad Celcius (°C) inkubiert. Die dabei herausgelösten Zellen wurden bei zweimaliger Waschung mit HBSS-Puffer durch ein 100 µm Zellsieb in das 50 ml Zentrifugenröhrchen hinzugegeben. Die so gewonnenen Knochenzellen wurden bei 300 x Erdbeschleunigung (g) und 4 °C für fünf Minuten (min) zentrifugiert und anschließend bei Raumtemperatur für 5 min mit 1 ml Ammonium Chloride Lysing Agent zur Lyse der Erythrozyten behandelt. Diese Reaktion wurde mit FACS-Puffer gestoppt und die Zellen wurden erneut für 5 min bei 300 x g zentrifugiert.

Die Suspensionen der Milzzellen, der KM-Zellen und der Knochenzellen wurden jeweils im Verhältnis 1:100 in 10 ml Coulter Clenz Cleaning Agent verdünnt und mit dem Z2 Particle Count and Size Analyzer gezählt. War die Maschine nicht verfügbar, wurden die Zellen manuell mithilfe von Trypanblau und einem Hämozytometer gezählt.

2.4.3 Lebendzellzählung mit Trypanblau und Hämozytometer

Der Farbstoff Trypanblau färbt Zellen mit defekter Zellmembran, lebende Zellen mit einer intakten Zellmembran werden nicht gefärbt. Nachdem die Zellsuspension mit Trypanblau vermischt wurde, wurden 10 µl dieser Mischung in ein Hämozytometer gegeben. Der Verdünnungsfaktor (F_V) wurde anhand der zu erwartenden Zellzahl gewählt. Unter einem Lichtmikroskop wurden in 20-facher Vergrößerung die Trypanblau-negativen Zellen als lebende Zellen gezählt. Die Zählfläche des Hämozytometers ist in vier große Eckquadrate unterteilt, unter denen sich jeweils 0,1 µl der Lösung befinden. Es wurden die lebenden Zellen in jedem Eckquadrat gezählt und der Mittelwert (M_{ZQ}) errechnet. Die Konzentration lebender Zellen (c_{IZ}) in der Ausgangssuspension kann dann anhand folgender Formel berechnet werden: $c_{IZ} = M_{ZQ} * 10^4 / F_V$.

2.4.4 Hämogramm, Blutausstrich & Knochenmarkszytologie

Das periphere Blut der Mäuse wurde mit dem Durchflusszytometer ADVIA 120 Hematology Systems (in Montreal) oder dem Sysmex XE 2100 (in Essen) maschinell analysiert. Außerdem wurden Blutausstriche zur manuellen Differenzierung angefertigt. Für die Knochenmarkzytologie wurden 10^5 Knochenmarkszellen mithilfe des Zytospin 4 Shandon (in Montreal) oder des Zytospin 2 Shandon (in Essen) auf Objektträger gebracht. Die Knochenmarkszytologie und die Blutausstriche wurden nach Pappenheim gefärbt (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019a). Dafür wurden die Objektträger zunächst 30 Sekunden in Methanol gehalten und anschließend 5 min und nochmal 3 min mit May Grünwald Färbelösung sowie abschließend 14 min in Giemsa StainRITE Färbelösung gefärbt. In Deutschland erfolgte die Färbung der Blutausstriche und Zytospins nach Pappenheim durch das hämatoonkologische Speziallabor des Westdeutschen Tumorzentrums bzw. der Hämatologie des UK Münster.

2.5 DURCHFLUSSZYTOMETRIE UND FLUORESZENZ AKTIVIERTE ZELLSORTIERUNG (FACS)

Die Durchflusszytometrie unterscheidet Zellen anhand ihrer Größe, ihrer Granularität und der Expression verschiedener Oberflächenantigene, wie beispielsweise der Cluster of Differentiation (CD), die mit spezifischen Antikörpern (AK) markiert werden können. Diese AK wiederum sind an unterschiedliche Fluoreszenz-Farbstoffe gekoppelt. Im Durchflusszytometer werden die mit Fluoreszenz-AK markierten Zellen der Zellsuspension mittels hydrodynamischer Fokussierung einzeln an Laserstrahlen vorbeigeleitet. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden durch Licht spezifischer Wellenlänge angeregt und emittieren daraufhin Licht in charakteristischen Spektren. Anhand dieser Lichtsignale wird jeder Zelle zugeordnet, welche Antikörper gebunden haben. Zudem werden aus

der Lichtstreuung und Lichtbeugung die Granularität und die Größe der Zellen abgeleitet. Bei der Fluoreszenz aktivierten Zellsortierung (FACS) kann man die Zellen anhand dieser Merkmale entsprechend eines vorher angelegten Gatings sortieren. Beim Gating werden Zellpopulationen, die man sich nach Größe, Granularität und Antikörperexpression sortiert anzeigen lassen kann, zusammengefasst. Die Sortierung der Zellen beruht auf elektrischer Aufladung der Zellen und anschließender Ablenkung im elektrischen Feld.

Die zu untersuchenden oder zu sortierenden Zellen (KM-, Milz- und Knochenzellen sowie MSPC und Leukämiezellen aus der Zellkultur) wurden für 10 min bei 4 °C mit Fc-Block-Lösung (s. Tabelle 2) vorbehandelt. Es folgte ein Waschschrift mit 2 ml FACS-Puffer einer fünfminütigen Zentrifugation bei 4 °C und 300 x g. Anschließend wurden die Zellen mit einem Mastermix aus den jeweiligen in Tabelle 3 aufgeführten AK in FACS-Puffer in einem Gesamtvolumen von 70-80 µl für 10 min bei 4 °C gefärbt. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen in FACS-Puffer, der die Nukleinsäuremarkierungsagenzien DAPI (4,6-Dimimidin-2-phenylindol) oder HelixNP Blue enthielt, gelöst. Anhand dieser war eine Lebend-Tot-Unterscheidung möglich. Für die Analyse der Knochenzellen wurde der Lineage-Cell-Detection-Cocktail mit Biotin im Mastermix verwendet. Dieser enthielt die Antikörper Anti-CD11b, Anti-CD5, Anti-CD45R, Anti-7-4, Anti-Gr-1 (Ly6G/C) und Anti-Terr-11, die alle mit Biotin verbunden sind, statt mit einem Fluoreszenzfarbstoff. Deshalb war nach der Inkubation und der Waschung ein weiterer Schritt notwendig. Die Zellen mit daran gebundenen Antikörpern wurden für 10 min bei 4 °C in 100 µl FACS-Puffer mit 1 µl Streptavidin mit Fluoreszenzfarbstoff inkubiert. Streptavidin bindet spezifisch an Biotin. Auch nach diesem Schritt erfolgte ein Waschschrift mit Zentrifugation, anschließend die oben beschriebene Resuspension des Pellets in FACS-Puffer mit einem Nukleinsäuremarkierungsagenz.

Die durchflusszytometrischen Analysen wurden in Essen am LSR II, in Montreal am Sony Spectral Cell Analyzer A3800 durchgeführt. In Münster wurde das Durchflusszytometer Invitrogen Attune NxT verwendet. Für die Datenanalyse diente die Software FlowJo in der Version 10.4.2. Die Zellsortierung mittels Fluoreszenz aktivierter Zellsortierung (FACS) wurde am IRCM mit dem BD FACS Aria III durch Julie Lord oder Eric Massicotte aus der Abteilung für Durchflusszytometrie, in Münster mit dem BD FACS Aria III durch Herrn König der AG Rosenbauer und in Essen durch Klaus Lennartz an einem durch ihn in ein Biosafety Cabinet eingebautes FACS Vantage durchgeführt.

2.6 ZELLKULTUR

Alle Zellen in Kultur wurden, wenn nicht anders angegeben, im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90-100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

2.6.1 Kultivierung primärer muriner mesenchymaler Zellen

Für die Kultivierung von MSPC wurden die gesamte Zellsuspension von Knochenmark und Knochen in „tissue culture treated“ Zellkulturflaschen (T75 oder T25 je nach Zellzahl) mit 10 ml Medium aus dem MesenCult Expansion Kit Mouse durch alle zwei Tage stattfindenden Mediumwechsel von nicht adhären Zellen (v.a. hämatopoetischen Zellen) befreit. Nach etwa einer Woche waren die Zellen morphologisch ausreichend rein (>95% adhären spindelförmige Zellen) und wurden für die Experimente verwendet. Die Charakteristika der Mäuse, aus denen erfolgreich Zelllinien angezüchtet wurden, sind in Tabelle 9 aufgeführt: Mausnummer, Genotyp, Leukämie-Status (inklusive Transplantation), Alter in Tagen (d) bei Euthanasie und männliches (M) oder weibliches (W) Geschlecht.

Tabelle 9 Mäuse, aus deren Knochenmark primäre Stromazellen stammen

Mausnummer	Genotyp	<i>MLL-AF9</i> trans.	leukämisch	Alter (d)	Geschlecht
M111478	Wt	-	-	43	M
M111066	Wt	-	-	46	M
M111067	Wt	-	-	47	M
KP10635	<i>Gfi1-KO</i>	-	-	99	M
M103541	<i>Gfi1-KO</i>	-	-	290	M
M110943	<i>Gfi1-KO</i>	-	-	46	M
KP9111	<i>NUP98/HOXD13</i>	-	+	371	W
KP9128	<i>NUP98/HOXD13</i>	-	+	370	W
KP9429	<i>NUP98/HODX13</i>	-	+	324	W
KP11215	Wt	+	+	79	W
M111080	Wt	+	+	101	W

Nach Erreichen der Reinheit von mindestens 95 % spindelförmigen Zellen und ausreichender Konfluenz von mindestens 70 % der Fläche, wurden die Stromazellen in IMDM mit 10% Fetalgro und 5 % Horse Serum kultiviert und zweimal wöchentlich gesplittet. Hierfür erfolgte die Inkubation in 3-5 ml Trypsin über 5 min, dann wurde die Reaktion durch Zugabe des Mediums gestoppt. Teilweise war eine zusätzliche mechanische Ablösung der Zellen mit einem Zellschaber notwendig. Die Zellen wurden zentrifugiert bei 300 x g, das Pallet je nach Größe in 2-5 ml Medium aufgenommen und je nach Konfluenz der bisherigen Kultur wurde $\frac{1}{2}$ bis $\frac{1}{10}$ der Zellsuspension in 10 ml Medium in T75 Zellkulturflaschen ausgesät. Bei niedriger Konfluenz erfolgte anstelle des Splittens der Austausch des halben Mediums.

2.6.2 Osteogener Differenzierungs-Assay

Um das Potenzial der murinen MSPC für eine Differenzierung in Osteoblasten zu testen, wurden ca. 250 MSPC / cm² in 6-er oder 24-er Wellplatten ausgesät und in α MEM mit 20 % hiFCS 1% P/S

kultiviert. Bei 50-60 % Konfluenz wurde das Medium aspiriert und durch Osteodifferenzierungsmedium (siehe [s.] Tabelle 2 Liste der selbst angesetzten Lösungen und Medien) ersetzt. Unter Wechsel des Mediums alle drei bis vier Tage wurden die MSPC über drei Wochen in dem osteogenen Differenzierungsmedium inkubiert.

Nach den drei Wochen wurde das Medium aspiriert und die Wells mit Calcium- und Magnesium-freien PBS vorsichtig ausgewaschen. Die Zellen wurden mit 99 % Ethanol für 30 min fixiert. Nach Entfernung des Ethanols wurden die Wells mit destilliertem Wasser ausgewaschen und die Zellen für 15 min mit gefilterter einprozentiger Alizarinrot-Färbelösung im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung aspiriert und viermal mit destilliertem Wasser ausgewaschen. Die Färbung der Zellen wurde unter dem Mikroskop Olympus CK2 in 100- bis 200-facher Vergrößerung analysiert und mit der Software Leica Application Suite (LAS 4.0) fotografiert. Alizarinrot reagiert mit Calcium, das in der von reifen Osteoblasten produzierten Knochenmatrix vorkommt. Das entstehende Salz hat eine ziegelrote Farbe (Puchtler et al., 1969; Silva et al., 2005).

2.6.3 Adipogener Differenzierungsassay

Für den adipogenen Differenzierungsassay wurden 10^4 MSPC pro cm^2 in 6er- oder 12-er Wellplatten ausplattiert. Bei ca. 70 % Konfluenz wurde die adipogene Differenzierung durch das adipogene Differenzierungsmedium (s. Tabelle 2 Liste der selbst angesetzten Lösungen und Medien) eingeleitet. Als Kontrolle dienten MSPC, die unter gleichen Bedingungen in StemXVivo Osteogenic/Adipogenic Base Medium ohne adipogenes Supplement kultiviert wurden. Über die Kulturzeit von drei Wochen erfolgte jeweils zweimal wöchentlich ein Medium-Wechsel. An Tag 21 wurden die Fettvakuolen der ausdifferenzierten Adipozyten mit Oil Red O, einem Lysochrom, angefärbt. Dafür wurden die Zellen zunächst für 30 min mit 10% Formalin fixiert. Nach einem Waschschrift mit deionisiertem Wasser folgte die Inkubation mit 60% Isopropanol. Die 0,5-prozentige Oil-Red O Lösung in Isopropanol wurde kurz vor der Verwendung in einem drei zu zwei Verhältnis mit deionisiertem Wasser verdünnt. Mit dieser Lösung erfolgte nach Absaugen des Isopropanols die Färbung der Adipozyten für 5 min. Anschließend wurde die Oil-Red-Lösung mit Wasser abgespült. Die Färbung wurde analog zum osteogenen Differenzierungsassay unter dem Mikroskop Olympus CK2 analysiert und fotografiert.

2.6.4 Isolation von Lineage-negativen KM-Zellen (Lin^- KM)

Als Kontrolle für die Kokultur mit leukämischen Zellen wurden Lineage negative (Lin^-) KM-Zellen benötigt. Mittels magnetischer Separation wurden Lin^- Zellen unter Verwendung des MACS Lineage Cell Depletion Kits aus dem Knochenmark isoliert. Dafür wurden die KM-Zellen wie oben beschrieben aus den langen Röhrenknochen gewonnen, in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gefüllt und für 5 min bei 300 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 5 ml FACS-Puffer gelöst, um mit 100 μl dieser Zellsuspension in einer 1:100 Verdünnung im Z2 Coulter Particle Counter and Size Analyzer die Zellzahl zu bestimmen. Die Zellen wurden erneut

zentrifugiert und das Pellet in 40 μ l FACS-Puffer pro 10^7 Zellen gelöst. Diese Zellsuspension wurde mit 10 μ l α -Lineage-Biotin-Antikörper pro 10^7 Zellen für 11 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden 20 μ l FACS-Puffer pro 10^7 Zellen und 20 μ l α -Biotin-MicroBeats pro 10^7 Zellen hinzugegeben. Es folgten weitere 15 min Inkubationszeit auf Eis. Nach einer Waschung mit 25 ml FACS-Puffer wurden die Zellen bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Zellpellet in 500 μ l MACS-Puffer gelöst. Die Separationssäule MS Column Miltenyi wurden in dem magnetischen Feld des MACS-Separators platziert und mit einem 30 μ m Pre-Separation Filter bestückt. Nach Vorspülen der Säule mit 500 μ l MACS-Puffer wurde die Zellsuspension auf die Säule gegeben. Der Durchfluss wurde in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen aufgefangen, das in Eis stand. Die über den Lineage-Biotin-Antikörper und die daran bindenden MicroBeads magnetisch markierten Lineage positiven Zellen blieben in der Säule haften, sodass die aufgefangene Suspension die Lin⁻ Zellen enthielt. Um die finale Zellzahl zu erhöhen, wurde das 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 1,5 ml MACS-Puffer gespült und dies in Portionen von je 500 μ l ebenfalls durch die Säule in auf Eis stehende Zentrifugenröhrchen gegeben.

Die erhaltenen Lin⁻ KM-Zellen eignen sich gut als Kontrolle für leukämische Blasten, weil sie statt der gesamten heterogenen Gruppe von Knochenmarkszellen in gesunden Mäusen nur die HSPC umfassen, die keine Oberflächenmarker einer bestimmten hämatopoetischen Zelllinie exprimieren.

2.6.5 Kultivierung leukämischer und gesunder muriner Knochenmarkszellen

Um den Einfluss von leukämischen Zellen auf MSPC isoliert zu untersuchen, wurden MSPC mit der retroviral mit pLEGFP transduzierten murinen AML-Zelllinie C1498 GFP⁺ (Boyer et al., 1995) oder mit primären Knochenmarkszellen von leukämischen oder gesunden Mäusen kokultiviert. Die C1498 GFP⁺ Zellen, die wir freundlicherweise von Dr. Justin Kline aus Chicago erhielten, wurden in RPMI 1640 mit 10 % FCS und 1 % P/S kultiviert und durch zweimal wöchentliches Splitting wurde die Zelldichte zwischen $3 \cdot 10^5$ und $2 \cdot 10^6$ Zellen / ml gehalten. Die primären KM-Zellen leukämischer Mäuse und die Lin⁻ KM Zellen gesunder Mäuse wurden in IMDM mit 20% hiFCS, supplementiert mit 10 ng /ml IL-6, 10 ng /ml IL-3, 20 ng /ml SCF kultiviert.

2.6.6 Kokultur von MSPC und leukämischen KM-Zellen bzw. Lin⁻ KM-Zellen

Für die Kokultur-Experimente wurden ca. $3 \cdot 10^5$ murine MSPC in T75-Flaschen ausgesät und mit IMDM- mit 20 % hiFCS und 1 % P/S versorgt. Sobald sie eine 60-70-prozentige Konfluenz erreicht hatten, wurde das Medium aspiriert und Lin⁻ KM Zellen gesunder Mäuse oder unsortierte KM-Zellen leukämischer Mäuse wurden in IMDM 20 % hiFCS supplementiert mit je 10 ng /ml IL6 und IL-3 sowie 20 ng /ml SCF auf die MSPC gegeben. Es erfolgte der Wechsel des Mediums mindestens alle drei Tage, auch um die Leukämiezellzahl möglichst zwischen $1 \cdot 10^5$ und $1 \cdot 10^6$ Zellen pro ml zu halten. Für die Analyse wurden die suspendierten Zellen aspiriert und die adhärenen Zellen nach 5 min Inkubation mit TrypLE oder TrypsinEDTA durch Auswaschen der Flasche und teilweise unter

Gebrauch des Zellschabers abgelöst. Anschließend erfolgte eine Trennung oder Unterscheidung der MSPC von den KM-Zellen mittels Durchflusszytometrie.

2.6.7 Kryokonservierung primärer und kultivierter Zellen

Die Kryokonservierung von Primärzellen und Zelllinien erfolgte in Einfriermedium. Dieses bestand zu 50 % aus hiFCS/ Fetalgro, zu 40 % aus dem jeweiligen Basismedium und zu 10 % aus Dimethylsulfoxid (DMSO). Die Zellen wurden nach der Zählung durch Zentrifugation mit 300 x g von ihrem bisherigen Medium getrennt. Das Pellet wurde in 500 µl pro $5 \cdot 10^6$ - 10^7 Zellen resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 500 µl Portionen auf CryoVials verteilt. Es wurden 500 µl hiFCS / Fetalgro mit 20 % DMSO zugegeben. Hiernach war eine rasche Kühlung der Zellen erforderlich. Die Zellen wurden in einem Einfrier-Container bei -80 °C für mindestens 24 Stunden eingefroren. Die Boxen sorgten für eine langsame kontinuierliche Temperaturabsenkung, um Zellschäden durch Auskristallisierung zu vermeiden. Anschließend wurden die Zellen in Flüssigstickstoff überführt.

Beim Auftauen wurden die Zellen sehr rasch vom Einfriermedium getrennt, sobald der Aggregatzustand der Suspension flüssig wurde. Dafür wurden 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 10 ml des für die Zelle üblichen (hiFCS enthaltenden) Medium gefüllt und auf Eis gestellt. Die CryoVials wurden zum Auftauen in ein 37 °C warmes Wasserbad gehalten. Sobald die Zellsuspension flüssig war, wurde diese in die oben beschriebenen Zentrifugenröhrchen überführt, bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert und das Pallet im entsprechenden Medium kultiviert (s.o.)

2.7 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

2.7.1 RNA-Extraktion

Die Extraktion von Ribonukleinsäure (RNA) aus den MPSC (10^4 - $5 \cdot 10^6$ Zellen) erfolgte mit dem RNeasy mini Kit nach Anweisungen des Herstellers. Diese Extraktionsmethode beruht auf einer Kombination der Guanidin-Isothiocyanate-Lyse und der Kieselgel-Membranpurifikation. Aufgrund der meist geringen Zellausbeute wurde die RNA immer aus allen verfügbaren Zellen isoliert, die Zellzahl in den Ansätzen variierte folglich.

Zunächst erfolgt die mechanische und chemische Lyse der Zellen mittels Aspiration durch eine 23G Kanüle in 350 µl RLT-Puffer mit 1% β-Mercaptoethanol. RLT-Puffer enthält auch Guanidin-Isothiocyanate. Sowohl dieses als auch das β-Mercaptopurin führten zur Denaturierung und Inaktivierung von RNasen. Dann erfolgte die Lösung in 350 µl 100 % Ethanol. Die Lösung wurde in die Säulen mit Kieselgelmembran gegeben und die RNA band spezifisch an die Membran. Hiernach erfolgte die erste Zentrifugation mit >8000 g.

Der Waschpuffer RW1, von dem zweimal 350 µl auf die Säulen gegeben wurde, entfernte mit seinen Guanidin-Salzen Biomoleküle wie Proteine, Fettsäuren und Kohlenhydrate, die im Gegensatz zur RNA nicht spezifisch an die Kieselgelmembran binden. Auch ein Großteil der DNA wurde durch

die Kieselgelmembran entfernt. Durch 15-minütige Inkubation mit 10 µl DNase (25 Kunitz Units) in 70 µl RDD-Puffer zwischen den beiden Waschschrritten mit dem RW1-Puffer wurde die RNA weitergehend von DNA-Resten bereinigt. Anschließend reinigten zwei Zentrifugationsschritte mit je 500 µl des Waschpuffers RPE die Membran von Salzen aus den zuvor angewendeten Puffern. Schließlich wurde die hydrophile RNA mit 30-50 µl RNase freiem Wasser aus der Membran in ein Eppendorf-Röhrchen gespült.

2.7.2 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Konzentration und Reinheit der RNA-Proben wurden bestimmt, indem 1 µl der RNA-Lösung im UV-Bereich bei 260 und 280 Nanometer (nm) spektralphotometrisch gemessen wird. Der Absorptionsquotient A_{260}/A_{280} sollte für RNA bei ≥ 2 liegen, damit die Probe als rein angesehen werden kann. Liegt der A_{260}/A_{280} Quotient eher bei 1,8, ist eine Verunreinigung mit DNA wahrscheinlich. Der A_{230}/A_{260} - Quotient sollte zwischen 2,0 und 2,2 liegen: Abweichungen zeigen eine Verunreinigung mit nicht-Nukleinsäuren an.

2.7.3 RT-PCR (Real time Polymerasekettenreaktion)

Für die Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction (engl.) - PCR) musste die RNA zunächst in complementary DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Dazu wurden Produkte der Marke molecular biology von ThermoFisher Scientific verwendet. Ein Mastermix aus je 1 µl Desoxyribunucleosidtriphosphaten (dNTPs), Oligo-dT-Primer und EDTA wurde zu jeder mRNA-Probe gegeben und für 10 min bei 65°C inkubiert. Die Oligo-dT-Primer bestehen nur aus Thymin-Basen und binden an die Poly-Adenosin-Enden der mRNA-Moleküle. Sie dienen unabhängig von der Gensequenz jeder mRNA als Primer. Anschließend wurden jeder Probe 2 µl Dithiothreitol (DTT, ein Enzymstabilisator), 1 µl RNase Out (ein RNase-Inhibitor) und 1 µl SuperScript II Reverse Transkriptase zugefügt, das Probenvolumen mit RNase-freiem Wasser auf 35 µl erweitert und die Probe im Thermozykler für 10 min bei 25°C, für 1 Stunde bei 42°C und für 15 min bei 70°C inkubiert. Hierbei erfolgte die Produktion der cDNA durch die Reverse Transkriptase mit den dNTPs vom Oligo-dT-Primer aus. Die eigentliche quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) beruht auf einer sich wiederholenden Vervielfältigung bestimmter Abschnitte der cDNA, wobei sich in jeder Reaktionsrunde die Menge der cDNA verdoppelt. Durch einen Fluoreszenzmarker wird festgehalten, ab welchem Reaktionszyklus eine bestimmte cDNA-Sequenz detektierbar ist. Die TaqMan-Primer sind sequenzspezifische Oligonukleotide, die mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind, einem Quencher- und einem Reporterfarbstoff. Bindet die Sonde an ihre Zielsequenz wird sie durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase hydrolysiert. Reporter und Quencher werden räumlich getrennt und die Fluoreszenzintensität des Reporters steigt (Huggett et al., 2005; Nolan et al., 2006). Die SYBR-Green-Methode hingegen beruht auf einer unspezifischen Bindung des Fluoreszenzmarkers SYBR-Green I an neu-synthetisierte Doppelstrang-DNA. Hierfür werden spezifische Primer für die Ziel-Sequenzen hergestellt, an denen die im SYBR-Green-Mix enthaltene

DNA-Polymerase die komplementäre DNA-Synthese beginnt. SYBR-Green I bindet an die in dieser Reaktion synthetisierte Doppelstrang-DNA, wobei sich seine Fluoreszenz vervielfacht. Je mehr PCR-Zyklen gebraucht werden, um ein gewisse Fluoreszenz-Schwelle (Threshold) zu erreichen, desto höher ist der von der PCR-Maschine ermittelte CT-Wert („Threshold cycle“-Wert). Mit der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode kann anhand dieser Werte die relative Expressionsstärke der Gene in Bezug auf ein Referenzgen (hier *Gapdh*), das in allen Zellen ähnlich stark exprimiert wird, verglichen werden.

Sowohl für die RT-PCR mit SYBR-Green als auch für die Methode mit TaqMan wurde zunächst entsprechend der Tabelle 11 der jeweilige Master-Mix hergestellt und zu der vorgelegten cDNA in die PCR-Platte gegeben. Die verwendeten Primer bzw. Gene Assays sind Tabelle 10 zu entnehmen. Die Primer für eine RT-PCR mit der SYBRGreen-Methode sind mit reverse (r) und forward (f) gekennzeichnet. Nach kurzer Agitation zum Vermischen der Reagenzien, wurde die Platte für 5 min bei 1000 x g zentrifugiert, um sicherzugehen, dass die gesamte Flüssigkeitsmenge am Boden der Wells gesammelt war. Die PCR-Zyklen und die Messungen liefen im ViiA 7 Real-Time PCR System (SYBRGreen) bzw. im QuantStudio 5 Real-Time-PCR-System (TaqMan) nach den Standardeinstellungen der Geräte ab und die Auswertung erfolgte mit der ViiA7 Software bzw. der QuantStudio Design and Analysis Software.

Mit der oben erwähnten $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode wurde dann die relative Genexpression in den verschiedenen Proben berechnet. Zunächst wurde für jedes Gen jeder Probe die Differenz der CT-Werte des interessierenden Gens und des Referenz-Gens ermittelt, der ΔCT -Wert. Anschließend wurde für jedes interessierende Gen der ΔCT -Wert einer Referenzprobe vom ΔCT -Wert der interessierenden Probe subtrahiert, wodurch man den $\Delta\Delta CT$ -Wert erhielt. Dieser $\Delta\Delta CT$ -Wert wurde in die Formel $2^{-\Delta\Delta CT}$ eingesetzt, deren Ergebnis einen relativen Vergleich der Gen-Amplifikation erlaubt.

Tabelle 10 Primer-Sequenzen SYBRGreen / Gene Assay-Bezeichnungen TaqMan

Primer für das Gen	Sequenz (IDT technologies, DNA oligos für SYBRGreen)	Name (TaqMan)
murine <i>Bglap</i>	f: GCG CTC TGT CTC TCT GAC CT r: ACC TTA TTG CCC TCC TGC TT	Mm03410826_mH
murine <i>Gapdh</i>	f: ACT GAG CAA GAG AGG CCC TA r: TAT GGG GGT CTG GGA TGG AA	Mm03302249_g1
murine <i>Gfi1</i>		Mm00515853_m1
murine <i>Runx2</i>	f: TAA AGT GAC AGT GGA CGG TCC C r: TGC GCC CTA AAT CAC TGA GG	Mm00501584_m1
murine <i>Spp1</i>		Mm00436767-m1

Tabelle 11 Protokoll qRT-PCR

Assay	SYBRGreen		TaqMan	
	96	384	96	384
Well-Plate	96	384	96	384
Assay mix Power SYBRGreen Master Mix / TaqMan Gene Expression Master Mix	7 µl	4 µl	10 µl	5 µl
Primer	2 µl	1 µl	1 µl	0,5 µl
cDNA	5 µl	2 µl	2 µl	1 µl
Wasser	0	1 µl	7 µl	3,5 µl

2.8 ANALYSE DES MITOCHONDRIALEN STOFFWECHSELS

Die Messung des Sauerstoffverbrauches im Medium lässt auf die Funktion von Mitochondrien, genauer auf die mitochondriale Atmung schließen. Dafür wurde der Seahorse Extracellular Flux Analyzer und das Seahorse XF Cell Mitostress Test Kit nach dem Protokoll des Anbieters genutzt. Die MPSC wurden in Duplikaten bis Quadruplikaten in den 24-Well-Platten des Anbieters ausplattiert und am Folgetag bei etwa 70-90% Konfluenz in 525 µl Seahorse Medium (s. Tabelle 2) pro Well bei pH 7,4 und 37 °C unter Raumluft kultiviert. Der Seahorse-Einsatz (Cartridge), der über Nacht mit Kalibrierungs-Lösung bei 37 °C unter Raumluft inkubiert worden war, wurde mit Oligomycin, Carbonylcyanid-4-phenylhydrazon (FCCP) und Rotenon / Actinomycin A befüllt. Der Extrazellularfluss-Analysator Seahorse XFe 24 wurde mit der Cartridge und der die MPSC tragenden Wellplatte beladen. Zunächst wurde die Sauerstoffkonzentration im extrazellulären Medium gemessen und daran der Sauerstoffverbrauch der Zellen berechnet. Anschließend wurden nacheinander die Komponenten zugeführt, die die mitochondriale Atmung verändern und der Sauerstoffverbrauch wurde im Anschluss an jede Zuführung in drei Wiederholungen gemessen. Zunächst erfolgt die Gabe von 75 µl 1 µM Oligomycin, welches die ATP-Synthase blockt und somit die mitochondriale Atmung ausschaltet, gemessen wurde der Sauerstoffverbrauch durch das Protonenleck, den ATP-Synthase-unabhängigen Protonenfluss über die innere Mitochondrienmembran. Im nächsten Schritt wurden 75 µl 1 µM FCCP hinzugefügt. FCCP ist ein Entkoppler der Atmungskette. Protonen wurden über die innere Mitochondrienmembran transportiert und der Sauerstoffverbrauch stieg durch den kompensatorischen Anstieg des Elektronenflusses zur Aufrechterhaltung des Membranpotenzials. Dies simuliert die Reaktion der Mitochondrien auf erhöhten ATP-Bedarf und dient der Bestimmung der „Maximalen respiratorischen Reservekapazität“ der Mitochondrien. Zum Schluss wurden 75 µl 0,5 µM Actinomycin A und Rotenon appliziert. Hierdurch wurden Komplex III und I der Atmungskette gehemmt, also die mitochondriale Atmungskette und der dazu notwendige Sauerstoffverbrauch gestoppt. Die nicht-mitochondriale Zellatmung wurde gemessen. Die Auswertung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauches unter verschiedenen Bedingungen erfolgte jeweils über die Mittelwerte der dreifachen Messungen.

2.9 IMMUNFLUORESCENZ ZUM NACHWEIS VON γ H2AX

Die frühe Antwort auf Schädigung der DNA der MPSC wurde mittels γ -H2AX-Immunfluoreszenz-Färbung bestimmt. Beim Auftreten von DNA-Doppelstrangbrüchen (DDSB) wird ein Subtyp des Histon 2A, H2AX, durch eine PI3-Kinase an Serin-139 in der Region des DDSB phosphoryliert (γ H2AX = phosphoryliertes H2AX, (Rogakou et al., 1998)). Das dient der Rekrutierung von DNA-Reparatur-Proteinen wie 53RBP1 und MRE11. Das Protein 53RBP1 spielt eine Rolle beim Non Homologous End Joining, wohingegen MRE11 an der Initiierung der homologen Rekombination beteiligt ist. Nach erfolgreicher DNA-Reparatur wird das γ H2AX dephosphoryliert und somit wieder zum H2AX (Chowdhury et al., 2005; Paull et al., 2000). Das phosphorylierte Histon kann in permeabilisierten Zellen mit einem Fluoreszenzantikörper sichtbar gemacht werden. Die Messung von γ H2AX-Foci über einen Zeitverlauf ist daher eine verbreitete Methode zur Quantifizierung von DDSB und deren Reparatur.

$1,5 \cdot 10^5$ Zellen wurden über Nacht auf zuvor mit Ethanol und UV-Licht sterilisierten 12x12 mm Deckgläsern in 6-Well-Platten kultiviert. Am Folgetag bei etwa 50-60 % Konfluenz wurden die Platten mit 2 Gy bestrahlt, um DNA-Schäden hervorzurufen. Die unbestrahlte Kontrolle wurde ebenfalls mit in den Raum der Bestrahlungsmaschine genommen. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen zurück in den Inkubator gelegt. 30 min, 60 min und 120 min nach der Bestrahlung wurde jeweils ein Set mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS für 15 min fixiert. Die Permeabilisierung erfolgte mit 50 mM NH_4Cl für 10 min und IF-Puffer für weitere 10 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen mit AF488 anti- γ -H2AX-Antikörper 1:200 im IF-Puffer für eine Stunde inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS und dem Trocknen wurden die gefärbten Deckgläser mit DAPI-haltigem Mounting-Medium auf Objektträger gebracht. Die Präparate wurden mit dem Mikroskop LSM 710 in 400-facher Vergrößerung in Form von Z-Stacks mehrschichtig fotografiert und die γ -H2AX-Foci mit der Software IMARIS ausgezählt.

2.10 KNOCHEN-HISTOMORPHOMETRIE

2.10.1 Knochenhistologie – Paraffin-Einbettung

Das rechte Femur wurde grob von weichem Gewebe wie Muskeln gereinigt und 24 Stunden in gepuffertem vierprozentigem Formaldehyd fixiert und anschließend in EDTA über zwei Tage dekalzifiziert. Die dekalzifizierten Knochen wurden mit einem Skalpell in der Mitte der Diaphyse durchgeschnitten, um die Knochen für die Anfertigung von Querschnitten aufrecht in die Kassetten einzubetten. Die Einbettung, das Anfertigen der 5 μm dünnen Schnitte sowie die Färbung mit MG und HE erfolgten durch Mitarbeiterinnen des Gerhard-Domagk-Institutes für Pathologie in Münster. Ulrike Kelp der AG Tuckermann am Institut für molekulare Endokrinologie der Tiere in Ulm markierte auf einigen der Schnitte die Osteoklasten mit einer Tartrate-resistente Acid Phosphatase (TRAP)-Färbung.

Bei der Auswertung am Mikroskop Olympus BX53 wurden die Osteozytenkerne, die Knochenmarkinseln und die Gefäße im kortikalen Knochen pro Knochenanschnitt unter Benutzung des 40x-Objektives in den MG-gefärbten Querschnitten gezählt. Die TRAP-Schnitte wurden ebenfalls unter dem 40x-Objektiv ausgewertet. Mit dem 10x Objektiv wurden Fotos von den Präparaten angefertigt, anhand derer mit der Software Image J die Flächen des gesamten Knochenanschnittes und des Markraumes sowie die Porositäts-Flächen (Flächen ohne Knochengewebe innerhalb des kortikalen Knochens) ausgemessen wurden.

2.10.2 Knochenhistologie – Calcein-Färbung und MMA-Einbettung

Bei der Knochenbildung wird Calcium in den Knochen eingebaut. Dies kann mit dem Chelator Calcein sichtbar gemacht werden, der den Mäusen im Abstand von sechs Tagen zweimal intraperitoneal injiziert wurde. Nach Komplexbildung mit freiem Calcium wurde er in neu gebildete Knochenmatrix miteingebaut (Rahn & Perren, 1970). Um die Knochenbildungsrate (BFR, bone formation rate) anhand der Ablagerung von Calcein-Calcium-Komplexen nachweisen zu können, durfte der Knochen nicht dekalzifiziert werden. Damit dennoch Schnitte angefertigt werden konnten, musste der Knochen in hartem Material wie polymerisiertem Methylmethacrylat (MMA) eingebettet werden.

Auch hier wurde das rechte Femur verwendet. Das Skelett wurde bis auf die zur durchflusszytometrischen Analyse entnommenen linksseitigen Röhrenknochen (s.o.) mit teils noch anliegender Muskulatur über Nacht in Phosphat gepuffertem zehnpromzentigem Formalin fixiert. Diese Vorgehensweise ermöglichte zum einen die Nutzung der Wirbelkörper für Übungsschnitte und zum anderen eine schonende Weise, das Femur aus dem Hüftgelenk zu lösen. Am Folgetag wurde das fixierte Gewebe in 70-prozentigen Ethanol überführt. Die Femora wurden nach Einschneiden der Hüftmuskulatur unter Drehbewegungen aus der Gelenkpfanne gelöst und anschließend mechanisch von Weichgewebe gereinigt. Sie wurden bei 4 °C in Ethanol mit ansteigender Konzentration dehydriert: zunächst jeweils 24 Stunden in 85 % Ethanol und in 96 % Ethanol, zweimal zwölf Stunden und einmal 24 Stunden in 100 % Ethanol. Anschließend wurden die Knochen zweimal für 24 Stunden mit MMA-Infiltrationslösung (s. Tabelle 2) durchsetzt. Die infiltrierten Femora wurden aufrecht in ein 5 ml fassendes schmales Glasröhrchen gestellt und mit MMA-Einbettlösung (s. Tabelle 2) übergossen. Sobald das MMA auspolymerisiert war, wurde das Glas zerschlagen und die Plastikblöcke wurden herausgelöst. Die Blöcke wurden von Dr. Timur Yorgan der AG Schinke am Institut für Osteologie und Biomechanik in Hamburg in 12 µm dicke Präparate geschnitten. Für die Auswertung wurde die Software Osteomeasure genutzt. Bei Anregung mit Licht der Wellenlänge um 494 nm (Absorptionsmaximum) unter dem Fluoreszenzmikroskop emittiert der Calcein-Calcium-Komplex Licht mit einem Emissionsmaximum bei 517 nm. Die grün fluoreszierenden Linien wurden nachgezeichnet ebenso wie die Begrenzungen des kortikalen Knochens. Die Software

berechnete die BFR aus der Knochenoberfläche, auf der neuer Knochen gebildet wurde, und aus dem Abstand zwischen den beiden Calcein-Linien im Verhältnis zur Gesamtfläche des Knochens.

2.11 MICRO-COMPUTERTOMOGRAPHIE (μ CT) MURINER FEMORA

Auch hier wurde das Femur noch im Gelenk belassen und mit einem Großteil des Bewegungsapparates für 24 Stunden in zehnprozentigem Formalin fixiert und in 70 % Ethanol überführt. Das Lösen des Femurs aus dem Gelenk erfolgte analog zu dem o.g. Vorgehen. Das Femur wurde in 70 % Ethanol in Eppendorf-Tubes aufbewahrt. Die μ CT wurde von Dr. Y. Xiao am Center for Bone and Periodontal Research der McGill University mit dem SykScan 1172 durchgeführt.

2.12 AUSWERTUNG: STATISTIK UND DARSTELLUNG

Für die statistische und graphische Auswertung wurden Microsoft Excel und Graph Pad Prism 6 verwendet. Zunächst wurde unter Berücksichtigung des D'Agostino und Pearson Test ermittelt, ob eine Normalverteilung vorlag, jedoch wurde die endgültige Entscheidung unter den Gesichtspunkten des optischen Eindruckes bei graphischer Darstellung der Einzelresultate und der Anzahl der Replikate getroffen. Waren die Merkmale normalverteilt, wurden die einfache Varianzanalyse und als post-hoc-Test der Tukey-Test angewendet. Lag keine Normalverteilung vor, wurden stattdessen der Kruskal-Wallis-Test, anschließend der Dunn-Bonferroni-Test verwendet. Für den Vergleich zwischen zwei Gruppen wurden der Student's T-Test bei normalverteilten Werten und der Mann-Whitney-Test bei fehlender Normalverteilung eingesetzt. Aus der graphischen Darstellung sind entsprechend Mittelwert und Standardabweichung oder Median und Interquartilsabstand abzulesen. Das Überleben der Mäuse nach Transplantation wurde in Kaplan-Mayer-Kurven dargestellt und das Signifikanzniveau mit dem Log-Rank-Test berechnet. Eine Zuordnung der verwendeten Tests zu den jeweiligen Daten ist in Tabelle 14 Liste der verwendeten statistischen Tests im Anhang zusammengefasst. *In-vitro*-Experimente und Auswertungen der histologischen Schnitte wurden in Triplikaten bis Quintuplikaten ausgewertet, wobei die Datenanalyse mit dem Mittelwert für jedes biologische Replikat erfolgte.

Die statistischen Signifikanzniveaus entsprechen: * $p=0,01-0,05$; ** $p=0,001-0,0099$; *** $p<0,001$.

3.1 IN VITRO-EXPERIMENTE

3.1.1 Vorausgehende Daten

Die Projektidee für die vorliegende Doktorarbeit beruht auf den in Abschnitt 3.1.1 vorgestellten Daten, die von Dr. Yahya Al-Matary erhoben wurden (Y. S. A. Al-Matary, 2018). Eine erneute Auswertung erfolgte durch mich.

Wie oben beschrieben wurde eine erhöhte *GFII*-RNA Expression in murinen und humanen MSPC nach Kontakt zu Myelomzellen gesehen (D'Souza et al. 2011). Um zu erfahren, ob die *GFII*-Expression auch in der Stammzellnische von AML-Patienten verändert ist, wurde die *GFII*-RNA Expression von immortalisierten humanen mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen (MSPC) aus Knochenmarkspunktionen von Patienten nach durchflusszytometrischer Zellsortierung mittels qRT-PCR untersucht. In den AML-assoziierten MSPC zeigte sich eine dreifach erhöhte Expression von *GFII* im Vergleich zu MSPC von Patienten mit diffus-großzelligem B-Zell-Lymphom ohne Knochenmarksbefall (ctrl, $p=0,024$). Die Daten sind in relativen Werten zu dem Durchschnitt der Kontrolle, der auf eins gesetzt wurde, dargestellt (Abbildung 1 A).

Zur funktionellen Überprüfung, ob der Transkriptionsfaktor *Gfi1* in MSPC die Leukämieentwicklung unterstützt oder ihr entgegenwirkt, wurde eine Kokultur aus primären murinen MSPC oder AML-assoziierten MSPC (AMSPC) mit einer murinen AML-Zelllinie angelegt. Die AML wurde im Mausmodell durch das Fusionsgen *NUP98/HOXD13* hervorgerufen. Es wurden AMSPC aus leukämischen Mäusen mit einem *Gfi1*-KO sowie aus leukämischen Mäusen mit *Gfi1*-wt isoliert und kultiviert. Ebenso wurden MSPC aus *Gfi1*-KO und *Gfi1*-wt Mäusen ohne *NUP98/HOXD13*-Fusion - und somit ohne AML - kultiviert. Diese MSPC wurden bei ca. 80-prozentiger Konfluenz mit 100 000 Zellen der murinen AML-Zelllinie C1498-GFP⁺ für sechs Tage kokultiviert. Anschließend wurde die Zellzahl der C1498-GFP-Blasten durchflusszytometrisch gestützt bestimmt. Die Einzelkultur von C1498-GFP⁺ diente als Kontrolle. Nach Kokultur mit *Gfi1*-wt AMSPC wurden doppelt so viele C1498-GFP⁺ Zellen gezählt, nach Kokultur mit *Gfi1*-KO AMSPC waren es nur anderthalbmal so viele wie nach Einzelkultur. Die MSPC aus nicht-leukämischen Mäusen mit einem *Gfi1*-KO konnten im Gegensatz zu wt MSCP die Proliferation von C1498-GFP⁺ Zellen nicht steigern (Abbildung 1 B)

Die AMSPC von AML-Patienten wiesen also eine erhöhte Expression von *Gfi1* auf. Dessen Ausschalten führte *in vitro* zu einer geringeren proliferationssteigernden Wirkung der MSPC und AMSPC auf AML-Zellen.

Abbildung 1

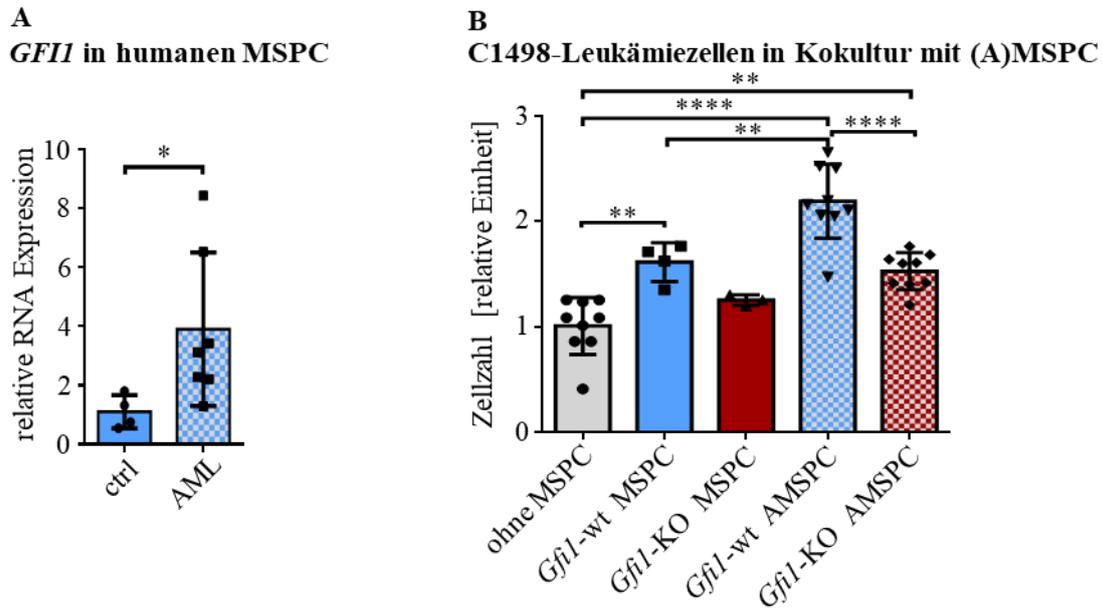


Abbildung 1: GFI1-Expression in humanen AMSPC und Einfluss der Gfil-Expression in murinen MSPC auf das Wachstum von Leukämiezellen (Daten von Dr. Yahya Al-Matary)

A RT-PCR: *GFI1* RNA-Expression in immortalisierten MSPC, die aus Lymphom-Patienten ohne KM-Befall (ctrl) oder aus AML Patienten isoliert wurden. **B** Anzahl der C1498 GFP Zellen nach Einzelkultur oder Kokultur mit murinen (A)MSPC mit *Gfil*-KO oder *Gfil*-wt ermittelt durch manuelle und FACS gestützte Zählung, normalisiert auf die Einzelkultur.

3.1.2 Charakterisierung der MSPC

Nach dem Nachweis der Relevanz von *Gfil* in humanen und murinen Stromazellen für die Stroma-Leukämie-Interaktion, sollten die in den folgenden Experimenten verwendeten Stromazellen auf Eigenschaften von MSC wie Adhärenz zu Plastikoberflächen, Differenzierungspotential in Adipozyten und Osteozyten sowie typische Oberflächenmarker überprüft werden (Dominici et al., 2006). Die Adhärenz zu Plastikoberflächen war bei den angezüchteten MSPC zu jeder Zeit zu beobachten (Abbildung 2 A). Für die osteogene Differenzierung wurden die murinen MSPC ab einer Konfluenz von 50 % für drei Wochen in Osteo-Differenzierungsmedium oder Standardmedium kultiviert. Nach den drei Wochen wurden die Zellen fixiert und mit Alizarin-Rot gefärbt, welches Calcium-Ablagerungen der Osteozyten ziegelrot färbt. In allen Ansätzen der in Osteo-Differenzierungsmedium kultivierten murinen MSPC waren Calcium-Ablagerungen als Nachweis von Osteoblastenaktivität zu sehen, jedoch in unterschiedlicher Häufigkeit (Abbildung 2 B). Die adipogene Differenzierung wurde mit adipogenem Differenzierungsmedium von StemXVivo bei 70 % Konfluenz der MSPC induziert. Nach drei Wochen wurden die Zellen in Formalin fixiert und die Fettvakuolen mit Oil Red O Lösung gefärbt. In jedem Ansatz waren nach Differenzierungsinduktion Adipozyten zu sehen, jedoch auch hier in unterschiedlicher Häufigkeit (Abbildung 2 C).

In beiden Differenzierungsassays waren neben den rotgefärbten Bereichen der Osteoblasten bzw. Adipozyten auch ungefärbte, meist spindelförmige Zellen zu sehen. Folglich enthielten die Ansätze unterschiedlich große Anteile mesenchymaler Stromazellen, die schon eine bestimmte Differenzierung eingeschlagen hatten. Daher trifft die Bezeichnung Mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen (MSPC) auf die verwendeten Zellpopulationen zu.

Abbildung 2

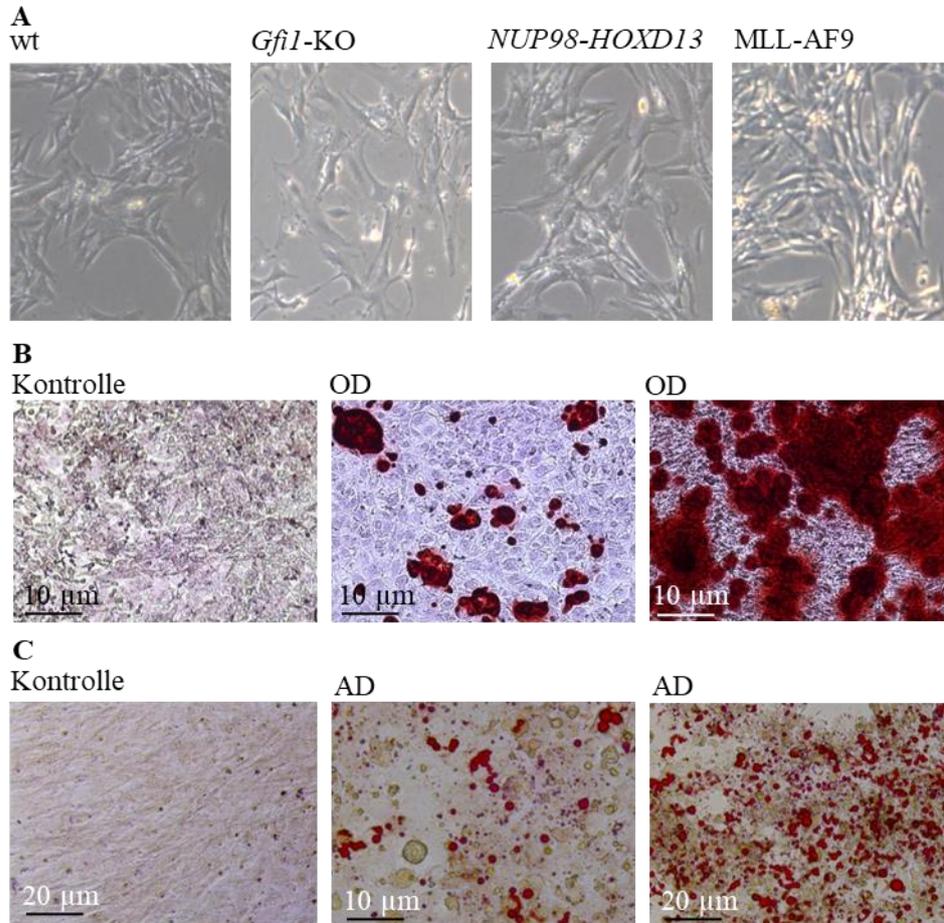


Abbildung 2: Charakterisierung der MSPC mittels Mikroskopie

A Fotos der kultivierten MSCP aus wt, *Gfi1*-KO, *NUP98-HOXD13* transgenen und MLL-AF9 transplantierten Mäusen zum Nachweis der Adhärenz in 400-facher Vergrößerung. **B** Fotos des osteogenen Differenzierungsassays (OD). **C** Fotos des adipogenen Differenzierungsassays (AD)

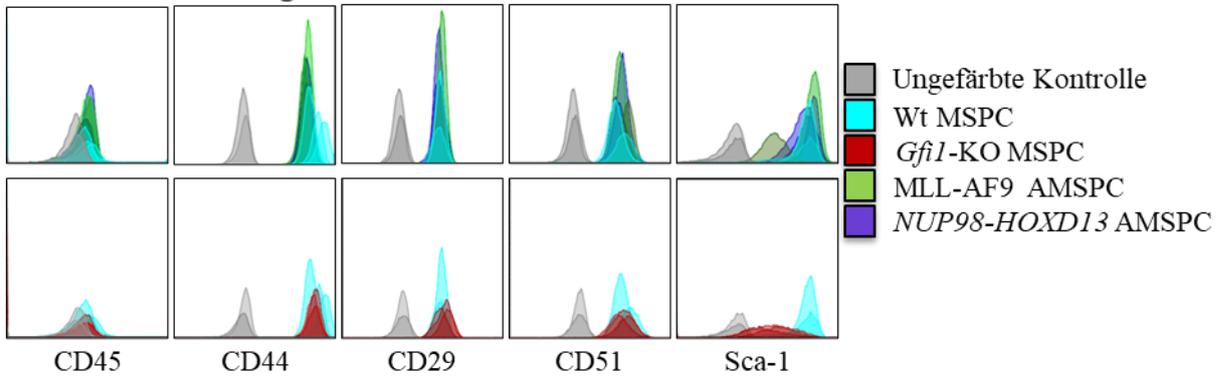
Die Oberflächenmarker sind für murine MSC nicht einheitlich definiert (Dominici et al., 2006). Folgende Antigene werden in mehreren Publikationen als Positiv-Marker aufgeführt: CD44, Stem cell antigen 1 (Sca-1), CD51 und CD29 (Nadri et al., 2007; Sung et al., 2008). Alle angezüchteten murinen MSPC waren positiv für CD44, CD29, CD51 und Sca-1 und negativ für den hämatopoetischen Marker CD45 (Abbildung 3 A-B). Dabei fiel auf, dass die Mittlere Fluoreszenz Intensität für den Oberflächenmarker Sca-1 auf den *Gfi1*-KO MSPC deutlich niedriger war als auf den wt MSPC (Abbildung 3 B). Sca-1 ist ein Marker, der auf verschiedenen Stamm- und

Vorläuferzellen wie HSC aber auch MSC exprimiert wird (Hamidouche et al., 2017; Schepers et al., 2013).

Abbildung 3

A

MSPC-Marker Histogramme



B

MSPC-Marker - MFI

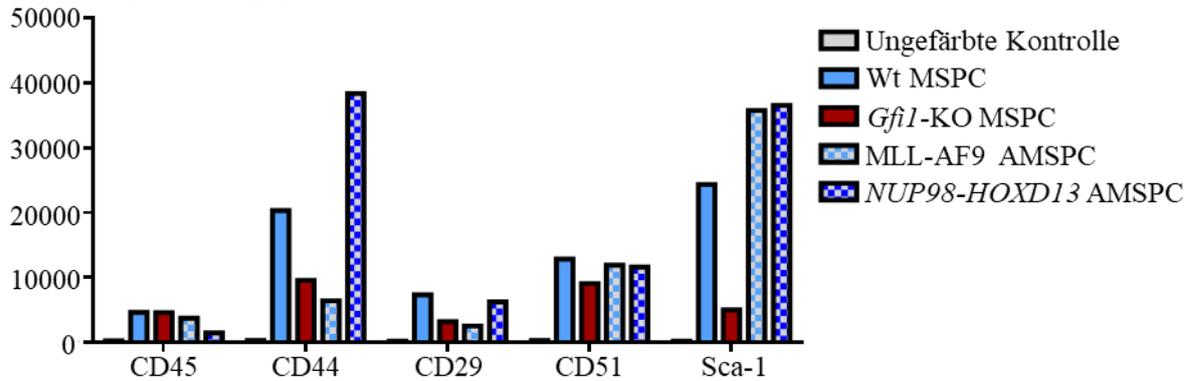


Abbildung 3: Charakterisierung der MSPC mittels Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrie der MSPC für Oberflächenmarker von HSC (CD45) und MSC (CD29, CD44, Sca-1, CD51). **A** Histogramme: Grau dargestellt ist die ungefärbte Kontrolle, farbige dargestellt sind die verschiedenen Zelllinien des jeweiligen Genotyps (siehe Legende). **B** Mittlere Fluoreszenzintensität für die Oberflächenmarker CD45, CD44, CD29, CD51 und Sca-1; Median für die jeweiligen MSPC Gruppen (siehe Legende).

3.1.3 Genexpression der MSPC vor und nach Osteodifferenzierungsassay

Nach dem oben beschriebenen osteogenen Differenzierungsassay (Kapitel 3.1.2) wurde mit in Zellkultur-Flaschen kultivierten MSPC eine qRT-PCR durchgeführt. Aus den Zellen wurde nach drei Wochen Kultur in osteogenem Differenzierungsmedium (OD) oder in Kontrollmedium RNA isoliert und mit dieser RNA eine qRT-PCR durchgeführt. Dabei wurde die Expression folgender Gene ermittelt: *Gfi1*, *Runx2*, *Spp1* (codiert für Osteopontin) und *Bglap* (codiert für Osteocalcin). Die relative Expressionshöhe bezieht sich auf den Mittelwert der wt MSPC der Kontroll-Gruppe. In einem Ansatz von *MLL-AF9* AMSPC wurden bei mehreren Genen um den Faktor 100 bis 1000 erhöhte Expressionslevel, sowohl mit als auch ohne Osteodifferenzierung gemessen. Dieser Ausreißer wurde von der Auswertung ausgeschlossen.

Die MSCP aus *Gfi1*-KO-Mäusen exprimierten *Gfi1* nicht, zwischen den anderen Gruppen gab es keinen signifikanten Unterschied in der *Gfi1*-Expression (Abbildung 4 A).

In der Gruppe der *MLL-AF9*-tg AMSPC war eine zu große Streuung zu beobachten, um sie sinnvoll mit den anderen Gruppen zu vergleichen.

Die *Runx2*-Expression war in wt und *Gfi1*-KO MSCP etwa gleich hoch, in *NUP98-HOXD13*-tg AMSPC betrug sie weniger als ein Fünftel davon (Abbildung 4 B).

Die MSCP exprimierten unterschiedlich stark *Spp1*, mit großer Streuung. Die *Spp1*-Expression war in *Gfi1*-KO MSCP im Median doppelt so hoch und in *NUP98-HOXD13* AMSPC viermal so hoch wie in den wt MSCP (ns; Abbildung 4 C).

Bezüglich der *Bglap*-Expression gab es unter den *Gfi1*-KO MSCP einen starken Ausreißer nach oben, in den übrigen Ansätzen glich die Expression ungefähr derer im wt. Die *NUP98-HOXD13*-tg AMSPC hingegen exprimierten nur ein Bruchteil davon (Abbildung 4 D).

Es wurde auch die Differenz der Genexpression nach Osteodifferenzierungsassay zu der nach Kultur ohne Induktoren für die Osteogenese betrachtet. Hierbei fiel auf, dass wt MSCP nach der Osteodifferenzierung etwas mehr *Gfi1* exprimierten, wohingegen die *Gfi1*-Expression in AML-assoziierten MSCP sowohl mit *MLL-AF9*- als auch in *NUP98-HOXD13*-transplantierten Mäusen mit der osteogenen Differenzierung abnahm (Abbildung 4 E). Bezüglich der *Runx2*-Expression war nur in zwei von vier *MLL-AF9* AMSPC eine Steigerung durch die Osteodifferenzierung zu beobachten, in den meisten Fällen änderte sich die *Runx2*-Expression kaum (Abbildung 4 F).

Bei allen MSCP außer den *Gfi1*-KO MSCP war nach Osteodifferenzierung im Median ein Anstieg der *Spp1*-Expression um das drei- bis sechsfache zu beobachten (ns), hier gab es eine große Streuung der Werte (Abbildung 4 G).

In *MLL-AF9* AMSPC und wt MSCP kam es zu einem leichten Anstieg der Osteocalcin-Expression, in *Gfi1*-KO MSCP und *NUP98-HOXD13* AMSPC war die Osteocalcin-Expression nach Kultur im Osteodifferenzierungsmedium im Median unverändert bzw. sogar reduziert.

Abbildung 4

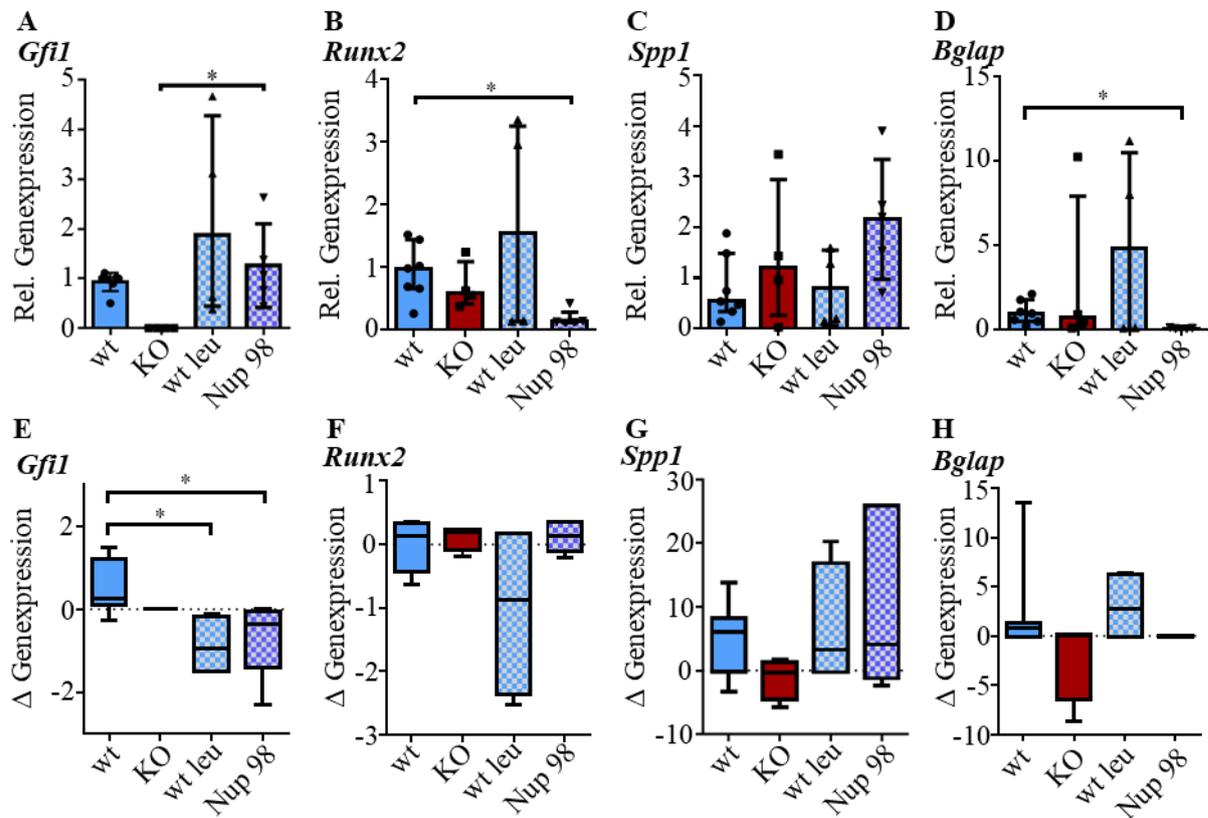


Abbildung 4: Genexpression der MSPC im Osteodifferenzierungsassay

A-D: Ergebnisse aus der RT-PCR von murinen MSCs aus wt Mäusen, *Gfi1*-KO-Mäusen (KO), *MLL-AF9*-transplantierten wt Mäusen (wt leu) und Nup98-HOXD13 transgenen Mäusen mit AML (Nup98): Relative Genexpression von **A** *Gfi1*, **B** *Runx2*, **C** Osteopontin (*Spp1*) **D** Osteocalcin (*Bglap*). **E-H:** Differenz (Δ) der Genexpression nach Kultivierung in Osteo-Differenzierungs-Medium (OD) zur Kontrolle: **E** *Gfi1*, **F** *Runx2*, **G** Osteopontin (*Spp1*) **H** Osteocalcin (*Bglap*)

3.1.4 Mitochondriale Funktion der MSPC in vitro

Leukämische Blasten wirken sich nicht nur auf die Differenzierung von Stromazellen aus, sondern auch auf den Metabolismus der MSPC, beispielsweise durch eine Hyperpolarisation des mitochondrialen Potentials, die zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führt (Zambetti et al., 2016) oder durch Transfer von mesenchymalen Mitochondrien auf Leukämiezellen (Moschoi et al., 2016). Als globaler Test für die mitochondriale Funktion wurde der extrazelluläre Sauerstoff (O_2)-Fluss mit dem Seahorse-System von Agilent gemessen.

MSPC von wt und *Gfi1*-KO Mäusen ohne Leukämie wurden für eine Woche mit Lin^- KM-Zellen von gesunden Mäusen oder mit Leukämiezellen aus *MLL-AF9*-transplantierten Mäusen (leu) kokultiviert. Anschließend wurden die MSPC mittels FACS von den KM-Zellen getrennt und für den Assay ausplattiert. Am Folgetag wurde bei 70- bis 90- prozentiger Konfluenz der Mitostress-Assay durchgeführt (Abbildung 5 A). Die ersten drei Messwerte zum O_2 -Verbrauch wurden vor

medikamentöser Beeinflussung der Atmungskette erhoben und zeigen die basale mitochondriale Atmung. Nach Gabe von Oligomycin, welches die ATP-Synthase blockiert, wurde der O₂-Verbrauch des Protonenlecks gemessen und durch den Entkoppler FCCP wurde die Reaktion der Mitochondrien auf einen erhöhten ATP-Bedarf simuliert (Abbildung 5 B). Die Differenz zwischen der basalen mitochondrialen Atmung und diesem maximalem O₂-Verbrauch wird als respiratorische Reservekapazität bezeichnet.

Die basale Atmung war bei allein kultivierten wt MSPC höher als bei KO MSPC. Die Kokultur der MSPC mit Lin⁻ KM-Zellen zeigte keinen Effekt auf die basale mitochondriale Atmung der wt MSPC und nach Kontakt mit AML-Zellen gab es ebenfalls keinen signifikanten Unterschied, jedoch kam es tendenziell zu einer Absenkung des basalen O₂-Verbrauches. Auch nach Kokultur der *Gfi1*-KO MSPC mit Lin⁻ KM-Zellen oder Leukämiezellen unterschied sich die basale mitochondriale Atmung nicht signifikant von der *Gfi1*-KO MSPC in Einzelkultur (Abbildung 5 C). Die mitochondriale respiratorische Reservekapazität war bei den *Gfi1*-KO MSPC geringer als beim wt ($163,1 \pm 17,5$ % vs. 72 ± 34 %, ns). Außerdem fiel auf, dass die wt MSPC nach Kokultur mit Lin⁻ KM-Zellen oder AML-Zellen eine deutlich niedrigere respiratorische Reserve aufwiesen als nach Einzelkultur. Bei den *Gfi1*-KO MSPC änderte sich die respiratorische Reservekapazität durch die Kokultur nicht (Abbildung 5 D).

Zusammenfassend hatten *Gfi1*-KO MSPC eine geringere basale mitochondriale Atmung und eine geringere respiratorische Reservekapazität als wt MSPC. Durch Kokultur mit Lin⁻ Zellen und AML-Zellen wurde die respiratorische Reservekapazität der wt MSPC gesenkt, nicht aber die der *Gfi1*-KO MSPC. Ein Unterschied zwischen der Wirkung von Lin⁻ Zellen und AML-Zellen auf die mitochondriale Atmung der MSPC war nicht zu beobachten.

Abbildung 5

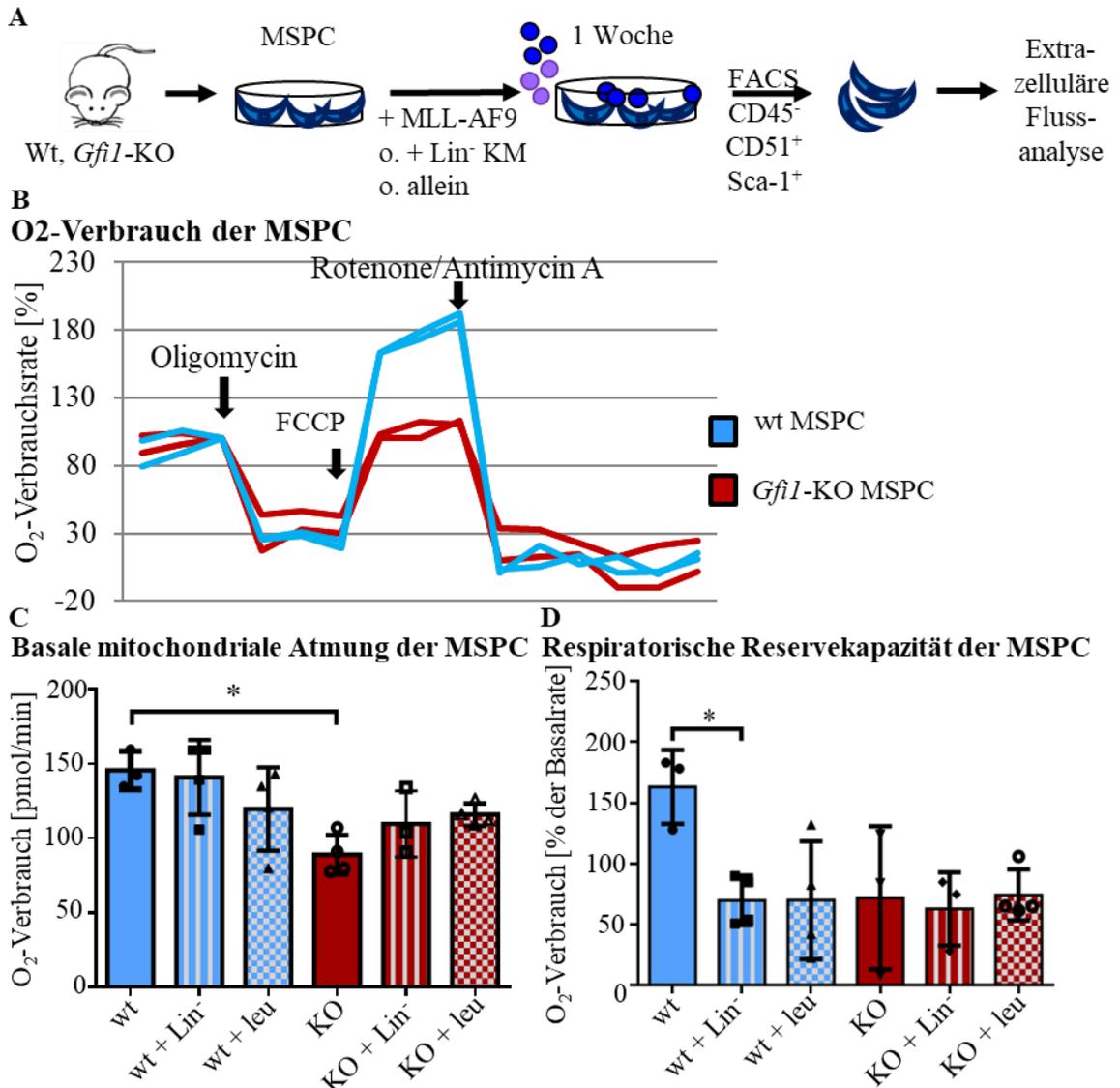


Abbildung 5: Mitochondriale Funktion der MSC in vitro

Extrazelluläre Fluss-Analyse zur Untersuchung der mitochondrialen Atmung **A** MSC von *Gfi1*-KO (KO) oder wt Mäusen wurden eine Woche allein oder mit Lin⁻ oder leukämischen KM-Zellen (leu) kokultiviert und im Anschluss durch FACS von den KM-Zellen getrennt.

B Sauerstoffverbrauch der Zellen aus Einzelkultur im Zeitverlauf unter Gabe von Oligomycin, FCCP und Rotenon/ Antimycin A. **C** Basale mitochondriale Atmung vor der Applikation von Oligomycin. **D** Respiratorische Reservekapazität der Mitochondrien im Verhältnis zur basalen Atmung.

Die Punkte repräsentieren die Mittelwerte von Triplikaten bis Pentuplikaten einzelner Experimente mit verschiedenen Primärzelllinien.

3.1.5 γ H2AX - DNA-Schäden und DNA-Reparatur

In einem Mausmodell des Schwachman-Bodian-Diamond Syndroms wurde gezeigt, dass Veränderungen in MSPC nicht nur die mitochondriale Funktion beeinflussen, sondern auch eine Aktivierung von DNA-Reparatur-Mechanismen in hämatopoetischen Zellen auslösen können (Zambetti et al., 2016). Bekannt ist auch, dass DDSB eine Rolle in der Entwicklung einer AML, insbesondere der Therapie-assoziierten Form, spielen (Jacoby et al., 2014). Es sollte daher evaluiert werden, ob der Einfluss von AML-Blasten die DNA-Reparatur in MSPC verändert und ob in der AML-Nische ebenfalls vermehrt DDSB auftreten. Dafür wurde mittels γ H2AX-Fluoreszenzmikroskopie die Dynamik der DNA-Reparatur in MSPC betrachtet.

Nach Einzelkultur der MSPC bzw. einwöchiger Kokultur mit Lin⁻ KM-Zellen oder AML-Zellen und anschließender Isolierung der MSPC mittels FACS analog zum in Abschnitt 3.1.4 beschriebenen Vorgehen wurden die MSPC auf Objektträgerdeckplättchen in 6er-Wellplatten ausplattiert und über Nacht auf etwa 60 % Konfluenz wachsen gelassen. Die MSPC wurden, außer den Kontroll-Ansätzen (0 Gy), mit 2 Gy bestrahlt. Die MSPC wurden 30 min, eine Stunde bzw. zwei Stunden nach der Bestrahlung mit vierprozentigem PFA fixiert. Anschließend wurden die Zellkerne mit DAPI und die bei DDSB phosphorylierten γ H2AX-Histone mit einem Fluoreszenzmarker gefärbt. In Abbildung 6 sind exemplarische fluoreszenzmikroskopische Bilder der MSPC aus den Einzelkulturen zu sehen.

Abbildung 6

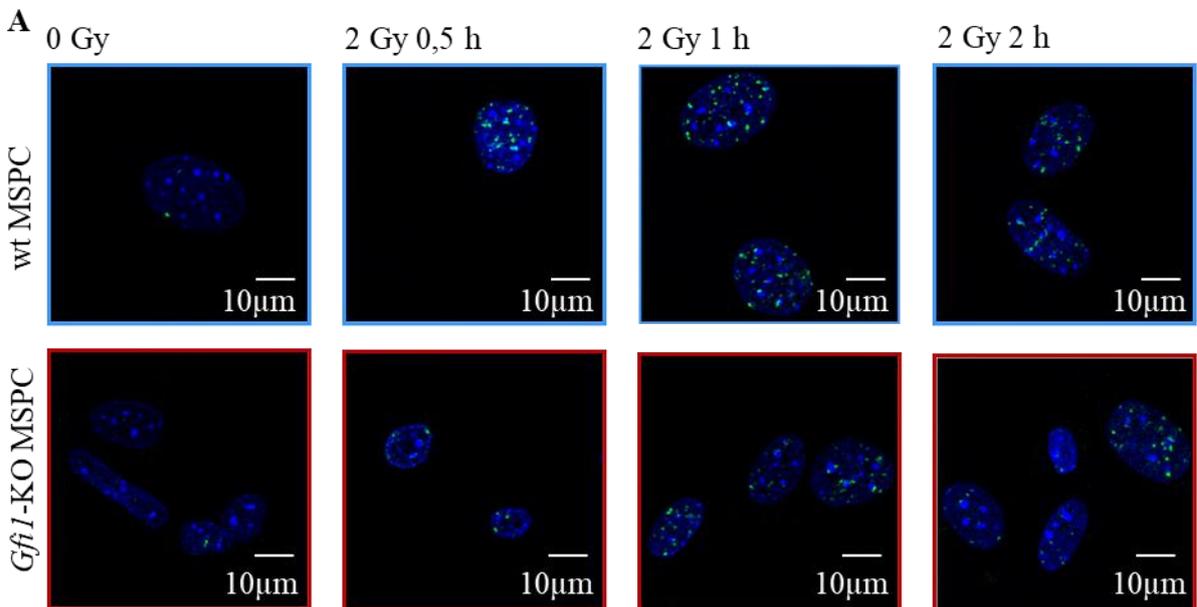


Abbildung 6: DNA-Reparatur der MSPC – Fotos der γ H2AX Foci

A Fluoreszenzmikroskopische Bilder der MSPC aus Einzelkultur

Für die Darstellung der Foci-Anzahl pro Zelle in Abbildung 7 erfolgte eine Einteilung in folgende Gruppen: Zellen, die keine Foci aufwiesen (hellgrau), Zellen mit einem bis vier Foci (blau), Zellen mit fünf bis 19 Foci (dunkelgrau), Zellen mit 20 oder mehr Foci (rot). Die Häufigkeitsverteilung

dieser Gruppen sind für jede Bedingung (Genotyp, Kulturbedingung, Zeitpunkt nach Bestrahlung) in einer Säule zusammengefasst.

Abbildung 7 A und B ist zu entnehmen, dass einige MSPC aus Einzelkultur sowie die AMSPC schon ohne Bestrahlung DNA-Schäden aufwiesen, nur 40-50% der Zellen waren frei von γ H2AX-Foci. Hingegen wiesen nach Kokultur mit murinen primären Lin⁻ KM-Zellen weniger als ein Viertel der Zellen Foci auf. Die Kokultur mit Lin⁻ Zellen schien unabhängig vom Genotyp protektiv auf die unbestrahlten MSPC zu wirken.

In allen Fällen war 30 min nach Bestrahlung ein deutlicher Anstieg der DDSB zu beobachten. Bei den wt MSPC aus Kokultur mit Lin⁻ KM-Zellen stieg die Foci-Anzahl deutlich weniger an. Hingegen erhöhte bei den Gfi1-KO MSPC die Kokultur mit Lin⁻ KM-Zellen die Anzahl der Zellen mit hohen DNA-Schäden (Abbildung 7 A und B).

Die Geschwindigkeit der DNA-Reparatur in wt MSPC war nach Kokultur mit AML-Blasten deutlich geringer als bei Einzelkultur oder nach Kokultur mit Lin⁻ Zellen. Während bei den wt MSPC die Fraktion mit mehr als 20 Foci in der ersten Stunde nach Bestrahlung halbiert wurde, war dies bei den AMSPC erst in der zweiten Stunde nach Induktion von DNA-Schäden zu sehen (Abbildung 7 C).

Bei den Gfi1-KO MSPC aus Einzelkultur war eine Stunde nach Bestrahlung eine deutliche Reduktion der Foci zu sehen. Hier war jedoch kein Plateau erreicht, stattdessen verringerte sich in der zweiten Stunde auch der Anteil an Zellen mit mehreren Foci zugunsten der Zellen mit wenigen oder gar keinen Foci. Die DNA-Reparatur schien folglich langsamer abzulaufen als in wt MSPC. Dafür waren nach 2 Stunden bei den Gfi1-KO MSPC weniger Foci zu sehen als bei den wt MSPC. Hervorzuheben ist außerdem, dass bei den Gfi1-KO MSPC die Kokultur mit AML-Blasten die DNA-Reparatur nicht zu beeinträchtigen schien (Abbildung 7 C). Stattdessen sank die Foci-Anzahl bei Gfi1-KO MSPC nach Kokultur mit Lin⁻ Zellen über den zweistündigen Beobachtungszeitraum am geringsten (Abbildung 7 B).

Zusammenfassend hielt bei allen *Gfi1*-KO MSPC der Rückgang der Foci-Anzahl stetig bis zwei Stunden nach Bestrahlung an, es wurde bis zu diesem Zeitpunkt kein Plateau erreicht. Ebenso verhielt es sich mit den wt MSPC nach Kokultur mit Leukämiezellen. Bei den wt MSPC aus Einzelkultur und aus Kokultur mit Lin⁻ Zellen hingegen stagnierte der Rückgang der Foci nach der ersten Stunde nach Bestrahlung, hier lief die DNA-Reparatur rascher ab. Meist zeigten *Gfi1*-KO MSPC im direkten Vergleich zum wt weniger γ H2AX-Foci.

Eine Übersicht über die Signifikanzniveaus im Kruskal-Wallis und Dunn-Bonferroni-Test bei Vergleich der medianen Foci-Zahl zum jeweiligen Zeitpunkt findet sich im Anhang in Tabelle 15.

Abbildung 7

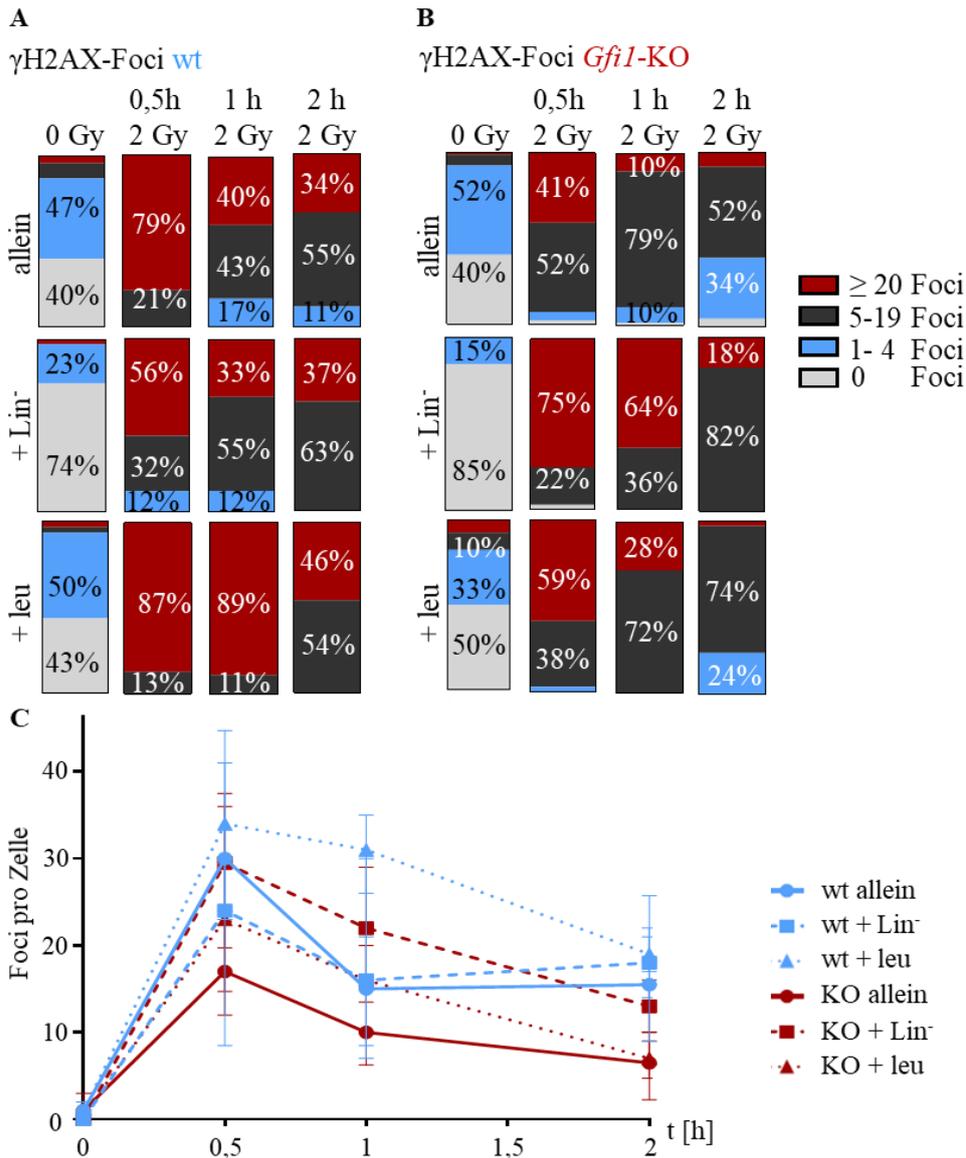


Abbildung 7: DNA-Reparatur in wt und *Gfi1*-KO MSC und AMSC

A-B Häufigkeitsverteilung von MSC mit 0, 1-4, 5-19 oder ≥ 20 γ H2AX-Foci pro Zelle für wt MSC (A) und *Gfi1*-KO MSC (B) in unbestrahlten MSC (0) und 0,5 h, 1 h sowie 2 h nach Bestrahlung mit 2 Gy nach Einzelkultur oder Kokultur mit Lin⁻ KM-Zellen oder MLL-AF9 KM-Zellen (leu).
C Andere Darstellungsweise: Median und Interquartilsabstand der Anzahl an γ H2AX-Foci pro Zelle.

3.2 IN VIVO EXPERIMENTE

3.2.1 Durchflusszytometrie des Gewebes langer Röhrenknochen - Methodvalidierung

Für die Untersuchung der Zusammensetzung der ossären KM-Nische im Mausmodell wurde eine Modifikation einer bereits beschriebenen Methode zur durchflusszytometrischen Analyse zellulärer Bestandteile langer Röhrenknochen genutzt (Schepers et al., 2013; Winkler et al., 2010). Diese Methode wurde zunächst an weiblichen wt-Mäusen verschiedenen Alters getestet. In den Kapiteln

2.3.2 und 2.4 ist das Vorgehen ausführlich beschrieben. Kurzgefasst wurden Tibiae, Femora und Humeri zur Entfernung des Knochenmarkes gespült, außerdem mechanisch vom Weichteilgewebe befreit und mit Mörser und Stößel zerkleinert. Die Knochenstücke wurden für eine Stunde bei 37 °C mit 3 mg/ml Kollagenase I inkubiert (Abbildung 8 A). Mit folgenden Fluoreszenz-Markern wurden die einzelnen Populationen per Durchflusszytometrie unterschieden: Stromazellen (Stroma; CD45⁺ Lin⁻), deren Unterpopulationen EC [CD31⁺] und Nicht-Endotheliale Zellen (NEC; CD31⁻), sowie als Unterpopulation der NEC die MSPC (CD51⁺ Sca-1⁺) und OBC (CD51⁺ Sca-1⁻; Abbildung 8 B). Es konnte eine signifikante altersabhängige Reduktion der Stromazellzahl und der Anzahl der OBC im Knochen der weiblichen Mäuse festgestellt werden (Abbildung 8 C-D).

Abbildung 8

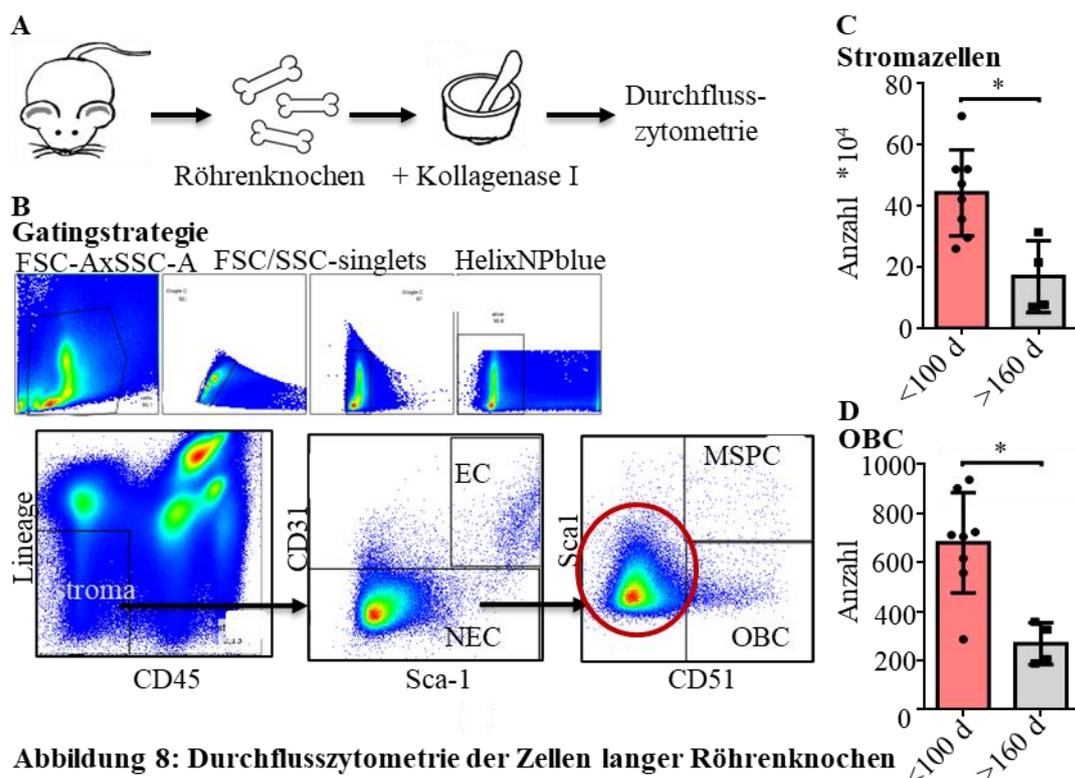


Abbildung 8: Durchflusszytometrie der Zellen langer Röhrenknochen

A Aufbereitung der Knochen für die Durchflusszytometrie. Durchgespülte und gesäuberte Knochen wurden mit dem Mörser zerkleinert und eine Stunde mit Kollagenase I inkubiert. **B** Gating-Strategie: Singletten, Lebendfärbung, Stroma: CD45⁺ Lin⁻, davon nicht-endotheliale Zellen (NEC): CD31⁻, davon OBC: CD51⁺ Sca-1⁻ & MSPC: CD51⁺ Sca-1⁺. **C** Anzahl an Stromazellen & **D** OBC in Knochen weiblicher Mäuse unterschiedlichen Alters.

Unter den NEC waren die meisten Zellen weder Sca-1⁺ noch CD51⁺ und durch die verwendeten Antikörper nicht eindeutig definiert (Abbildung 9 B). Daher wurden diese Sca-1⁻ CD51⁻ Population der NEC für die Anfertigung von Zytospins sortiert. Die Zytospins zeigten, dass die Population einige Knochenfragmente (*) enthielt (Abbildung 9 A-B). Außerdem waren frühe Zellen der erythroiden Reihe sichtbar wie Normozyten und Erythroblasten (Abbildung 9 A-D★). Des Weiteren

waren neutrophile Granulozyten (◄) und myeloische Vorläuferzellen (●) zu sehen (Abbildung 9 C-D).

Somit konnte die Methode zur Untersuchung der Zusammensetzung der ossären Nische validiert werden, jedoch mit der Einschränkung, dass verschiedene Messungenauigkeiten vorliegen.

Abbildung 9

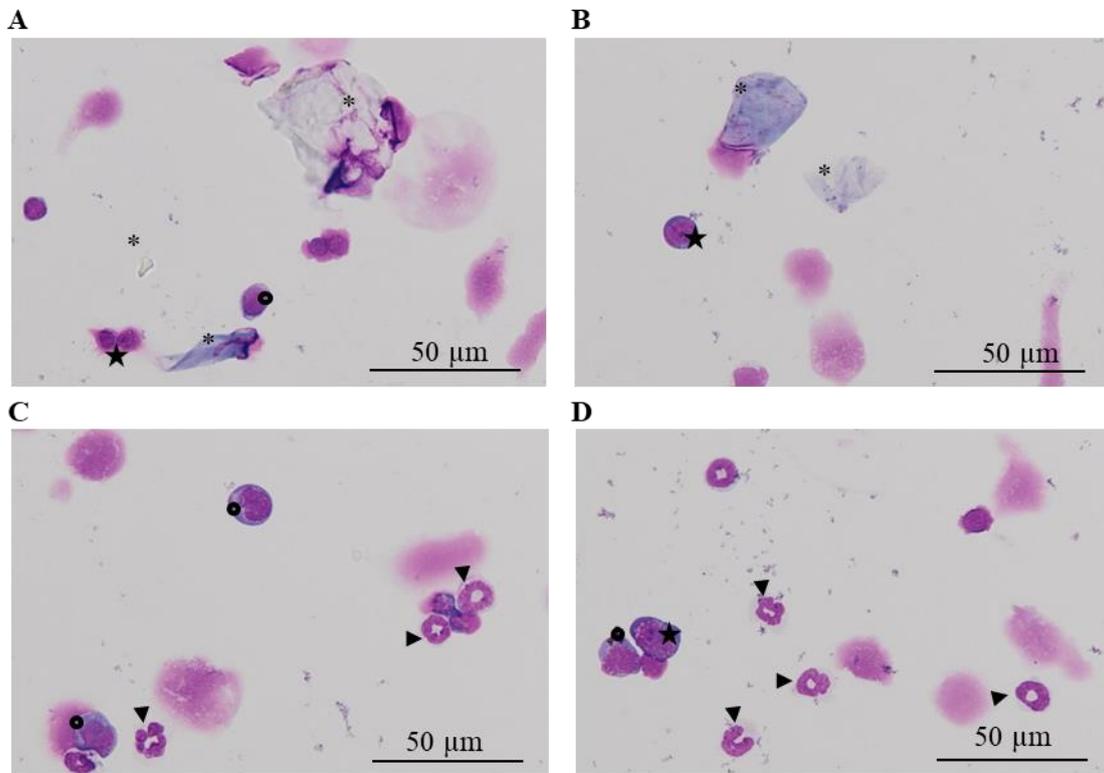


Abbildung 9: Durchflusszytometrie des Gewebes langer Röhrenknochen – Mikroskopie der Sca1⁻ CD51⁻ NEC-Population

Zytospin aus CD51⁻ Sca1⁻ NEC gesorteten Zellen zeigten in **A-B** Knochenfragmente (*) und erythroide Vorläuferzellen (★) und in **D-E** Neutrophile (◄) und myeloische Vorläuferzellen (●).

3.2.2 Reduktion und Ausschalten von *Gfil* erhöhen OBC-Zahl in murinen Knochen

Mit der oben beschriebenen Methode zur durchflusszytometrischen Untersuchung von Zellpopulationen aus Röhrenknochen wurden nun Unterschiede zwischen Mäusen mit unterschiedlicher Expression von *Gfil* analysiert. Untersucht wurden wt Mäuse, *Gfil*-KO Mäuse und Mäuse mit einem Knockdown (KD) oder Knockin (KI) des humanen *GFII* (36S) sowie mit KI der in HSC an der Entwicklung myeloproliferativer Neoplasien beteiligten Genvariante *GFII* 36N (Karsunky et al., 2002; Khandanpour et al., 2012).

Der Anteil der Zellen der OBC an den Stromazellen lag bei den *Gfil*-KO Mäusen im Schnitt fast doppelt so hoch wie bei den wt Mäusen. Deren Anteil war beim Knockdown von humanen GFII (36S KD) gegenüber dem Knockin (36S KI) ebenfalls erhöht, wenngleich der Unterschied zwischen KO und wt stärker war (Abbildung 10 A). Bei Betrachtung absoluter Zellzahlen wiesen *Gfil*-KO

Mäuse sogar um den Faktor 3,3 mehr OBC auf als der wt. Im Vergleich mit 36S-KI-Mäusen wiesen sowohl *Gfi1*-KO Mäuse als auch *GFI1*-KD-Mäuse dreimal so viele OBC auf (Abbildung 10 B). Ein Unterschied zwischen Mäusen mit Expression von murinem *Gfi1* und humanem *GFI1* bezüglich der OBC-Anzahl oder des OBC-Anteils war nicht zu beobachten, ebenso wenig für *GFI1* 36N.

Die partielle und komplette Suppression von murinem und humanem *Gfi1* erhöhte also die Anzahl der OBC in den Röhrenknochen gesunder Mäuse.

Bezüglich der Anzahl der Stromazellen (CD45⁺Lin⁻) und des Anteils der MSPC (Sca-1⁺CD51⁺) am Stroma waren bei einer großen Streuung keine Unterschiede zwischen den Mausstämmen mit verschiedener *Gfi1*/*GFI1*-Expression zu sehen (Abbildung 10 C-D).

Abbildung 10

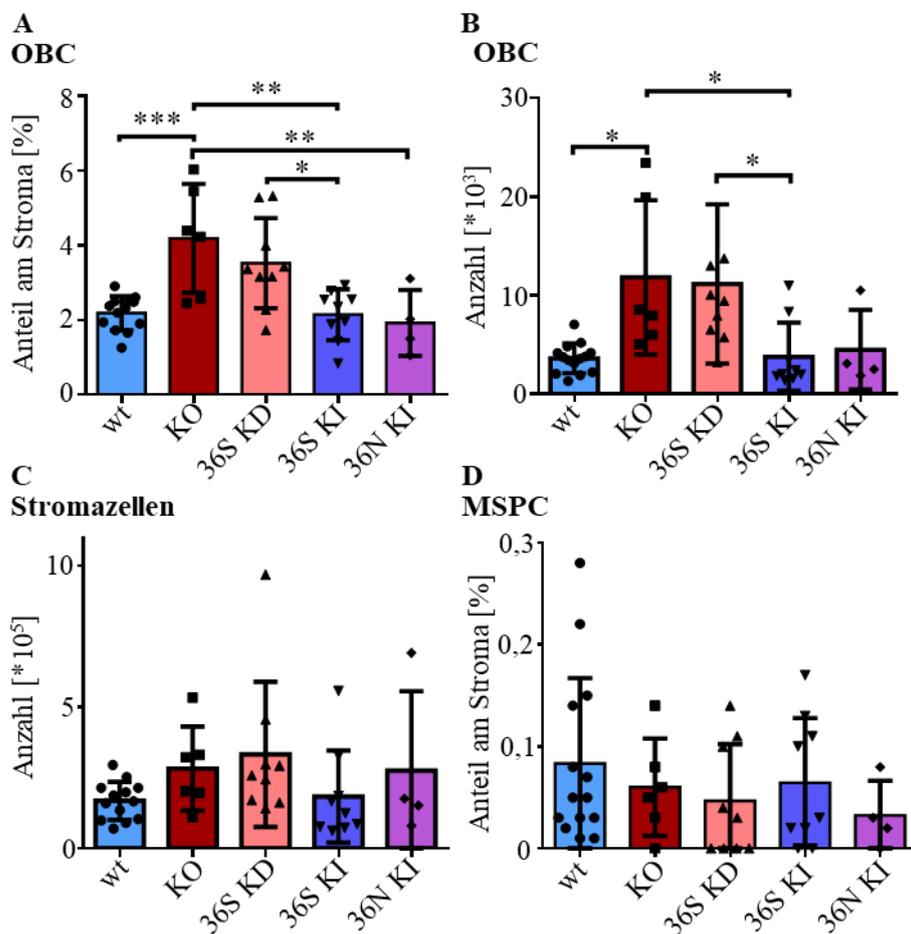


Abbildung 10 Durchflusszytometrische Analyse der Zellpopulationen langer Röhrenknochen von Mäusen mit unterschiedlicher *Gfi1*-Expression

A Anteil osteoblastischer Zellen (OBC) an allen Stromazellen, **B** Anzahl der OBC, **C** Anzahl der Stromazellen in allen Röhrenknochen und **D** Anteil der MSPC an der Stromapopulation.

3.2.3 Induktion von AML in wt und *Gfi1*-KO Mäusen

Nachdem die Wirkung des *Gfi1*-KO in gesunden Mäusen betrachtet wurde, wurde die Wirkung dieses Knockouts in der mesenchymalen Nische an AML-erkrankter Mäuse mittels des folgenden *in vivo* Modells beleuchtet. Nach der oben ausführlich beschriebenen Methode (s. Kapitel 2.4.1) wurde mit dem Fusionsgen *MLL-AF9* eine AML in wt und *Gfi1*-KO Mäusen induziert. Murine KM-Zellen wurden mit dem Onkogen *MLL-AF9* viral transduziert und in mit 10 Gy bestrahlte Mäuse transplantiert. Diesen wurde nach Entwicklung einer Leukämie KM-Zellen entnommen, die wiederum in mit 2 Gy bestrahlte Mäuse transplantiert wurden. Diese sekundär und auf dieselbe Weise tertiär oder quartär transplantierten Mäuse wurden für die Versuche verwendet und werden im Folgenden als leukämische Mäuse (wt leu / *Gfi1*-KO leu) bezeichnet. Die Kontrollgruppen waren unbehandelte wt und *Gfi1*-KO Mäuse. Außerdem bildeten ebenfalls mit 2 Gy bestrahlte und anschließend mit nicht-leukämischen Knochenmarkzellen transplantierte wt oder *Gfi1*-KO Mäuse eine Kontrollgruppe (wt irr / *Gfi1*-KO irr; Abbildung 11 A). Zugunsten der Übersichtlichkeit wurden die bestrahlten und unbestrahlten Kontrollgruppen der einzelnen Genotypen zusammengefasst, nachdem kein Unterschied bezüglich Zusammensetzung des Knochenmarkes, der Milz, der Knochen oder des Blutbildes zwischen den jeweiligen Kontrollgruppen nachgewiesen wurde. In Tabelle 12 und Tabelle 13 im Anhang ist aufgeführt, welche Mäuse für welche Experimente genutzt wurden. Auch findet sich in Abbildung 25 eine Darstellung von Ergebnissen mit Aufteilung in bestrahlte und unbestrahlte Kontrollgruppen. Die Mäuse wurden bei klinischen Zeichen einer Leukämie wie Splenomegalie und Aktivitätsminderung als erkrankt identifiziert und daraufhin euthanasiert. Der postmortale Nachweis des Anwachsens der Leukämie erfolgte mit verschiedenen Methoden.

Abbildung 11

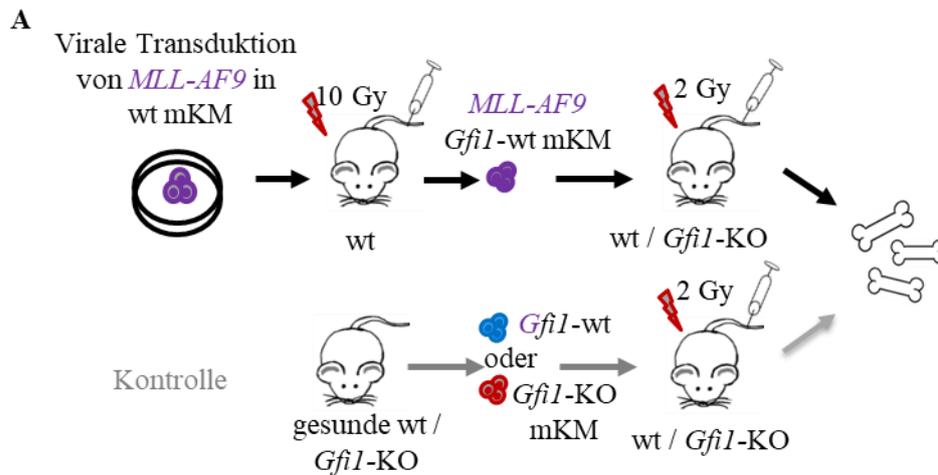


Abbildung 11: In vivo Modell der AML in wt und *Gfi1*-KO Mäusen

A Mausmodell der humanen AML mit *MLL-AF9* Onkofusionsgen. Das Onkofusionsgen *MLL-AF9* wurde viral in murine wt Knochenmark (KM)-Zellen transduziert. Die transduzierten Zellen wurden in letal bestrahlte Mäuse transplantiert. Bei Ausbruch der Leukämie wurden die Mäuse euthanasiert und deren KM-Zellen wurden in subletal bestrahlte Mäuse transplantiert. Zur Kontrolle wurden subletal bestrahlte Mäuse mit KM-Zellen gesunder Mäuse transplantiert.

3.2.4 Nachweis der Leukämie im Mausmodell - Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrisch wurde das aus den langen Röhrenknochen mit FACS-Puffer herausgespülte Knochenmark auf verschiedene Zellen der Hämatopoese untersucht. Abbildung 12 A zeigt die Gating-Strategie für myeloische Zellen, die mit den Fluoreszenz-Antikörpern gegen Gr-1 (anti-mouse Ly-6G/Ly6C) und Mac-1 (anti-mouse CD11b) detektiert wurden.

Die Gr-1 hoch-positiven und Mac-1 positiven Zellen wurden als Granulozyten (*Gran*) bezeichnet. Reife Granulozyten machten bei gesunden wt Mäusen mehr als ein Drittel der KM-Zellen aus, bei *Gfi1*-KO Mäusen waren es unter 10 %. Die leukämischen wt Mäuse litten an einem starken Rückgang der Granulozyten auf etwa 1 % (Abbildung 12 B).

Zudem sind Gr-1⁻ Mac-1⁺ Zellen detektierbar. Im Knochenmark aller nicht leukämischen Mäuse gab es weniger als 5 % Gr-1⁻ Mac-1⁺ Zellen, in den Mäusen mit Leukämie war diese Population stark vertreten und es lag eine Streuung in Richtung Gr1-schwach-positiven Bereich vor. Leukämische Mäuse mit einem KO von *Gfi1* wiesen signifikant weniger Gr-1⁻ Mac-1⁺ Zellen auf als wt Mäuse mit AML (Abbildung 12 A, C).

Die Expression des Proliferationsmarkers cKit war in den leukämischen Mäusen höher als in den gesunden Mäusen (Abbildung 12 E). Der Nachweis der *MLL-AF9*-Blasten erfolgte mittels GFP-Detektion, dessen Gen im viralen Vektor an das *MLL-AF9*-Fusionsgen gekoppelt wurde. In allen

transplantierten Mäusen lag zum Zeitpunkt der Analyse der Anteil GFP⁺ AML-Zellen am KM über 60 %, im Mittel bei 74 % (Abbildung 12 D).

Im peripheren Blut (PB) der leukämischen wt Mäuse lag der GFP⁺ Blastenteil im Median bei 30,8 %, in *Gfi1*-KO Mäusen war er nur bei 23 % (ns; Abbildung 12 G).

Zusammenfassend zeigten sich neben der in *Gfi1*-KO Mäusen typischen Granulozytopenie verschiedene Zeichen der Leukämie im Knochenmark von transplantierten wt und *Gfi1*-KO Mäusen. In *Gfi1*-KO Mäusen mit AML war ein signifikant geringeres Vorkommen der Gr-1⁻ Mac-1⁺ Population im KM sowie ein tendenziell verminderter GFP⁺ Blastenteil im peripheren Blut im Vergleich zu wt Mäusen mit AML zu beobachten, was auf eine geringere Leukämiebelastung in *Gfi1*-KO Mäusen hinweist.

Abbildung 12

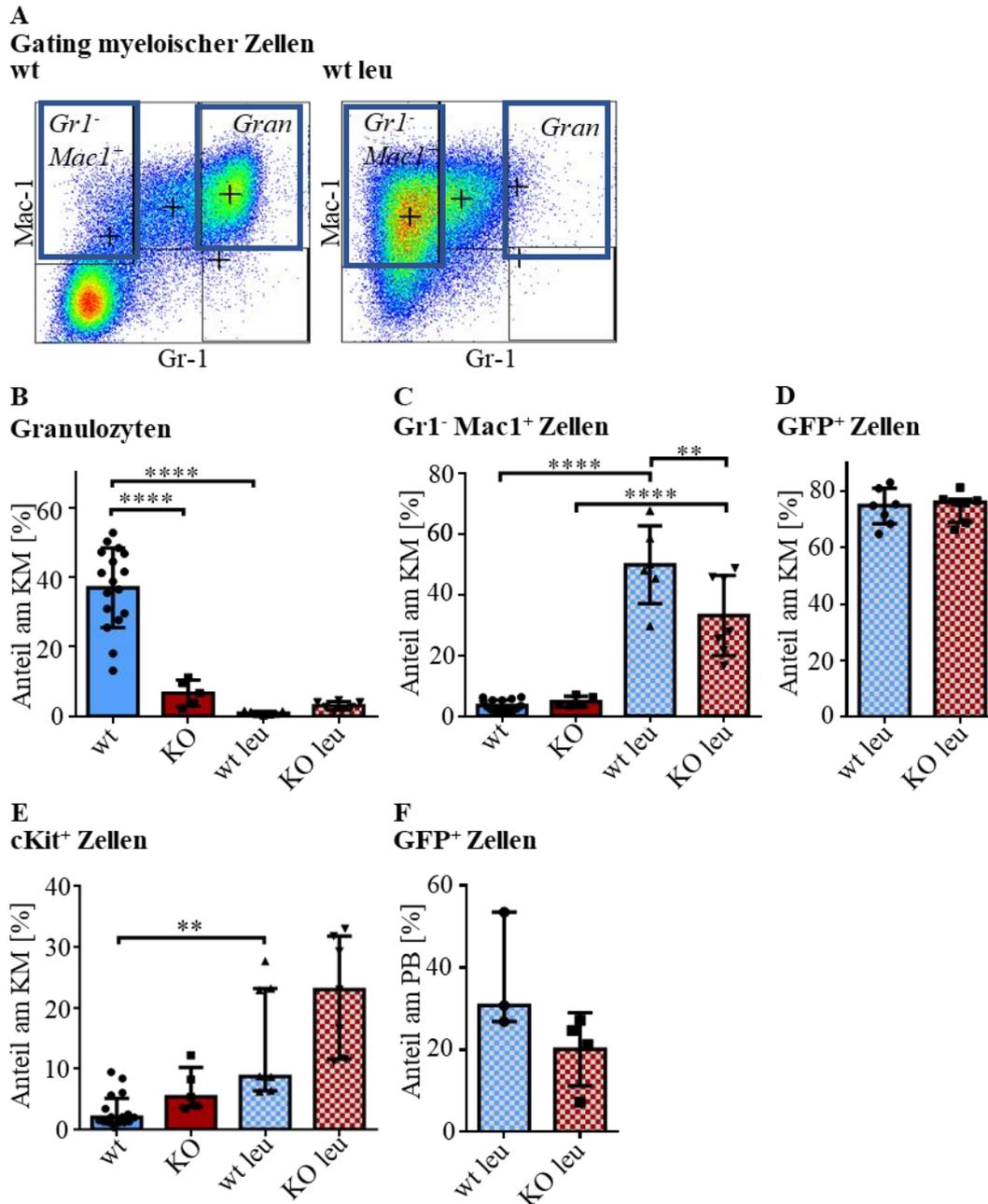


Abbildung 12: Durchflusszytometrischer Nachweis der Leukämie im Mausmodell

A Gating-Strategie für die Durchflusszytometrie des Knochenmarkes: Nach Ausschluss der Dubletten erfolgte die Lebend-tot-Unterscheidung. Die myeloischen Zellen wurden mit Gr-1 & Mac-1 (=CD11b) identifiziert. **B-F** Ergebnisse der Durchflusszytometrie. **B** Anteil der Granulozyten (Gr-1⁺ Mac-1⁺, *Gran*) am KM. **C** Anteil der myeloiden Vorläufer (Mac-1⁺ Gr-1⁻) am KM. **D** Anteil der GFP⁺ (MLL-AF9)-Zellen am KM **E** Anteil der cKIT⁺ Zellen am KM. **F** Anteil der GFP⁺ (MLL-AF9)-Zellen im peripheren Blut (PB)

3.2.5 Durchflusszytometrischer Ausschluss einer lymphatischen Leukämie

Das Fusionsgen *MLL-AF9* kann nicht nur eine myeloische, sondern auch eine lymphatische Leukämie induzieren (Dobson et al., 1999; Young et al., 2020). Um dies auszuschließen, wurde das KM mittels Durchflusszytometrie in Bezug auf die Expression der lymphatischen Zellmarker B220, CD4 und CD8a untersucht. Im Knochenmark der leukämischen Mäuse konnten im Vergleich zu den Kontrollen keine vermehrten Lymphozyten ($B220^+$ B-Lymphozyten, $CD4^+$ und $CD8a^+$ T-Lymphozyten) nachgewiesen werden und somit eine lymphatische Leukämie ausgeschlossen werden. Die Anzahl $CD8a^+$ Zellen war sogar signifikant verringert in Mäusen mit Leukämie (Abbildung 13 A-B).

Abbildung 13

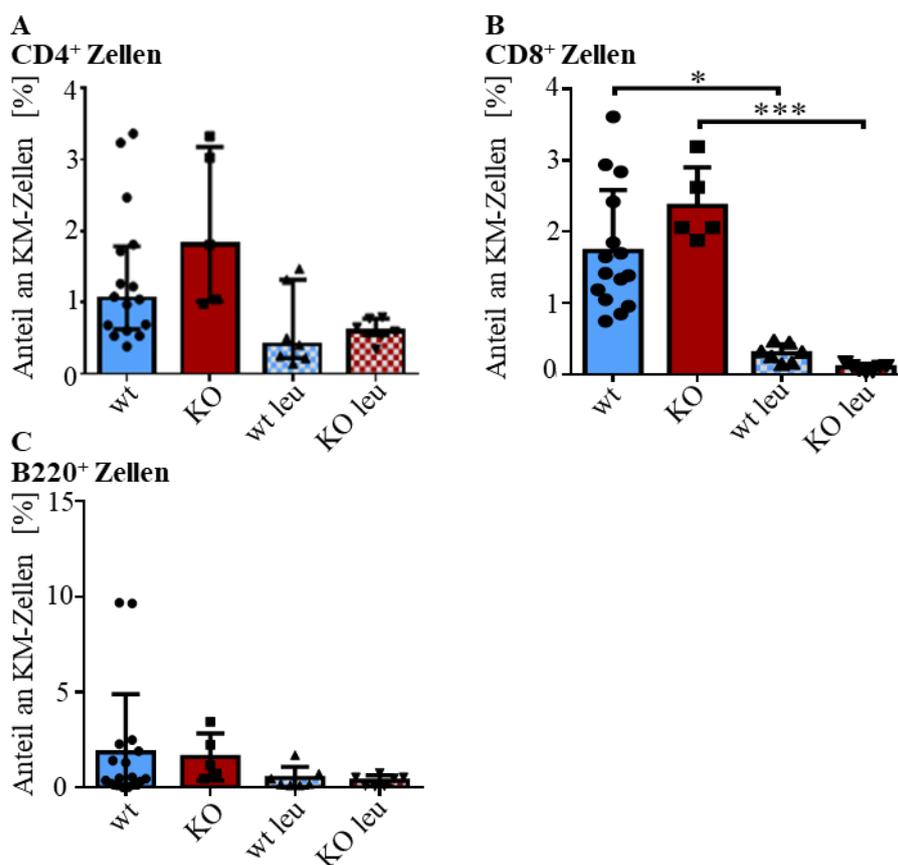


Abbildung 13: Durchflusszytometrischer Ausschluss einer lymphatischen Leukämie

A Anteil der $CD4^+$ T-Lymphozyten, B $CD8^+$ T-Lymphozyten und C B-Lymphozyten an kernhaltigen KM-Zellen.

3.2.6 Knochenmark, Blutbild und krankheitsfreies Überleben

Zur genauen Bestimmung der Leukämie-Last im Knochenmark wurden Zytopspins angefertigt und manuell differenziert. Im Knochenmark gesunder wt Mäuse waren im Schnitt 4,3 % der kernhaltigen Zellen unreife Blasten. Bei den *Gfi1*-KO Mäuse machten die Blasten durchschnittlich 5,7 % aus. Die *MLL-AF9*-transplantierten Mäusen hatten zum Zeitpunkt der Euthanasie durchschnittlich 88,3 %

(wt) bzw. 91,9 % (*Gfi1*-KO) Blasten im KM. Die Spanne reichte von 60% bis 97% bei den wt Mäusen, von 85% bis 97% bei den *Gfi1*-KO Mäusen (Abbildung 14 A). Die kernhaltigen Zellen im Pappenheim-gefärbten Blutaussstrich wurden ebenfalls manuell differenziert. Die gesunden wt und *Gfi1*-KO Mäuse wiesen jeweils 0,2 % Blasten im Blutaussstrich auf. Im Blut von Mäusen mit Leukämie waren beim wt durchschnittlich 92,1 % der kernhaltigen Zellen Blasten, bei den *Gfi1*-KO Mäusen 85,3 % (Abbildung 14 B).

Gesunde wt Mäuse hatten im Mittel 3,2 Leukozyten pro Nanoliter (nl) Blut, gesunde *Gfi1*-KO Mäuse 1,5 pro nl. Die Proliferation leukämischer Blasten ließ die Leukozytenzahl auf durchschnittlich 146,8 /nl im wt und 97,1 /nl in *Gfi1*-KO Mäusen steigen (Abbildung 14 C). Ein klassisches Symptom der AML ist die Anämie, weshalb der Hämoglobin-Gehalt (Hb) der Mäuse überprüft wurde. Der Hb sank bei den wt und *Gfi1*-KO Mäusen durch die Leukämie etwa gleichstark ab (Abbildung 14 D). Sowohl im KM als auch im PB war zu allen oben genannten Parametern nur der Unterschied zwischen Mäusen mit und ohne AML signifikant, der zwischen *Gfi1*-KO und wt-Mäusen nicht. Weitere Symptome der AML sind die Thrombozytopenie und das damit einhergehende erhöhte Blutungsrisiko. Die Thrombozytenzahl lag bei leukämischen Mäusen im Durchschnitt bei weniger als einem Drittel Thrombozytenzahl in gesunden Mäusen sowohl im wt als auch bei *Gfi1*-KO, wobei der Unterschied nur beim wt signifikant war (Abbildung 14 E). Eine Blutungsneigung wurde nicht beobachtet.

Der Unterschied in der krankheitsfreien Überlebenszeit der Mäuse nach Transplantation der AML-Zellen war nicht signifikant. *Gfi1*-KO Mäuse wurden im Mittel zwei bis drei Tage früher schwer symptomatisch und daraufhin euthanasiert als wt Mäuse ($p=0,06$; Abbildung 14 F).

Die Blastenzahl und die Leukozytenzahl im Blut waren in *Gfi1*-KO Mäusen mit Leukämie tendenziell, jedoch nicht signifikant geringer als in wt-Tieren. Die Symptome Anämie und Thrombopenie waren bei wt und *Gfi1*-KO Mäusen gleich ausgeprägt. Das krankheitsfreie Überleben war bei den leukämischen *Gfi1*-KO Mäusen gegenüber dem wt um zwei bis drei Tage verkürzt, in beiden Gruppen überlebte eine transplantierte Maus ohne ein Angehen der Leukämie.

Abbildung 14

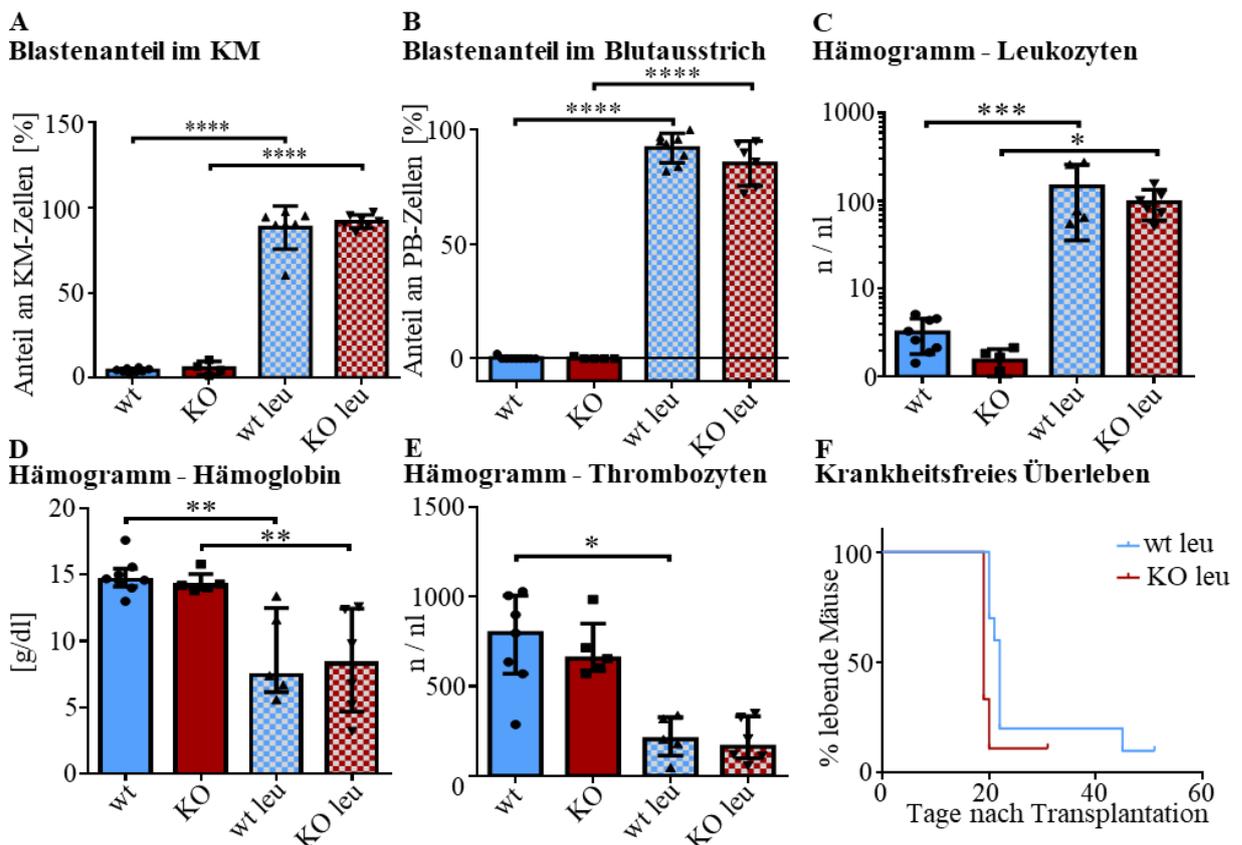


Abbildung 14: Blastenlast in Knochenmark und Blut, Blutbild und krankheitsfreies Überleben

A Anteil der Blasten an kernhaltigen Zellen im KM-Zytospin, manuelle Differenzierung. **B** Blastenanteil an kernhaltigen Zellen im Blutausstrich, manuelle Differenzierung. **C** Leukozytenzahl /nl, maschinelles Hämogramm **D** Hämoglobin in g/dl, maschinelles Hämogramm. **E** Thrombozyten /nl, maschinelles Hämogramm **F** Krankheitsfreies Überleben in Tagen nach Transplantation der AML.

3.2.7 Körper-, Milz- und Leber-Gewicht

Ein erhöhtes Milz- und Lebergewicht spiegelt die im Rahmen einer akuten Leukämie mögliche Hepatosplenomegalie wider. Daher wurde neben dem Körpergewicht bei Analyse der Mäuse auch deren Milzen und Lebern gewogen.

Die *Gfil*-KO Mäuse hatten sowohl in Gesundheit als auch mit Leukämie ein geringeres Körpergewicht als die wt Mäuse. Sie waren ca. 5 g leichter. Zwischen gesunden und leukämischen Mäusen desselben Genotyps gab es keinen Gewichtsunterschied (Abbildung 15 A). Die Altersverteilung in den Gruppen war ausgeglichen, die Mäuse waren bei Analyse zwischen 82 und 128 Tagen alt (Abbildung 15 B). Bei den leukämischen Mäusen machte die Milz 2 % des Körpergewichtes aus. Betrachtet man die Kontrollgruppe, waren es nur 0,3 % des Körpergewichtes (Abbildung 15 C). Es kam neben der Splenomegalie auch zu einer Hepatomegalie. Die Leber wog bei wt Mäusen mit Leukämie mit 10 % des Körpergewichtes fast doppelt so viel wie bei gesunden wt Mäusen. In *Gfil*-KO Mäusen stieg das Lebergewicht signifikant weniger an, nur von 5,6 % auf 8,2 % des Körpergewichtes (Abbildung 15 D).

Abbildung 15

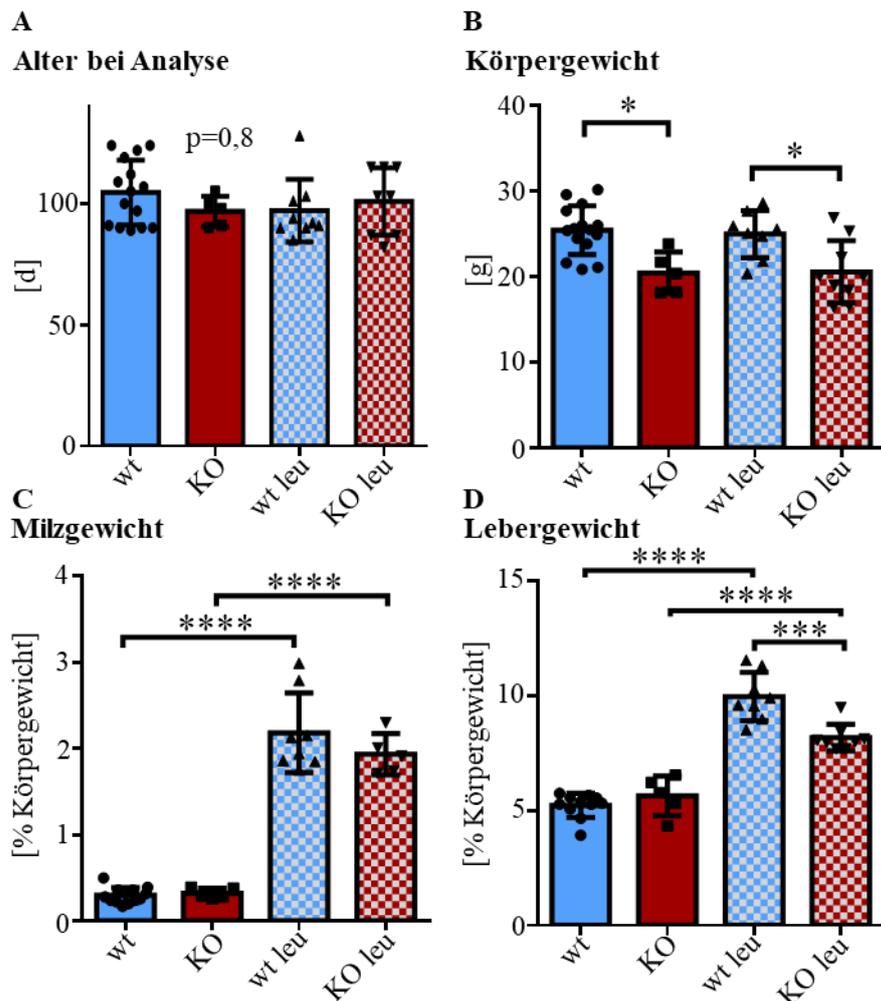


Abbildung 15: Alter sowie Körper-, Milz- und Lebergewicht der Versuchstiere.

A Alter der Mäuse bei Analyse. **B** Körpergewicht der Mäuse. **C** Milz- und **D** Lebergewicht in Relation zum Körpergewicht in %.

3.2.8 Geringere Milz-Infiltration mit myeloischen Blasten in *Gfi1*-KO Mäusen

Aufgrund der festgestellten Splenomegalie wurde die zelluläre Zusammensetzung der Milz mittels Durchflusszytometrie untersucht. Während in den Milzen gesunder Mäuse ca. 5 % der Zellen myeloide Vorläuferzellen ($\text{Gr-1}^- \text{Mac-1}^+$) waren, machte diese Population in leukämischen wt Mäusen, durchschnittlich fast 50 % der Milz-Zellen aus. In leukämischen *Gfi1*-KO Mäusen fanden sich etwa ein Fünftel weniger $\text{Gr-1}^- \text{Mac-1}^+$ Zellen (Abbildung 16 A) und etwas weniger GFP^+ Blasten als im wt (ns; Abbildung 16 B). Die CD4^+ und CD8^+ Lymphozyten waren in leukämischen Mäusen stark vermindert. Zudem wiesen *Gfi1*-KO Mäuse ohne Leukämie mehr CD8^+ Zellen und weniger CD4^+ Zellen als wt Mäuse auf (Abbildung 16 C und D).

Abbildung 16

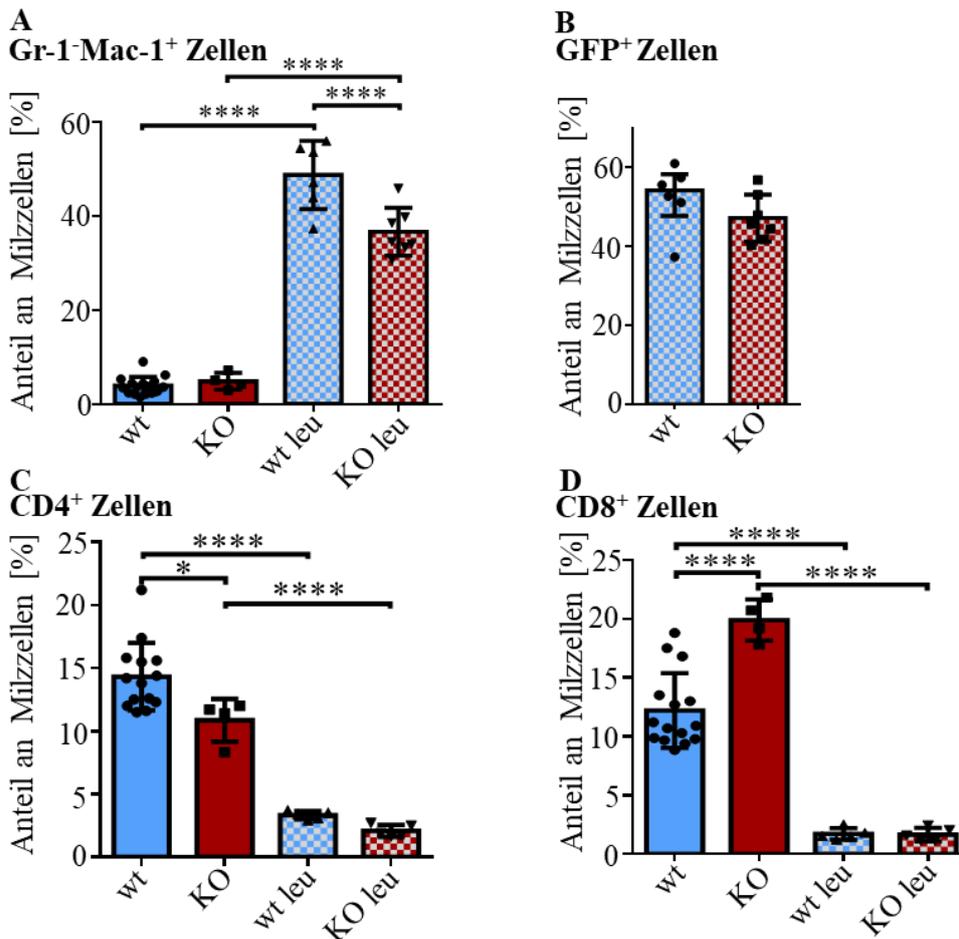


Abbildung 16: Durchflusszytometrische Analysen der Milzzellen

A Anteil der Gr-1⁻ Mac-1⁺ in der Milz. **B** Anteil der GFP⁺ Zellen in der Milz **C** Anteil der CD4⁺ Lymphozyten in der Milz. **D** Anteil der CD8⁺ Lymphozyten in der Milz.

3.2.9 Leukämische *Gfil*-KO Mäuse haben mehr OBC im Knochengewebe als wt Mäuse

Entsprechend der oben beschriebenen Methode (s. 3.2.3) wurden auch die Zellen der langen Röhrenknochen leukämischer Mäuse mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Bestrahlung schien keinen Einfluss auf die Anzahl von OBC (CD45⁻Lin⁻CD31⁻CD51⁺Sca-1⁻) zu haben (Abbildung 24 I-K). Die absolute Anzahl der OBC unterschied sich zwischen wt und *Gfil*-KO Mäusen nicht signifikant, auch die AML bedingte keine signifikanten Unterschiede. Besonders bei den wt-Mäusen lag eine große Streuung dieser Werte vor (Abbildung 17 A). Die *Gfil*-KO Mäuse wiesen tendenziell weniger Stromazellen (CD45⁻Lin⁻) im Knochen auf. Auch hier zeigte sich eine große Streuung (Abbildung 17 B).

Betrachtet man hingegen den prozentualen Anteil der OBC am Stroma war die Streuung deutlich geringer. Beim KO von *Gfil* zeigte sich sowohl in gesunden als auch leukämischen Mäusen der Anteil der OBC im Vergleich zum wt in etwa verdoppelt. Er war bei den *Gfil*-KO Mäusen mit

Leukämie tendenziell höher als bei gesunden *Gfi1*-KO Mäusen (ns, Abbildung 17 C). Zwischen den Anteilen der MSPC am Stroma war kein Unterschied festzustellen (Abbildung 17 D).

Abbildung 17

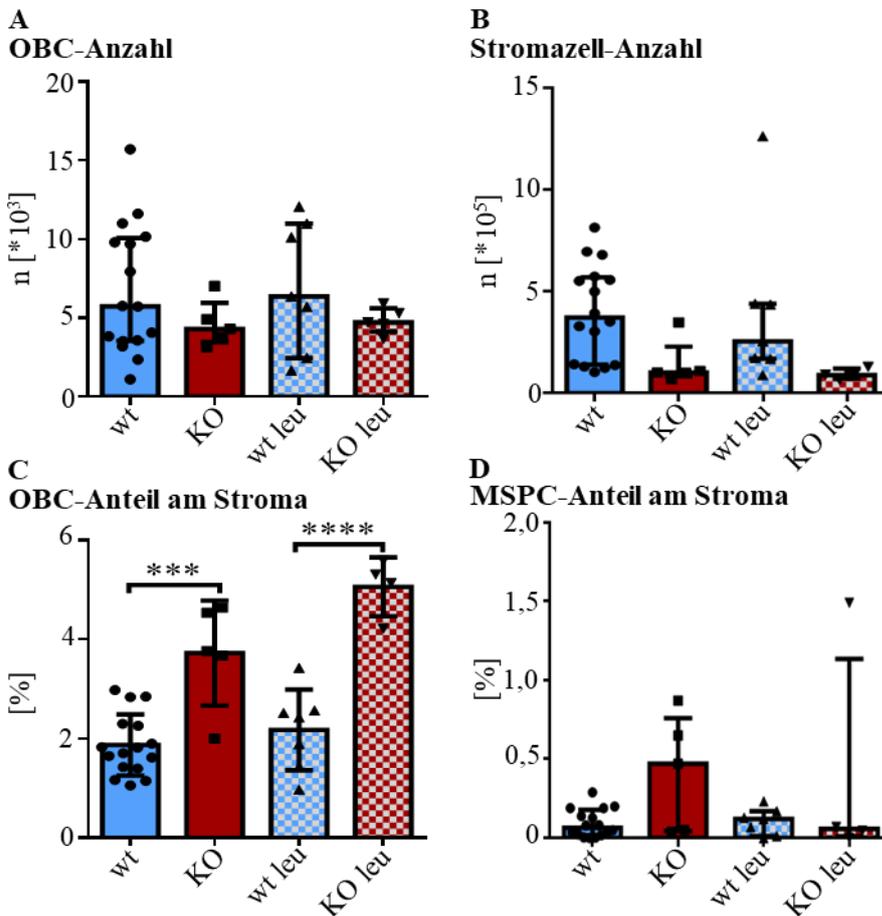


Abbildung 17: Durchflusszytometrie der Zellen aus Röhrenknochen in wt & *Gfi1*-KO Mäusen ohne und mit AML

A Anzahl der OBC (CD45^{Lin}-CD31⁻CD51⁺Sca-1⁻) in langen Röhrenknochen. **B** Anzahl der Stromazellen (CD45^{Lin}-) in langen Röhrenknochen. **C** Anteil der OBC an den Stromazellen in %. **D** Anteil der MSPC (CD45^{Lin}-CD31⁻CD51⁺Sca-1⁺) an den Stromazellen in %.

3.2.10 μ CT – Porosität des kortikalen Knochens bei *Gfi1*-KO Mäusen

Mithilfe der Micro-Computertomographie (μ CT) sollte nach Untersuchung der zellulären Zusammensetzung die Morphologie der Knochen verglichen werden. Die rechten Femora wurden in Ethanol fixiert und durch Mitarbeiter des Center for Bone and Periodontal Research der McGill University mit dem Computertomographen SykScan 1172 abgebildet. Abbildung 18 zeigt repräsentative rekonstruierte Bilder kortikaler und trabekulärer Strukturen muriner Femora.

Die größten Auffälligkeiten fanden sich im kortikalen Knochen. Dessen Porosität war in *Gfi1*-KO Mäusen gegenüber den wt Mäusen durchschnittlich um den Faktor 5,7 erhöht – mit und ohne Leukämie. Allerdings war nur der Unterschied zwischen den leukämischen Mäusen signifikant

(Abbildung 19 A). Analog dazu war der Anteil des kortikalen Knochenvolumens am Gewebevolumen (BV/TV, bone volume / tissue volume) in *Gfi1*-KO Mäusen geringer als im wt. Auch hier war nur der Vergleich zwischen erkrankten Mäusen signifikant (Abbildung 19 B).

Der Durchmesser des kortikalen Knochens, war in erkrankten *Gfi1*-KO Mäusen etwas dicker ($0,23 \pm 0,02$ mm) als in wt Mäusen mit Leukämie ($0,19 \pm 0,01$ mm, $p= 0,06$) oder in gesunden *Gfi1*-KO Mäusen ($0,21 \pm 0,02$ mm), die in etwa die gleiche kortikale Dicke hatten wie die Knochen von wt Mäusen ($0,2 \pm 0,01$ mm). Keiner dieser Unterschiede war signifikant (Abbildung 19 C).

Der trabekuläre Knochen unterschied sich statistisch nicht zwischen den Gruppen. Allerdings fiel auf, dass in der Gruppe der wt Mäuse mit Leukämie die Werte derselben Maus in allen drei Graphen deutlich herausstachen (markiert mit einem Kreis). Betrachtet man die Werte dieser Maus als Ausreißer, so wiesen wt Mäuse mit Leukämie einen geringeren Knochenanteil am Gewebevolumen des trabekulären Knochens auf (ns, Abbildung 19 D). Außerdem war der trabekuläre Musterfaktor in leukämischen Mäusen eher erhöht. Da dieser Wert sich umgekehrt proportional zur Konnektivität der Trabekel verhält, bedeutet dies, dass pro Trabekel in den wt Mäusen mit Leukämie weniger Kontakte zu anderen Trabekeln bestanden (Abbildung 19 E). In dieses Bild passt auch die im Median verringerte Anzahl der Trabekel pro mm bei wt Mäusen mit Leukämie (ns; Abbildung 19 F). Bei einem KO von *Gfi1* schien die Leukämie den trabekulären Knochen nicht zu beeinflussen.

Zusammenfassend war in den Mäusen mit einem *Gfi1*-KO eine signifikant höhere kortikale Porosität und in *Gfi1*-KO Mäusen mit AML eine tendenziell höhere Dicke des kortikalen Knochens zu beobachten. Der trabekuläre Knochen zeigte keine signifikanten Unterschiede. Betrachtet man den Median zur Relativierung des Ausreißers bei den leukämischen wt Mäusen, so wiesen diese eine Abnahme von Volumen, Anzahl und Konnektivität des trabekulären Knochens auf (ns). Eine Vergrößerung der Gruppen wäre notwendig, um sichere Aussagen darüber treffen zu können.

Abbildung 18

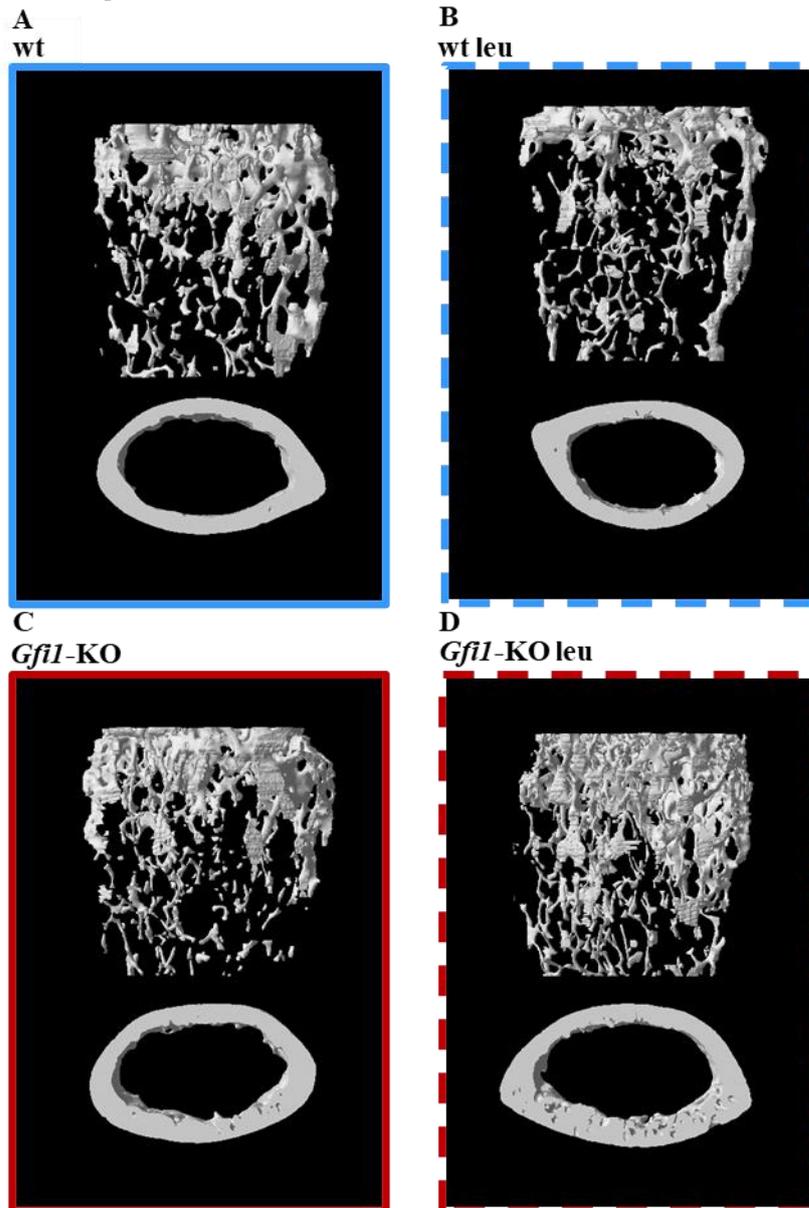


Abbildung 18: Repräsentative Anschnitte von kortikalem und trabekulärem Knochen – Rekonstruktion aus microcomputertomographischen Aufnahmen

A Wildtyp gesund (wt). **B** Wildtyp mit Leukämie (wt leu). **C** *Gfi1*-knockout gesund (*Gfi1*-KO). **D** *Gfi1*-knockout mit Leukämie (*Gfi1*-KO leu).

Abbildung 19

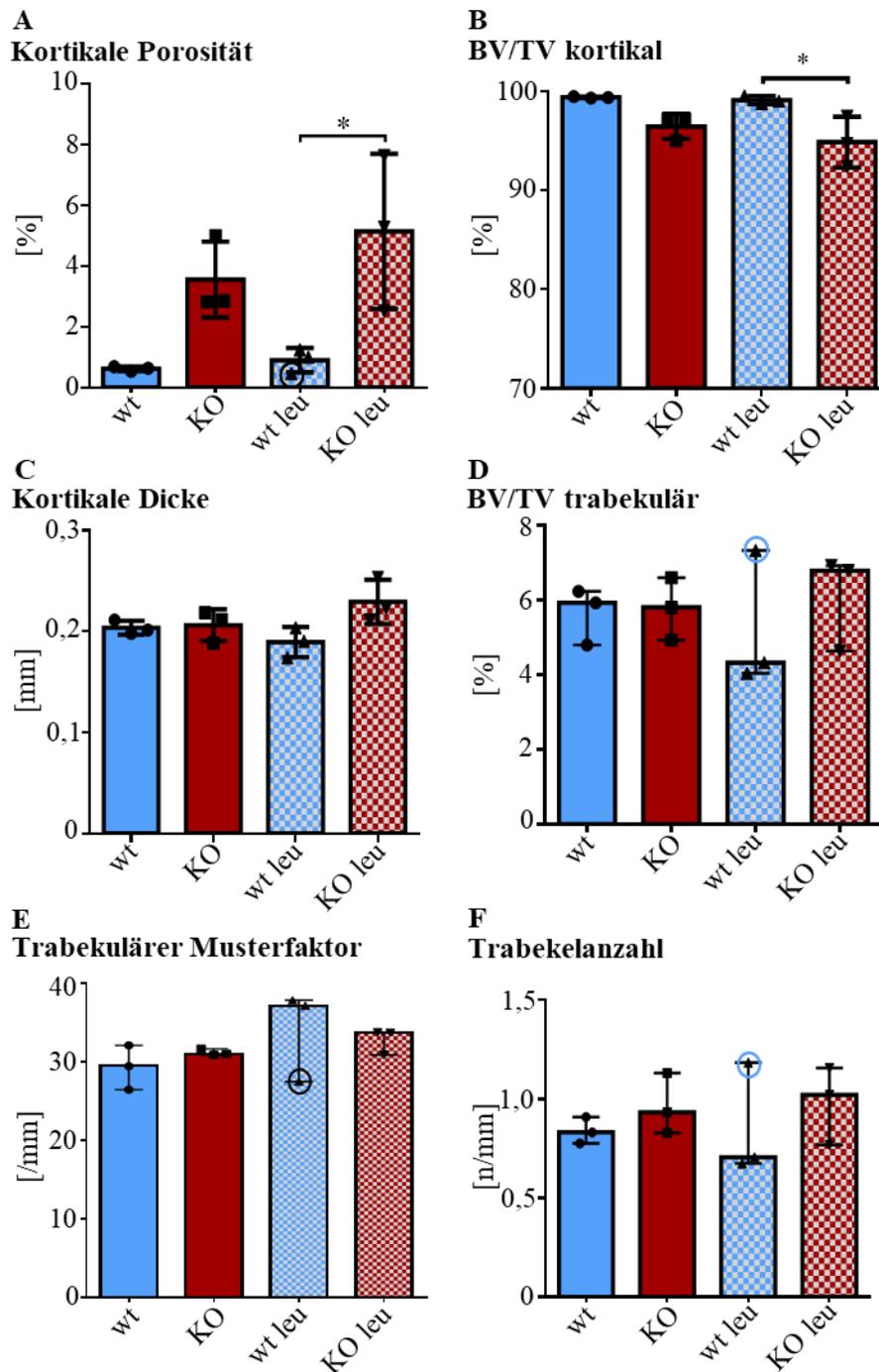


Abbildung 19: Micro-Computertomographie (μ CT) der Femora

Ergebnisse der μ CT der rechten Femora: **A** Porosität des kortikalen Knochens in %. **B** Anteil des kortikalen Knochen volumens (BV- bone volume) am Gewebesvolumen (TV- tissue volume) in %. **C** Mittlere Dicke des kortikalen Knochens in mm. **D** Anteil des trabekulären BV am TV in %. **E** Trabekulärer Musterfaktor – Wert umgekehrt proportional zur Konnektivität der Trabekel. **F** Anzahl der Trabekel pro mm.

3.2.11 Knochenhistologie – In *Gfil*-KO Mäusen steigert die Leukämie Porosität und Fläche des kortikalen Knochens

Die Histologie erlaubt es, einzelne Zellen in der Morphologie des Knochens zu betrachten. Zur Beurteilung des kortikalen Knochens, wurden Femora nach der Fixierung und Dekalzifizierung hochkant in Paraffin eingebettet, um transversale Schnitte anfertigen zu können. Diese transversalen Schnitte wurden mit MG gefärbt. Vom Einbetten bis zum Färben der Schnitte wurde Unterstützung von dem Knochenlabor im Gerhard-Domagk-Institut am Universitätsklinikum Münster angenommen. Repräsentative Bilder sind in Abbildung 20 A zusammengestellt. Die Auswertung erfolgte an fünf Schnitten pro Maus und ergab folgende Erkenntnisse.

Die Fläche des kortikalen Knochens war in gesunden *Gfil*-KO Mäusen durchschnittlich gegenüber dem wt um 20 % erhöht (ns). Mit Leukämie war der Unterschied noch deutlicher, die kortikale Knochenfläche war bei den *Gfil*-KO Mäusen um 77 % größer als beim wt mit Leukämie (Abbildung 21 A). Die Relation von Markraumfläche zur gesamten Gewebefläche war im Einklang damit in leukämischen *Gfil*-KO Mäusen gegenüber dem wt mit Leukämie und gegenüber dem *Gfil*-KO ohne Leukämie erniedrigt (Abbildung 21 B). Die violett-schwarzen Zellkerne mit hellem Hof im Knochengewebe wurden als Osteozyten gezählt (Abbildung 20 B). Die Anzahl der Osteozyten war ähnlich in allen Gruppen (Abbildung 21 C). Die Osteoblasten waren aufgrund von Schrumpfungartefakten nicht auswertbar. Die schon im μ CT beschriebene gesteigerte kortikale Porosität in *Gfil*-KO Mäusen konnte histologisch bestätigt werden. Die Osteoid-freien Poren machten in gesunden *Gfil*-KO Mäusen 3 ± 2 % der Knochenfläche aus und in leukämischen *Gfil*-KO Mäusen 10 ± 2 %, wohingegen im wt mit oder ohne Leukämie kaum Poren vorhanden waren (<1 %). Hier war deutlicher zu sehen als beim μ CT, dass die Porosität des kortikalen Knochens der *Gfil*-KO Mäuse durch die Leukämie gesteigert wurde (Abbildung 21 D). Diese Poren sind als Knochengewebe-freie Areale im Knochen definiert. Sie wurden optisch in KM-Inseln (Abbildung 21 E) und Gefäße im kortikalen Knochen (Abbildung 21 F) unterschieden. Als Gefäße wurden kleinere runde Poren bezeichnet, die Erythrozyten enthielten und erkennbar von einem Endothel gesäumt waren. Alle anderen Poren, die auch andere hämatopoetische Zellen enthielten wurden als Knochenmarkinseln gezählt. Es ist also nur ein näherungsweise Eindruck der Verteilung abgebildet. Dargestellt ist die Anzahl der KM-Inseln pro mm^2 bzw. Anzahl der Gefäße pro mm^2 . Daher ist zu bedenken, dass die mit KM gefüllten Poren in der Regel deutlich mehr Fläche einnahmen als die Gefäße. Die gesunden *Gfil*-KO Mäuse wiesen vermehrt Gefäße in ihrem kortikalen Knochen auf, während die leukämischen *Gfil*-KO Mäusen mehr KM-Inseln aufwiesen (Abbildung 21 E-F). Solche KM-Inseln kamen in den wt Mäusen mit und ohne Leukämie kaum vor.

Zusammenfassend zeigte sich in *Gfil*-KO Mäusen sowohl eine erhöhte Porosität als auch eine größere Fläche des kortikalen Knochens. Porosität des Knochens kommt durch ein Ungleichgewicht von Osteoblasten und Osteoklasten zustande, bei dem die Osteoklasten mehr Knochen abbauen als

von den Osteoblasten neugebildet wird. Eine größere Knochenfläche spricht aber für eine erhöhte Osteoblastenaktivität. Es lohnt sich ein Blick auf die Aktivität der Osteoblasten und Osteoklasten.

Abbildung 20

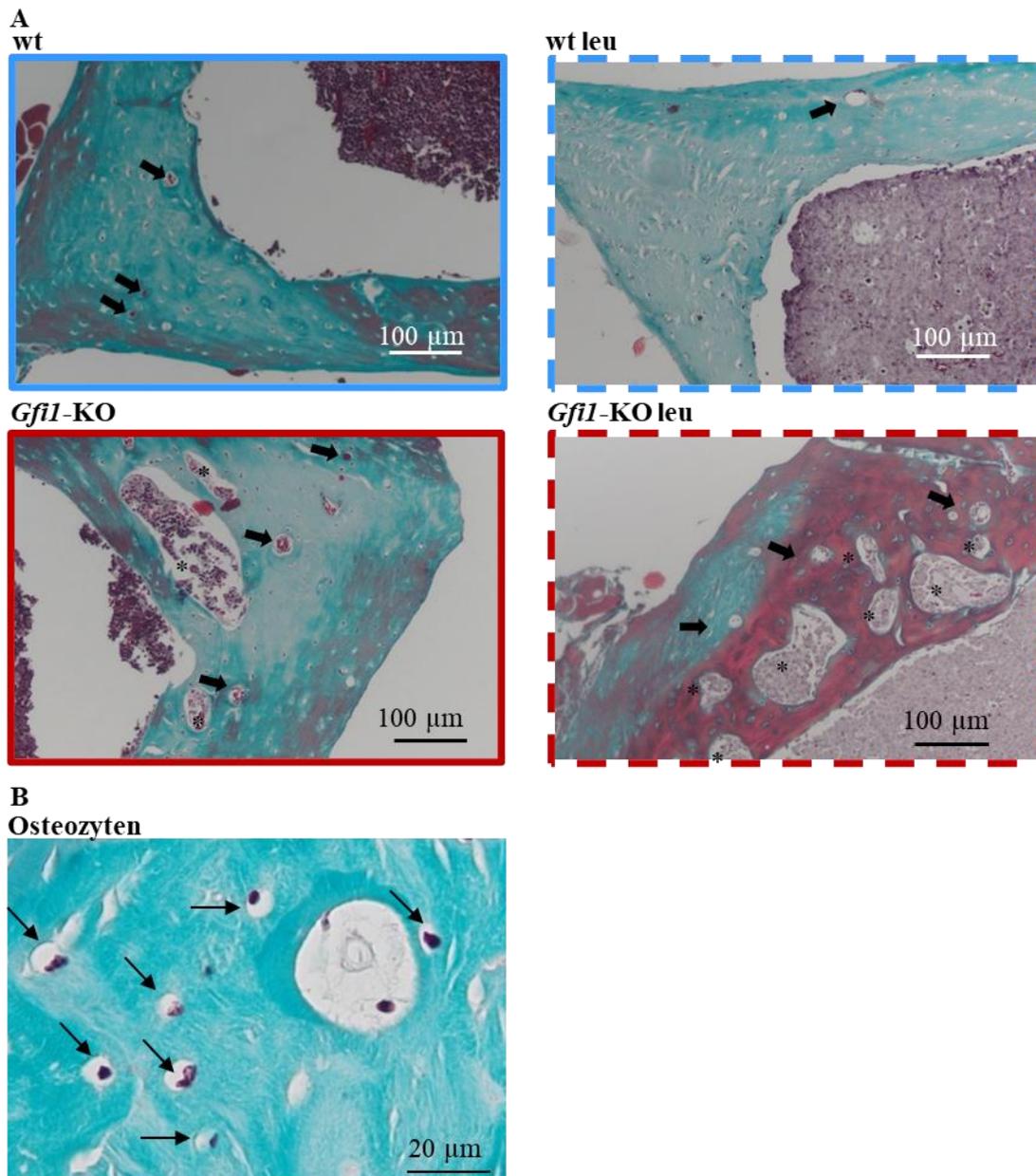


Abbildung 20: Repräsentative histologische Schnitte des kortikalen Knochens

A repräsentative Bilder der histologischen Schnitte Masson-Goldner-gefärbt in 100-facher Vergrößerung von wt und *Gfi1*-KO Mäuse ohne und mit AML (leu): markiert sind Gefäße (➡) und Knochenmarkinseln (*) B Beispiele für Osteozyten(➡) in 400-facher Vergrößerung.

Abbildung 21

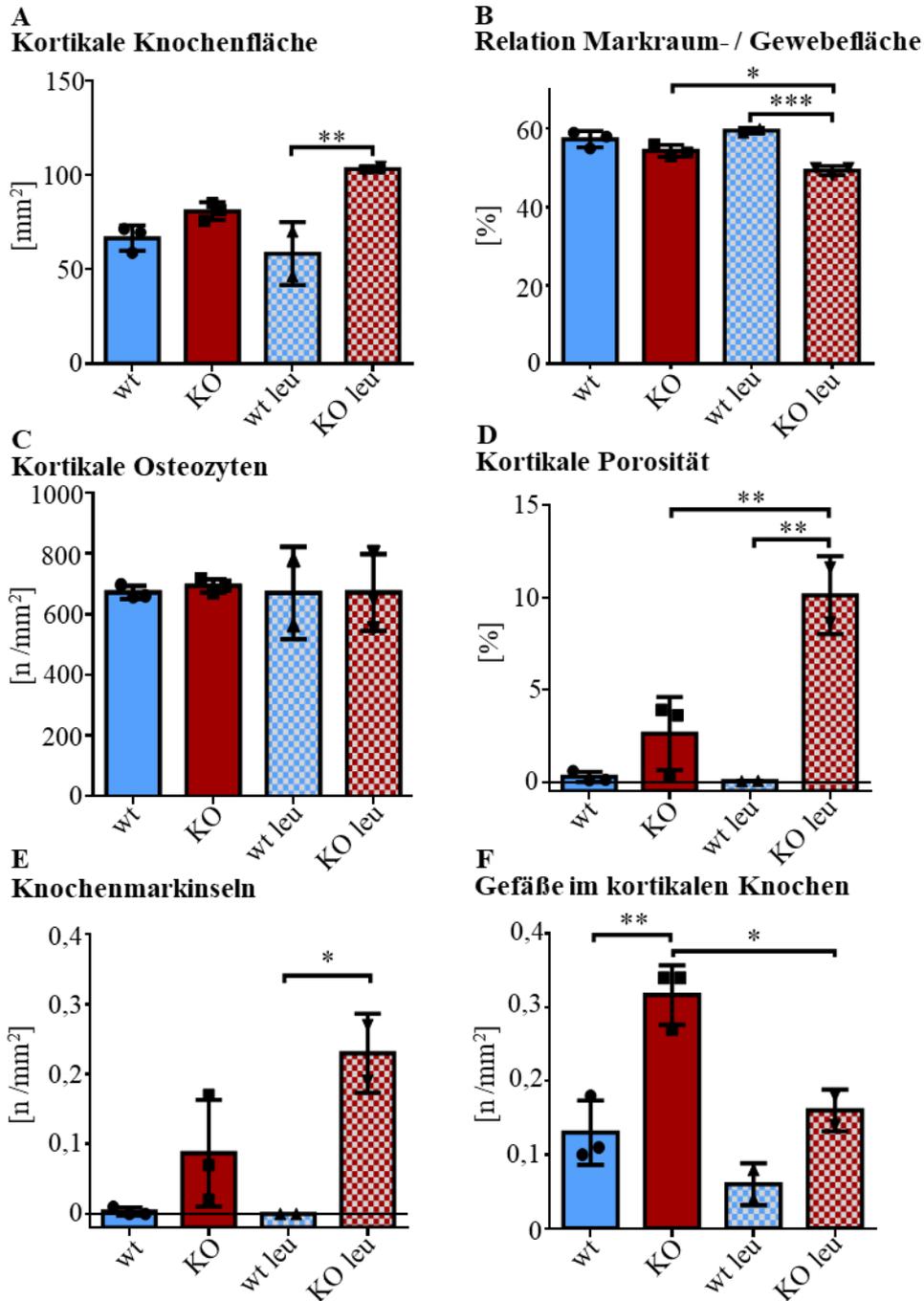


Abbildung 21: Korticale Knochenhistologie der Femora

Ergebnisse der histologischen Querschnitte des rechten Femurs von wt und *Gfi1*-KO Mäusen ohne und mit AML (leu) in Masson-Goldner-Färbung: **A** Fläche des kortikalen Knochens in mm². **B** Fläche des Markraumes anteilig an der Gesamtfläche des Knochenquerschnittes in %. **C** Anzahl der Osteozyten pro mm² Knochenfläche. **D** Anteil der Poren-Fläche an der kortikalen Knochenfläche in %. **E** Anzahl der mit Knochenmark gefüllten Poren pro mm² kortikaler Knochenfläche. **F** Anzahl der Gefäße pro mm² Knochenfläche im kortikalen Knochen.

3.2.12 Calcein-Färbung – Erhöhte Knochenbildungsrate *Gfi1*-KO Mäusen mit Leukämie

Die Osteoblastenaktivität wurde mit dem Calcium-Chelator und Fluorochrom Calcein bestimmt. Dafür wurde den Mäusen elf und 17 Tage nach Induktion der AML intraperitoneal Calcein injiziert. Das Calcein band an das freie Calcium, das in den neu gebildeten Knochen mit eingebaut wurde und markierte somit *in vivo* die Knochenbildung. Auf Querschnitten des noch kalzifizierten Knochens wurde dies fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht. Die BFR wurde mithilfe der Software Osteomeasure anhand der mit Calcein-positivem frischem Knochen bedeckten Flächen und dem Abstand zwischen den Calcein-Linien berechnet (Abbildung 22 A). Die gesunden und leukämischen wt Mäuse unterschieden sich hinsichtlich der BFR nicht. Die BFR der leukämischen *Gfi1*-KO Mäuse war mit durchschnittlich $116 \text{ mm}^3 / \text{mm}^2$ im Jahr dreimal so hoch wie die der wt Mäuse mit und ohne Leukämie (38 bzw. $39 \text{ mm}^3 / \text{mm}^2$ pro Jahr). Die *Gfi1*-KO Mäuse mit Leukämie hatten also eine erhöhte Osteoblastenaktivität gegenüber den gesunden und erkrankten wt Mäusen (Abbildung 22 B). Außerdem fiel auf, dass vor allem um die Poren im kortikalen Knochen eine hohe Osteoblastenaktivität bestand (Abbildung 22 C).

Abbildung 22

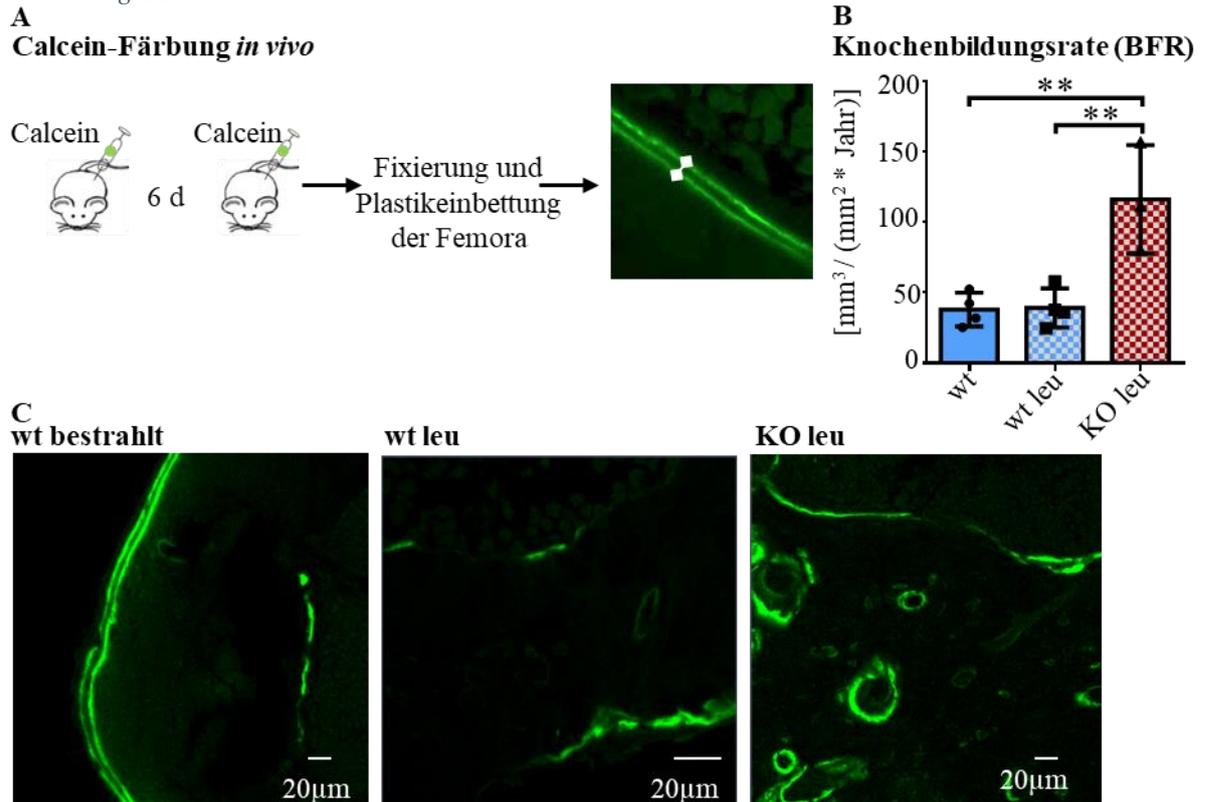


Abbildung 22: Knochenbildungsrate durch Calcein-Färbung *in vivo*

A Den Versuchstieren wurde 11 und 17 Tage nach der Transplantation Calcein intraperitoneal injiziert. Der Calcium-Chelator bindet an das in frischen Knochen eingebaute Calcium. Dieser Komplex kann fluoreszenzmikroskopisch auf den Querschnitten des Femurs dargestellt werden. **B** Jährliche Knochenbildungsrate (BFR) in mm³/m² von wt Mäusen sowie wt und *Gfi1*-KO Mäusen mit AML (*leu*). **C** Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Bilder der Querschnitte.

3.2.13 Erhöhte Osteoklastenzahl und -Aktivität in *Gfi1*-KO Mäusen

Bei einer hohen BFR und hoher Porosität in leukämischen *Gfi1*-KO Mäusen lag es nahe, sich schließlich die Osteoklasten-Aktivität anzusehen. Dafür wurden Querschnitte der Femora, die auf dieselbe Weise angefertigt wurden wie die MG gefärbten Schnitte, auf Tartrate Resistant Acid Phosphatase (TRAP) gefärbt. TRAP ist ein Eisen-haltiges Enzym, das vor allem in Osteoklasten vorkommt und ein etablierter histochemischer Marker für Osteoklasten und ihre Aktivität ist (Minkin, 1982). Die Färbung würde durch Ulrike Kelp der AG Tuckermann am Institut für Molekulare Endokrinologie der Tiere in Ulm durchgeführt. Osteoklasten sind als multinukleäre rot-gefärbte Zellen im oder am Rand des Knochens zu erkennen (Abbildung 23 B). Untersucht wurden wt und *Gfi1*-KO Mäuse ohne Leukämie sowie wt und *Gfi1*-KO Mäuse mit *MLL-AF9*-induzierter Leukämie. Pro Maus wurden vier bis sechs Schnitte ausgewertet.

Gesunde *Gfi1*-KO Mäuse hatten siebenmal so viele Osteoklasten pro mm² Knochenfläche wie gesunde wt Mäuse. Auch unter leukämischen Bedingungen wiesen die Knochen von *Gfi1*-KO

Mäusen eine etwa siebenfach höhere Dichte an Osteoklasten auf als die von wt Mäusen (ns, Abbildung 23 C).

Die TRAP-Aktivität wurde ausgewertet, indem der Anteil der von rosaroten TRAP⁺-Linien eingefassten Flächen an der Gesamt-Knochenfläche berechnet wurde. Auch hier sah man, dass die TRAP-Aktivität der *Gfi1*-KO Mäuse unabhängig vom Vorliegen einer AML deutlich ausgeprägter war als die der wt Mäuse.

Bei Mäusen ohne AML war die TRAP-Aktivität im *Gfi1*-KO gegenüber dem wt um den Faktor sieben erhöht. In den Knochen von leukämischen wt Mäusen wurde kaum TRAP-Aktivität gemessen. Die leukämischen *Gfi1*-KO Mäuse hatten eine im Median 24-mal höhere Aktivität als die leukämischen wt Mäuse (ns, Abbildung 23 D).

Sowohl die Anzahl als auch die Aktivität der Osteoklasten war in den *Gfi1*-KO Mäusen unabhängig vom Vorliegen einer AML höher als im jeweiligen wt. Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den gesunden und leukämischen *Gfi1*-KO Mäusen, ebenso wenig zwischen den gesunden und leukämischen wt Mäusen.

Die hohe Osteoklasten-Aktivität in *Gfi1*-KO Mäusen bei gleichzeitig gesteigerten Knochenformationsrate – letztere lediglich nachgewiesen in leukämischen *Gfi1*-KO Mäusen – liefert eine Erklärung für die Kombination einer höheren Porosität und einer größeren Knochenfläche in *Gfi1*-KO Mäusen.

Abbildung 23

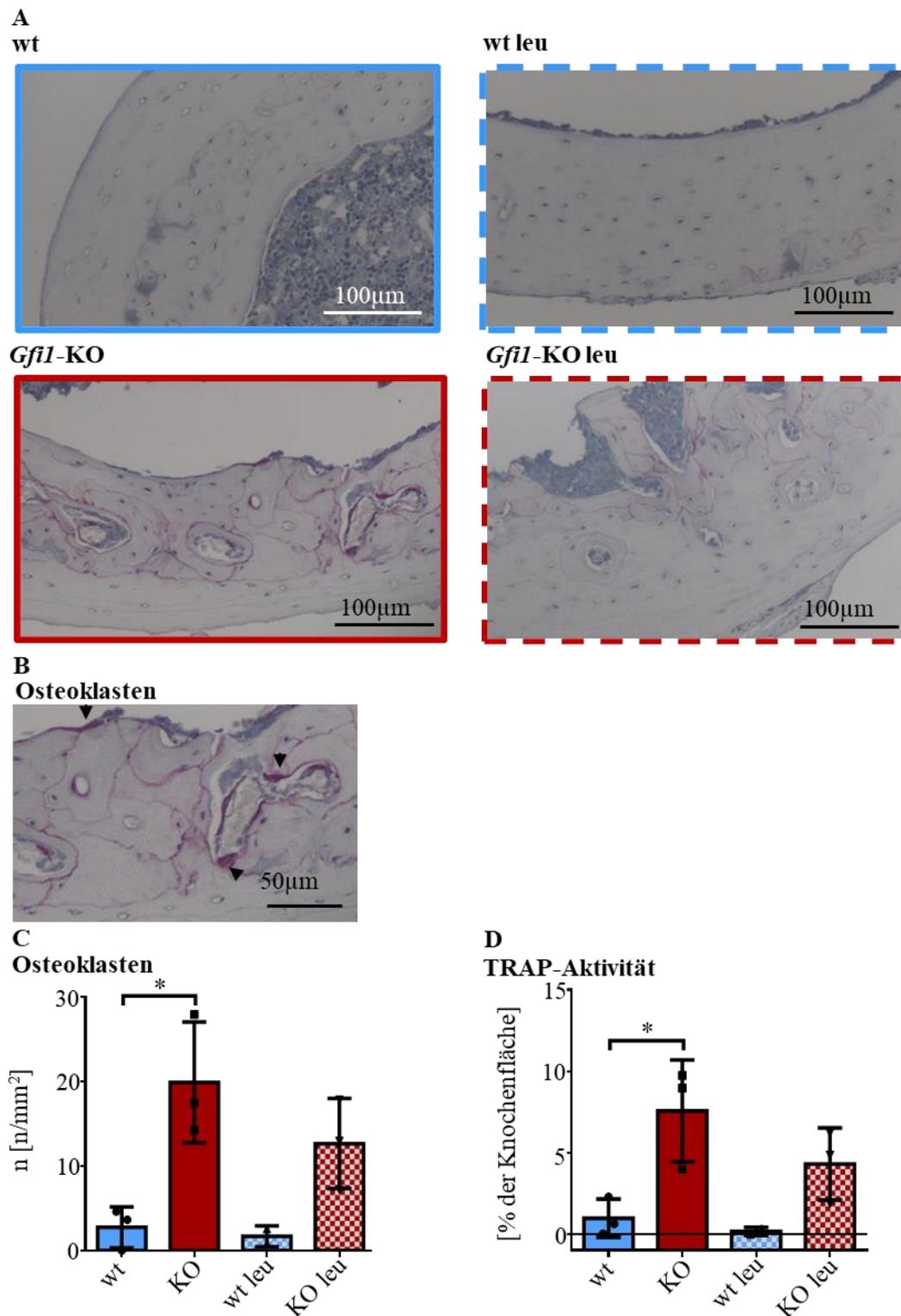


Abbildung 23: TRAP-Färbung – Osteoklastenanzahl & Osteoklastenaktivität

A Repräsentative Fotos von transversalen Femurschnitten mit TRAP-Färbung aus wt und *Gfi1*-KO Mäusen ohne und mit AML (leu). **B** Beispiel für Osteoklasten (▼). **C** Anzahl der Osteoklasten pro mm² Knochenanschnitt. **D** Anteil der TRAP-Indikator-gefärbten Knochenfläche an der Gesamtfläche des kortikalen Knochens.

4.1 *IN VITRO* DATEN

4.1.1 Die *Gfi1*-Expression in MSPC scheint vorteilhaft für AML-Blasten zu sein

Die Idee dieses Projektes beruht auf der Beobachtung unserer Arbeitsgruppe, dass immortalisierte MSPC von Patienten mit einer AML mehr *Gfi1* exprimierten als MSPC aus dem KM von Patienten mit einem Lymphom ohne KM-Befall. Dass eine solche Veränderung sich zugunsten der AML-Blasten auswirkt, ließ sich aus dem darauffolgenden Experiment ableiten. In der Kokultur von murinen AML-Blasten der Linie C1498-GFP mit MSPC oder AMSPC hemmte der KO von *Gfi1* in den AMSPC die proliferationsfördernde Wirkung auf die AML-Blasten deutlich. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die AMSPC aus Mäusen stammten, die aufgrund des Fusionsgens *Nup98-HOXD13* eine AML entwickelten, für die vorliegende Arbeit hingegen mit der *MLL-AF9*-Transduktion hauptsächlich ein anderes Modell genutzt wurde.

4.1.2 Eigenschaften der untersuchten stromalen Zellpopulation - MSPC

MSC sind definiert durch ihr adhärentes Wachstum auf beispielsweise Plastik-Oberflächen und durch ihre Fähigkeit in Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten auszudifferenzieren (Dominici et al., 2006). Außerdem tragen einige Oberflächenmarker zur Identifikation von MPSC bei.

Die in dieser Arbeit dargestellten Differenzierungsassays konnten nachweisen, dass einige der aus murinen Knochen und Knochenmark gewonnenen mesenchymalen Zellen zur Differenzierung in Osteoblasten und Adipozyten fähig sind. Es konnte nicht gezeigt werden, dass alle murinen mesenchymalen kultivierten Zellen zu dieser Differenzierung fähig sind. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Zellen zum Zeitpunkt der Differenzierungsassays zwischen Passage fünf und elf waren. Für humane MSC ist beschrieben, dass kultivierte MSPC sich von frisch isolierten MSPC unterscheiden und schon ab etwa der fünften Passage die Fähigkeit zur Differenzierung abnimmt (Bonab et al., 2006). Es ist ferner bekannt, dass MSC ihr adipogenes Differenzierungspotential länger behalten als ihr osteogenes Differenzierungspotential (Y. K. Yang et al., 2018). Ein weiterer möglicher Grund für die mangelnde Ausdifferenzierung ist, dass die Osteo- und Adipo-Differenzierungsassays aufgrund des notwendigen Transportes von Montreal nach Essen mit zuvor eingefrorenen und wiederkultivierten Zellen durchgeführt wurden. Für die anderen *in vitro* Experimente wurden bis auf eine Zelllinie primäre MSPC ohne zwischenzeitliches Einfrieren benutzt, entsprechend in niedrigeren Passagen. Zudem könnte eine Kontamination mit Zellen einer unbestimmten Linie vorliegen.

Auch wenn eine eindeutige Zuordnung der untersuchten Zellen zu MSC oder bestimmten Progenitoren mit den durchgeführten Experimenten zu dem entsprechenden Zeitpunkt nicht möglich war, so handelt es sich definitiv um stromale Zellen aus Knochen und Knochenmark. Die Plastik-Adhärenz war gegeben und die Oberflächen-Marker schlossen eine Zugehörigkeit zu

hämatoopoetischen Zellen aus, da die MSCP-Populationen CD45-negativ waren und zudem für typische MSC-Marker wie CD44, CD29, CD51 und Sca-1 positiv. Wir gehen also aufgrund des mangelnden übergreifenden Nachweises eines pluripotenten Differenzierungspotentiales von einer heterogenen Population mesenchymaler Zellen aus, weshalb von mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen (MSPC) gesprochen wird.

4.1.3 Osteogene Differenzierung in *Gfi1*-KO MSPC und *NUP98-HOXD13* AMSPC

In der Expression von Sca-1 unterschieden sich die MSPC-Populationen. Zwar exprimierten alle diesen Oberflächenmarker, jedoch wiesen die MSPC aus *Gfi1*-KO Mäusen eine schwächere Sca-1-Aktivität auf. In murinen Schädelknochen konnte gezeigt werden, dass MSPC der Sca-1-hochpositiven Fraktion vor allem in Adipozyten differenzieren, während die MSPC mit niedriger Sca-1-Expression chondrogen und osteogen ausdifferenzieren (Steenhuis et al., 2009; Steenhuis et al., 2008). Die niedrige Expression von Sca-1 auf *Gfi1*-KO MSPC könnte daher für eine beginnende Differenzierung in die osteogene Linie sprechen. Eine vollständige Differenzierung in Osteoblasten scheint hingegen durch das Ausschalten von *Gfi1* nicht zwingend ausgelöst worden zu sein, da die *Bglap*-RNA-Expression, nur in einem Ansatz erhöht war und Osteocalcin vor allem in reifen Osteoblasten vorkommt.

Hingegen wiesen *NUP98-HOXD13*-MSPC eine deutlich verminderte *Bglap*-Expression auf und auch während des Osteodifferenzierungsassays stieg sie in keinem Ansatz an. Zudem war eine tendenzielle Erhöhung von Osteopontin gegenüber dem wt zu sehen (ns), welches auch in unreifen Zellen der osteoblastischen Linie exprimiert wird. Dies deckt sich mit Beobachtungen aus verschiedenen Publikationen, in denen zwar eine Steigerung der Osteodifferenzierung in AML-assoziierten MSPC nachgewiesen wurde, jedoch auch ein Differenzierungsblock vor der Ausreifung zu reifen Osteoblasten (Battula et al., 2017; Frisch et al., 2012; Krevvata et al., 2014) .

4.1.4 Mitochondriale Funktion unter dem Einfluss von AML und *Gfi1*-Defizienz

Wir beschrieben eine erniedrigte basale mitochondriale Atmung bei *Gfi1*-KO MSPC gegenüber wt-MSPC. Auch die respiratorische Reservekapazität war geringer in *Gfi1*-KO MSPC (ns). Nach Kokultur mit AML-Blasten nahm die basale Atmung der wt MSPC tendenziell ab und die respiratorische Reservekapazität nahm nach Kokultur mit Lin⁻ KM-Zellen und AML-Blasten deutlich ab. Bei den *Gfi1*-KO MSPC waren hingegen nach Kokultur mit denselben Zellen ein tendenzieller Anstieg der basalen mitochondrialen Atmung sowie eine unveränderte respiratorische Reservekapazität zu beobachten.

Über die Auswirkungen der Interaktion von AML-Blasten und Stromazellen auf deren Metabolismus ist bisher wenig bekannt. Bezüglich der AML-Blasten ist eine Anfälligkeit für oxidativen Stress beschrieben, der wahrscheinlich daher rührt, dass sie ihre Energie hauptsächlich aus oxidativer Phosphorylierung beziehen - anders als viele andere Krebszellen, die entsprechend dem Warburg-Effekt aerobe Glykolyse betreiben (Vander Heiden et al., 2009). Zudem wurde bei AML-Blasten

eine Steigerung der mitochondrialen Masse gegenüber HSC beobachtet (Sriskanthadevan et al., 2015). Es wurde ein Transfer von Mitochondrien aus MSC in AML-Blasten beschrieben, der die erhöhte mitochondriale Masse in AML-Blasten erklärt und den Blasten eine schnellere Energieverwertung sowie einen Überlebensvorteil, insbesondere unter Chemotherapie, gewährt (Moschoi et al., 2016). Außerdem können durch die gesteigerte oxidative Phosphorylierung mehr ROS entstehen und es ist bekannt, dass AML-Blasten ROS in MSPC im KM erhöhen. ROS sind ein Treiber des mitochondrialen Transfers (Marlein et al., 2017).

Möglicherweise zeigen die wt MSPC wie beschrieben nach Einzelkultur eine höhere basale mitochondriale Aktivität sowie eine höhere Reservekapazität als nach Kokultur, weil sie einen mitochondrialen Transfer zu AML-Blasten und Lin⁻ KM-Zellen während der Kokultur zuließen, wohingegen von *Gfi1*-KO MSPC während der Kokultur kein mitochondrialer Transfer stattfände. Denn eine erniedrigte basale und insbesondere maximale mitochondriale Atmung nach Kokultur kann als indirekter Marker einer verminderten Anzahl von Mitochondrien in MSPC gesehen werden. Eine mögliche Erklärung für die konstante mitochondriale Funktion nach Kokultur bietet die Beobachtung, dass *Gfi1*-KO-MSPC vornehmlich osteogen differenzieren. Es wurde beschrieben, dass in MSPC mit der osteogenen Differenzierung die mitochondriale Masse und mitochondriale Aktivität bzw. die oxidative Phosphorylierung steigen (Forni et al., 2016; Shares et al., 2018). Wenn Zellen der osteogenen Linie selbst vermehrt Mitochondrien benötigen, wäre es möglich, dass ein geringerer Transfer von Mitochondrien stattfindet.

4.1.5 DNA-Reparatur unter dem Einfluss von AML und Gfi1-Defizienz

Die Ergebnisse der vorliegenden γ H2AX-Immunfluoreszenz-Untersuchung von murinen MSPC wiesen darauf hin, dass in wt AMSPC nach Kontakt mit dem AML-Blasten die DDSB-Reparatur beeinträchtigt ist und dass in AMSPC im Vergleich zu MSPC, die Kontakt zu gesunden KM-Zellen hatten, auch ohne Einwirkung eines externen schädigenden Faktors wie ionisierender Strahlung vermehrt DNA-Schäden vorliegen.

Zwar wiesen *Gfi1*-KO MSPC im Schnitt weniger γ H2AX Foci auf als die entsprechenden wt MSPC, die DDSB-Reparatur in *Gfi1*-KO MSPC lief nach Einzelkultur und Kokultur mit Lin⁻ Zellen aber auch langsamer ab als in den entsprechenden wt MSPC, nach zwei Stunden konnte kein Plateau erreicht werden. Die Dynamik der Foci-Anzahl pro Zelle ist aussagekräftiger als die durchschnittliche Foci-Anzahl der Gruppen zu vergleichen, auch weil eine hohe Streuung vorlag.

Es wurde für HSC und Lymphozyten bereits gezeigt, dass *Gfi1* für eine effiziente DDSB-Reparatur notwendig ist. Zum einen begrenzt *Gfi1* die p53-Aktivität und verhindert somit die Einleitung des programmierten Zelltodes, zum anderen vermittelt *Gfi1* die Methylierungen von MRE11 und 53BP1 durch die PRMT1, die dazu beitragen, dass die Proteine ihre Funktion in der HR bzw. dem Non Homologous End Joining erfüllen können (Khandanpour et al., 2013; Vadnais et al., 2018). Es konnte auch gezeigt werden, dass ein KO von *Gfi1* in HSC vermehrt zu Apoptose nach Bestrahlung führt

und dass myeloische Zellen mit einem *Gfi1*-KO eine verstärkte Expression proapoptotischer Gene aufweisen (Fraszczak et al., 2018; Khandanpour et al., 2011).

Bei der Interpretation der Daten ist zu berücksichtigen, dass die MSPC eine heterogene Zellpopulation bilden. So sahen Sugrue et al. in ihren Experimenten zur Radioresistenz in kommerziell erworbenen MSC verglichen mit hämatopoetischen Zellen eine Stunde nach Bestrahlung ein geringes γ H2AX-Signal und mit primären MSC in der Immunfluoreszenz vermehrt γ H2AX-Foci (Sugrue et al., 2013).

Die Wichtigkeit von *Gfi1* für die DNA-Reparatur in MSPC ist noch zu klären. MSPC exprimieren weniger *Gfi1* als HSC oder Lymphozyten, mit der Differenzierung nimmt der *Gfi1*-Gehalt weiter ab (Geissler et al., 2018). Da in allen Zellen DDSB auftreten, jedoch nur wenige Zellarten *Gfi1* stark exprimieren, wird davon ausgegangen, dass andere Proteine dessen Funktion ersetzen können (Vadnais et al., 2018). Dies muss bei der Interpretation der vorliegenden Ergebnisse bedacht werden.

4.2 IN VIVO DATEN

4.2.1 Aussagekraft der Knochenzell-Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie der zellulären Bestandteile zermahlener Röhrenknochen wurde nach dem Vorbild mehrerer hämatologischer Forschungsgruppen angewandt (Schepers et al., 2013; W. Wang et al., 2016). Wir führten eine Validierung mit weiblichen wt Mäuse aus den Altersgruppen <100 Tage und >160 Tage durch, in der die in weiblichen älteren Mäusen bekanntermaßen auftretende Osteoporose oder Osteopenie über eine verringerte Stromazellzahl und OBC-Anzahl nachgewiesen wurde (Glatt et al., 2007).

Unter den nicht-endothelialen CD45⁻, Lin⁻ und CD31⁻ Stromazellen war eine größere CD51⁻ und Sca1⁻ Population. Diese konnte in HE-gefärbten Zytospins der gesorteten Zellen aus diesem Gate als heterogene Population aus Knochensplintern und verschiedenen hämatopoetischen Zellen definiert werden. Folglich konnten hämatopoetische Zellen und azelluläre Knochenfragmente nicht vollständig exkludiert werden. Weitere Variablen, die sich auf die gemessene absolute Zellzahl auswirken, liegen in der recht aufwändigen Aufbereitung der Knochen. Zum Ausspülen des Knochenmarkes aus den Röhrenknochen wurden die Epiphysen abgeschnitten. Wie viel von den Metaphysen oder der Diaphyse dabei reseziert wurde, ist aufgrund der geringen Größe der Knochen variabel. In den weiteren Schritten wie Mörsern, Filtern und mehreren Zentrifugationen werden weitere Zellverluste entstanden sein. Um einige der oben erklärten Variablen auszuschalten, wurde in den Durchflusszytometrien von Knochengewebe vor allem der Anteil der OBC an der Stromazellpopulation betrachtet.

4.2.2 Repression osteogener Faktoren durch *Gfi1*

Die Knochen von Mäusen mit einem KD von humanem *GFII* oder einem KO von *Gfi1* enthielten signifikant mehr OBC als die jeweiligen Kontrollen mit normaler *Gfi1*-Expression. Dies war nicht

nur anteilig am Stroma, sondern trotz größerer Streuung auch in absoluten Zellzahlen zu beobachten. In verschiedenen Publikationen wurde ein repressiver Effekt von *Gfi1* auf osteogene Faktoren nachgewiesen. *Gfi1* reprimiert die *Runx2*-Genexpression in MSPC; der Transkriptionsfaktor sorgt in jungen Osteoprogenitoren für die Expression weiterer osteogener Proteine (D'Souza et al., 2011). Darüber hinaus reprimiert *Gfi1* auch *Spp1* (Osteopontin), welches in der Proliferationsphase von Osteoprogenitoren und in der Mineralisierungsphase von Osteoblasten exprimiert wird und für die Interaktion mit der extrazellulären Matrix sowie zur Calciumbindung notwendig ist (Wang et al., 2016). Es ist außerdem eine Überexpression von Osteopontin-Isoformen in mononukleären Knochenmarkzellen von Patienten mit AML beschrieben und es wird angenommen, dass Osteopontin zur Chemotherapieresistenz in der AML beiträgt (Mirzaei et al., 2017). In vitro konnten wir keine signifikante Steigerung der *Runx2*- oder *Spp1*-Expression durch einen *Gfi1*-KO in murinen MSPC feststellen. Auf die eingeschränkte Aussagekraft aufgrund der zu erwartenden veränderten Genexpression in Kultur wurde bereits eingegangen. Frisch isolierte Stromazellen aus Knochen und Knochenmark von *Gfi1*-KO Mäusen auf ihre *Runx2*- und *Spp1*-Expression zu untersuchen, wäre sinnvoll, um die These weitergehend zu überprüfen.

4.2.3 MLL-AF9-transplantierte Mäuse entwickelten eine AML, Blutbildinterpretation

Etwa drei Wochen nach sekundärer Transplantation von *MLL-AF9*-transduzierten KM-Zellen wiesen die Mäuse verschiedene Symptome einer AML wie Aktivitätsminderung und Bauchumfangsvermehrung als Hinweis auf eine Hepatosplenomegalie auf und es konnten in der anschließenden Analyse Nachweise der AML erbracht werden. Es wurden bei allen transplantierten Mäusen GFP⁺ *MLL-AF9*-Zellpopulationen im peripheren Blut, im KM und in der Milz detektiert. Die morphologische KM-Differenzierung von Zytospins wies einen Blastenanteil von 60-97%, durchschnittlich etwa 90%, im KM leukämischer wt und *Gfi1*-KO Mäuse nach. Im peripheren Blut wurde ein ähnlich hoher Anteil von Blasten ausgemacht.

Es fiel auf, dass in *Gfi1*-KO Mäusen mit Leukämie der Blastenanteil im Blut bei der manuellen Differenzierung etwas geringer war als im wt, der Anteil GFP⁺ Zellen war im peripheren Blut von wt Mäusen im Median fast anderthalbmal so hoch wie in *Gfi1*-KO Mäusen. Beide Unterschiede waren nicht signifikant.

Auch die im Hämogramm bei allen leukämischen Mäusen erfasste Leukozytose stützt den Nachweis einer AML. Im Hämogramm wurden außerdem eine Anämie und eine Thrombopenie in allen Mäusen mit Leukämie dokumentiert. Zudem war durchflusszytometrisch die Neutropenie im KM aller leukämischen Mäuse sichtbar. Diese Panzytopenie ist auf die gestörte Hämatopoese bei AML zurückzuführen.

Mittels durchflusszytometrischer Untersuchung des KM auf die lymphatischen Marker B220, CD8a und CD4 konnte die durch das Fusionsgen *MLL-AF9* ebenfalls mögliche Entstehung einer

lymphatischen Leukämie ausgeschlossen werden, folglich ist das Modell für den Zweck dieser Arbeit geeignet.

Es wurde eine Vervielfachung der Gr-1⁻ Mac-1⁺ Zellpopulationen in Milz und KM der leukämischen wt und *Gfi1*-KO Mäusen festgestellt. Sie wird als eine hochproliferative und invasive Monozyten-ähnliche unreife myeloische Zellpopulation beschrieben (Khandanpour et al., 2011; L. Yang et al., 2007) und enthält wahrscheinlich auch myeloische Blasten, insbesondere in dem hier genutzten Modell, da *MLL-AF9* häufig eine AML vom monozytären Typ auslöst (Caslini et al., 2000).

4.2.4 Das symptomfreie Überleben nach Transplantation

Nach Transplantation der *MLL-AF9*-Leukämiezellen mussten die *Gfi1*-KO Mäuse im Median drei Tage früher euthanasiert werden als die wt Mäuse. Die wt Mäuse wurden im Median nach 22 Tagen symptomatisch. Der Unterschied war nicht signifikant. In einer Publikation unserer Arbeitsgruppe ist ein Überlebensvorteil von *Gfi1*-KO Mäusen gegenüber *Gfi1*-wt Mäusen im *NUP98-HOXD13*-transgenen AML-Modell beschrieben (Al-Matary, 2016). Dabei war keine Bestrahlung erfolgt.

Nach subletaler Bestrahlung hingegen sterben *Gfi1*-KO Mäuse auch ohne AML vermehrt, weil *Gfi1* HSC vor stressinduzierter Apoptose zu schützen scheint (Khandanpour et al., 2011). Da die Mäuse nach Bestrahlung mit KM transplantiert wurden, das zu über 90% aus *MLL-AF9*-/ GFP-positiven Blasten bestand, waren die Mäuse auf HSC angewiesen, die der Bestrahlung standhielten. Demnach muss der Überlebensnachteil der *Gfi1*-KO Mäuse nicht zwangsläufig auf ein schnelleres Voranschreiten der AML zurückzuführen sein.

4.2.5 Geringere Infiltration extramedullärer Organe durch AML bei *Gfi1*-KO Mäusen

Bei den leukämischen Mäusen war das Milzgewicht sieben- bis achtmal größer als das Milzgewicht in der Kontrollgruppe. Die Splenomegalie zeugt von einer Infiltration leukämischer Blasten in die Milz, die wir durchflusszytometrisch nachweisen konnten. Dies ist bereits bei *MLL-AF9*-transplantierten Mäusen in unserer Arbeitsgruppe beschrieben worden (Hones et al., 2016). Die beobachtete Hepatomegalie ist am ehesten ein weiteres Zeichen extramedullärer Blasteninfiltration, wenn auch die Zellzusammensetzung der vergrößerten Lebern hier nicht untersucht wurde.

Der Verlust von *Gfi1* in den Empfängermäusen (und somit auch im Stroma) führte hier zu einer geringeren Hepatomegalie und einem geringeren Anteil GFP⁺ Zellen in der Milz als bei den transplantierten wt Mäusen. Ein Knockdown von *Gfi1* in den Blasten selbst senkt den Infiltrationsgrad der AML in Milz und Leber nicht, wie ein Mausexperiment mit Transplantation von *MLL-AF9*⁺ Blasten aus *Gfi1*-KD Mäusen oder aus wt Mäusen zeigte (Hones et al., 2016).

4.2.6 *Gfi1*-KO Mäuse wiesen mehr OBC auf – mit und ohne AML

Es fiel ein erhöhter Anteil an OBC in *Gfi1*-KO Mäusen auf, dies war bei Mäusen mit Leukämie besonders ausgeprägt.

In wt Mäusen mit Leukämie waren absolut sowie prozentual gleichviele OBC wie in den gesunden wt Mäusen nachzuweisen. In mehreren Publikationen ist jedoch beschrieben, dass AML-Zellen zu einer Ansammlung von OBC in der leukämischen Nische führen, weil die AML-Blasten eine osteogene Differenzierung in MSPC induzieren und zugleich die Reifung der Osteoprogenitoren zu Osteoblasten mit Mineralisierungsfähigkeit hemmen (Battula et al., 2017; Chen et al., 2020; Hanoun et al., 2014). Es gibt jedoch auch Untersuchungen, die eine verminderte Anzahl OBC in einem Mausmodell einer AML beschreiben (Frisch et al., 2012).

Die Dichte der Osteozyten pro mm² in den histologischen Schnitten unterschied sich weder zwischen wt und *Gfi1*-KO noch zwischen gesund und leukämisch. Allerdings wurde bisher nur eine Veränderung in Osteoprogenitoren und eine konsekutive Verminderung der Osteoblasten bei AML beschrieben, jedoch nicht in Osteozyten (Raaijmakers et al., 2010). Eine Quantifizierung der Osteoblasten ließ die Qualität der histologischen Schnitte wegen Absplitterungen am Periost und Mitnahme endostealer Osteoblasten bei Schrumpfung des Knochenmarkes nicht zu.

4.2.7 Dicker und poröser kortikaler Knochen in leukämischen *Gfi1*-KO Mäusen

Die kortikale Knochendicke war in *Gfi1*-KO Mäusen mit und ohne AML verglichen mit dem jeweiligen wt höher. Dies war für die leukämischen Mäuse sowohl im μ CT als auch in der Knochenhistologie zu sehen. In der Kontrollgruppe war dies nur in der Histologie zu sehen. Die Beobachtung legt nahe, dass nicht nur Osteoprogenitoren, sondern auch reife Osteoblasten in *Gfi1*-KO Mäusen, insbesondere mit Leukämie erhöht sind. Wie oben erwähnt (s. Kapitel 4.1.1) ist bekannt, dass *Gfi1* die Expression der osteogenen Faktoren *Runx2*, *Bglap* (Osteocalcin), *Sp7* (Osterix) und *Spp1* (Osteopontin) reprimiert (Y. G. Wang et al., 2016).

Vor diesem Hintergrund unerwartet war die erhöhte kortikale Porosität bei *Gfi1*-KO Mäusen im μ CT und in den histologischen Schnitten. Auch hier war die Ausprägung unter leukämischen Bedingungen stärker. In einem Mausmodell für schwere kongenitale Neutropenie durch ein KO von *Gfi1* wurde im trabekulären Knochen und kortikalen Knochen ebenfalls eine verminderte Relation von Knochenvolumen zu Gewebenvolumen festgestellt und dabei ging eine hohe inflammatorische Aktivität bei Pathogen-Exposition mit erhöhtem Knochenverlust einher (Geissler et al., 2018). Unsere Daten zeigten zwar keine Veränderungen im trabekulären Knochen von *Gfi1*-KO Mäusen gegenüber wt Mäusen, sondern nur im kortikalen Knochen, es ist aber eine Parallele zum stärkeren Knochenverlust bei inflammatorischer Aktivität unter *Gfi1*-KO zu der hier untersuchten leukämischen Aktivität unter KO von *Gfi1* zu sehen. Denn myeloische Neoplasien induzieren ein inflammatorisches Milieu in der KM-Nische (Habbel et al., 2020; Schepers et al., 2013).

4.2.8 Steigerung des Knochenmetabolismus in *Gfi1*-KO Mäusen mit AML

Der vermeintliche Widerspruch einer erhöhten Porosität und einer erhöhten Osteoblastenzahl und -aktivität, gemessen an der Dicke des kortikalen Knochens und angedeutet durch den gesteigerten

OBC-Anteil in Knochen von *Gfi1*-KO Mäusen, ließ sich mit einem Blick auf die Aktivität der Osteoblasten und Osteoklasten aufklären.

Die BFR war im kortikalen Knochen von leukämischen *Gfi1*-KO Mäusen mehr als doppelt so hoch wie in denen von wt Mäusen mit oder ohne Leukämie, deren BFR sich nicht unterschied. Die BFR in *Gfi1*-KO Mäusen ohne Leukämie konnte mangels verfügbaren *Gfi1*-KO Mäusen nicht gemessen werden. Eine erhöhte BFR ist entweder auf eine Vermehrung von Osteoblasten, auf eine gesteigerte Aktivität derselben oder auf eine Kombination dieser Faktoren zurückzuführen. In dem bereits erwähnten Mausmodell zur schweren kongenitalen Neutropenie war in den Mäusen, die zunächst unter SPF-Konditionen gehalten wurden und danach Pathogenen ausgesetzt wurden, eine vermehrte Osteoblastenzahl und eine gesteigerte Expression von osteogenen Marken wie *Collagen1*, *Runx2*, *Osterix* und *Spp1* im kortikalen Knochen zu beobachten, wohingegen *Gfi1*-KO Mäuse, die immer unter nicht-SFP-Konditionen gehalten wurden, weniger Osteoblasten und weniger osteogene Marker aufwiesen als wt Mäuse (Geissler et al., 2018). Die Gruppe der zunächst unter SPF-Konditionen gehaltenen und erst im Verlauf in nicht-SPF Räume umgesetzten *Gfi1*-KO Mäuse ist besser mit unserem AML-Modell vergleichbar als die ab Geburt unter nicht-SPF-Konditionen gehaltene Gruppe, weil die Leukämie in unserem Modell auch erst im Verlauf induziert wurde.

Neben der erhöhten BFR sahen wir in *Gfi1*-KO Mäusen insbesondere ohne aber tendenziell auch mit AML eine gesteigerte Anzahl und Aktivität von Osteoklasten. Auch Geissler et al. beschrieben in der Gruppe der zunächst unter SPF-, dann unter nicht-SPF-Konditionen gehaltenen *Gfi1*-KO Mäuse, ebenso wie bei stetig unter SPF-Konditionen gehaltenen Mäusen, eine gegenüber wt Mäusen erhöhte Anzahl von Osteoklasten und eine gesteigerte Expression von Osteoklasten-bezogenen Genen (Geissler et al., 2018).

Mit dem Nachweis einer gesteigerten Knochenbildung durch Osteoblasten nebst einer gesteigerten Knochenresorption durch Osteoklasten kann das gleichzeitige Vorliegen einer Verdickung mit einer gesteigerten Porosität im kortikalen Knochen der *Gfi1*-KO Mäuse erklärt werden. Das Fehlen von *Gfi1* führt also, insbesondere unter Einfluss inflammatorischer Signale – durch Pathogenlast oder Leukämie – zu einem allgemein gesteigerten Knochenstoffwechsel.

4.2.9 Knochenmetabolismus in wt Mäusen mit AML

Dass die Osteoklasten und ihre Aktivität in wt Mäusen durch die AML nicht anstiegen, entspricht Beobachtungen anderer Gruppen. Auch differenzieren AML-Zellen nicht in Osteoklasten und Osteoklasten beeinflussen die AML-Progression nicht (Frisch et al., 2012; Krevvata et al., 2014; Schepers et al., 2013).

Unsere Daten zeigten keinen Abfall der kortikalen BFR in wt Mäusen durch AML. Dies ist konträr zur vorherrschenden Ansicht, dass AML-Blasten einen Differenzierungsstopp in Osteoprogenitoren auslösen und die Knochenbildung beeinträchtigt wird. Es wurde in KM und in Röhrenknochen von Mäusen nach AML-Transplantation, sowie in KM-Proben von AML-Patienten eine Reduktion der

Bglap (Osteocalcin)-Expression festgestellt (Chen et al., 2020; Krevvata et al., 2014). Osteocalcin wird als Marker für Osteoblastenaktivität verwendet.

Allerdings konnten wir in zwei von drei wt Mäusen einen Verlust von trabekulärem Knochen beobachten, wie er in der Literatur beschrieben ist (Frisch et al., 2012; Hanoun et al., 2014; Krevvata et al., 2014). Die dritte wt Maus mit AML hingegen wies eine erhöhte Trabekelzahl und ein erhöhtes trabekuläres Knochenvolumen auf. Bei den *Gfi1*-KO Mäusen mit AML hingegen zeigten zwei von drei Mäusen einen Anstieg von trabekulärem Knochenvolumen und Trabekelzahl.

Bei der Interpretation müssen die Ausreißer und die geringe Anzahl an Replikaten berücksichtigt werden. Jedoch weist die Beobachtung in Zusammenschau mit dem oben beschriebenen erhöhten Knochenmetabolismus und insbesondere der erhöhten Osteoblastenaktivität in *Gfi1*-KO Mäusen darauf hin, dass das Ausschalten von *Gfi1* in den mesenchymalen Zellen der Reduktion reifer Osteoblasten durch die AML entgegenwirken könnte.

4.3 BEDEUTUNG DER ARBEIT UND AUSBLICK

4.3.1 Möglicher Nutzen eines KO von *Gfi1* in der KM-Nische bei AML

AML induziert nicht nur eine verminderte Anzahl und Aktivität von Osteoblasten, unter diesen Bedingungen in der KM-Nische kommt es auch zu einem rascheren Anwachsen der AML im Mausmodell, und das AML-freie Überleben der Mäuse ist bei niedriger Osteoblastenaktivität verringert (Krevvata et al., 2014). Die Beobachtung, dass niedrige Serum-Osteocalcin-Level, die eine niedrige Osteoblasten-Aktivität anzeigen, mit einer signifikant schlechteren Prognose in Patienten mit AML einhergeht, unterstreicht die Relevanz von Osteoblasten für neue zielgerichtete Therapie in der AML (Chen et al., 2020). Durch Steigerung der Osteoblasten-Anzahl mittels eines Serotonin-Inhibitors in einem Mausmodell für AML konnte nicht nur die Reduktion von trabekulärem Knochenvolumen verhindert, sondern auch die Leukämie-Progression reduziert und die gestörte Hämatopoese teilweise saniert werden (Krevvata et al., 2014). Ebenso könnte die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Steigerung der Knochenbildung in *Gfi1*-KO Mäusen der Leukämie-Progression entgegenwirken. Ein Indiz dafür sind die geringeren Zahlen myeloischer Blasten in Milz und peripherem Blut. Zwar konnten wir hier keinen Überlebensvorteil von *Gfi1*-KO Mäusen mit AML gegenüber wt Mäusen zeigen, in zwei früheren Mausmodellen humaner AML unserer Arbeitsgruppe aber überlebten *Gfi1*-KO Mäuse signifikant länger als wt Mäuse; auch war die Leukämiebelastung im peripheren Blut und im Knochenmark von *Gfi1*-KO Mäusen geringer als in *Gfi1*-wt Mäusen (Y. S. Al-Matary et al., 2016). Begründet wurde die geringere Leukämiebelastung mit der Umwandlung von Makrophagen in AML-assoziierte Makrophagen unter Mitwirkung von *Gfi1* (Al-Matary et al., 2016). Jedoch könnten, wie die vorliegende Arbeit zeigt, die Veränderungen in der osteogenen Nische durch Ausschalten von *Gfi1* zusätzliche Faktoren für eine geringere Leukämiebelastung in *Gfi1*-KO Mäusen sein.

Für das Multiple Myelom wurde ein KO von *Gfi1* in BMSC bereits als ein möglicher therapeutischer Ansatz beschrieben. Nachdem in MSC von Patienten mit einem Multiplen Myelom eine erhöhte Expression von *Gfi1* beobachtet wurde, konnte gezeigt werden, dass ein KO von *Gfi1* in BMSC in vitro die MSC resistent gegenüber der Osteoblasten-Repression durch Multiple-Myelom-Zellen macht (D'Souza et al., 2011).

Es ist daher lohnenswert, weitere Untersuchungen anzustrengen, ob ein KO von *Gfi1* in Osteoprogenitoren die Osteoblastenaktivität ausreichend erhöht, um einen möglichen therapeutischen Effekt gegen AML-Blasten zu haben. Dafür wären Mausmodelle mit einem selektiven KO von *Gfi1* in Osteoprogenitoren geeignet.

4.3.2 Gfi1 beeinflusst die Regulation des Knochenstoffwechsels

Abseits der hämatologischen Forschung zur AML, trägt diese Arbeit zur Grundlagenforschung bezüglich des Knochenstoffwechsels bei. Sie bietet neue Hinweise auf eine zentrale Rolle des Transkriptionsfaktors *Gfi1* in der Regulation der Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten, insbesondere im kortikalen Knochen. Bisher ist, unserer Kenntnis nach, nur wenig darüber bekannt: *Gfi1* wird kaum im kortikalen Knochen exprimiert, aber in MSPC und Osteoprogenitoren und die *Gfi1*-Expression sinkt mit osteogener Differenzierung (Geissler et al., 2018). Außerdem hemmt *Gfi1* die Expression von *Runx2* und Osteopontin (D'Souza et al., 2011; Y. G. Wang et al., 2016). *In vivo* wurde bisher hauptsächlich die Auswirkung auf den trabekulären Knochen beschrieben und auch nur unter Pathogen-Last (Geissler et al., 2018). Die Erkenntnisse von Geissler et al. decken sich teilweise mit unseren. Neu ist jedoch die Beschreibung der erhöhten Porosität und erhöhten Dicke des kortikalen Knochens sowie die direkten Nachweise einer erhöhten Osteoblastenaktivität über die BFR und einer erhöhten Osteoklasten-Aktivität über TRAP-Färbung.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das vorliegende Projekt hatte das Ziel, einen Überblick über die Auswirkungen des Transkriptionsfaktors Growth factor independence 1 (Gfi1) auf die Stroma-Leukämie-Interaktion bei akuter myeloischer Leukämie (AML) zu schaffen. Dies beruhte auf der Beobachtung einer Überexpression von *Gfi1* in immortalisierten mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen (MSPC) aus Patienten mit AML und der Beobachtung, dass das Ausschalten von *Gfi1* in murinen MSPC deren wachstumsfördernden Effekt auf eine murine AML-Zelllinie schmälerte. Die weiteren Analysen offenbarten verschiedene Mechanismen der Interaktion von AML-Blasten und MSPC, die Gfi1-abhängig sind. *Gfi1*-defiziente murine MSPC wiesen eine geringere mitochondriale respiratorische Reservekapazität auf als wildtyp (wt) MSPC, diese blieb aber bei Kokultur konstant, wohingegen die Reservekapazität bei wt MSPC unter Kokulturbedingungen mit gesunden Knochenmarkzellen oder AML-Blasten abnahm. Dies ist ein Hinweis darauf, dass *Gfi1*-knockout (KO) MSPC möglicherweise keine Mitochondrien an AML-Zellen transferieren. Bei Betrachtung der Desoxyribonukleinsäure- (DNA-) Reparatur-Kapazität muriner *Gfi1*-KO MSPC fiel auf, dass sie insgesamt weniger DNA-Schäden, gleichzeitig aber eine verlangsamte DNA-Reparatur gegenüber dem wt aufwiesen. Die Kokultur mit AML-Zellen hatte keine negative Auswirkung auf die DNA-Reparatur der *Gfi1*-KO MSPC, bei wt MSPC hingegen war die DNA-Reparatur nach Kontakt zu AML beeinträchtigt.

Der letzte Teil der Arbeit widmet sich der osteogenen Differenzierung von MSPC. Der Nachweis einer stärkeren Population aktiver Osteoblasten sowie der erhöhten kortikalen Dicke in *Gfi1*-KO Mäusen war gut vereinbar mit der vorbeschriebenen inhibierenden Wirkung von Gfi1 auf die osteogene Proteinexpression. Dass zugleich die Porosität im kortikalen Knochen von *Gfi1*-KO Mäusen gegenüber dem wt deutlich erhöht war, ließ sich durch einen insgesamt verstärkten Knochenstoffwechsel in *Gfi1*-KO Mäusen erklären. Sowohl die Knochenbildungsrate als auch die Osteoklastenzahl und deren Aktivität waren in Mäusen mit einem *Gfi1*-KO gegenüber dem wt erhöht. Dies war bei Vorliegen einer AML besonders ausgeprägt.

Weitere Effekte des Ausschaltens von *Gfi1*-KO waren eine geringere Infiltration der Milz durch AML-Blasten und eine geringere Hepatomegalie in leukämischen *Gfi1*-KO Mäusen gegenüber wt Mäusen mit AML, wenngleich unserer Versuchsreihe keinen Überlebensvorteil durch den *Gfi1*-KO ergab.

Diese Arbeit zeigt, dass der Transkriptionsfaktor Gfi1 eine Rolle in der AML-Nische spielt und regt zu genaueren Untersuchung seiner Auswirkungen auf stromale Zellen an.

6 LITERATUR

1. Aiuti, A., Webb, I. J., Bleul, C., Springer, T., Gutierrez-Ramos, J. C. (1997): The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med* 185, 111-120.
2. Al-Matary, Y. S., Botezatu, L., Opalka, B., Hones, J. M., Lams, R. F., Thivakaran, A., Schutte, J., Koster, R., Lennartz, K., Schroeder, T., Haas, R., Duhrsen, U., Khandanpour, C. (2016): Acute myeloid leukemia cells polarize macrophages towards a leukemia supporting state in a Growth factor independence 1 dependent manner. *Haematologica* 101, 1216-1227.
3. Al-Matary, Y. S. A. (2018). *The role of stroma in the development of acute myeloid leukemia (AML)*. (Dissertation), Universität Duisburg-Essen
Essen.
4. Baryawno, N., Przybylski, D., Kowalczyk, M. S., Kfoury, Y., Severe, N., Gustafsson, K., Kokkalis, K. D., Mercier, F., Tabaka, M., Hofree, M., Dionne, D., Papazian, A., Lee, D., Ashenberg, O., Subramanian, A., Vaishnav, E. D., Rozenblatt-Rosen, O., Regev, A., Scadden, D. T. (2019): A Cellular Taxonomy of the Bone Marrow Stroma in Homeostasis and Leukemia. *Cell* 177, 1915-1932.e1916.
5. Battula, V. L., Le, P. M., Sun, J. C., Nguyen, K., Yuan, B., Zhou, X., Sonnylal, S., McQueen, T., Ruvolo, V., Michel, K. A., Ling, X., Jacamo, R., Shpall, E., Wang, Z., Rao, A., Al-Atrash, G., Konopleva, M., Davis, R. E., Harrington, M. A., Cahill, C. W., Bueso-Ramos, C., Andreeff, M. (2017): AML-induced osteogenic differentiation in mesenchymal stromal cells supports leukemia growth. *JCI Insight* 2
6. Blau, O., Baldus, C. D., Hofmann, W. K., Thiel, G., Nolte, F., Burmeister, T., Türkmen, S., Benlasfer, O., Schumann, E., Sindram, A., Molkentin, M., Mundlos, S., Keilholz, U., Thiel, E., Blau, I. W. (2011): Mesenchymal stromal cells of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia patients have distinct genetic abnormalities compared with leukemic blasts. *Blood* 118, 5583-5592.
7. Bonab, M. M., Alimoghaddam, K., Talebian, F., Ghaffari, S. H., Ghavamzadeh, A., Nikbin, B. (2006): Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biol* 7, 14.
8. Boyer, M. W., Orchard, P. J., Gorden, K. B., Anderson, P. M., McLvor, R. S., Blazar, B. R. (1995): Dependency on intercellular adhesion molecule recognition and local interleukin-2 provision in generation of an in vivo CD8+ T-cell immune response to murine myeloid leukemia. *Blood* 85, 2498-2506.
9. Calvi, L. M., Adams, G. B., Weibrecht, K. W., Weber, J. M., Olson, D. P., Knight, M. C., Martin, R. P., Schipani, E., Divieti, P., Bringhurst, F. R., Milner, L. A., Kronenberg, H. M., Scadden, D. T. (2003): Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425, 841-846.

10. Caslini, C., Alarcòn, A. S., Hess, J. L., Tanaka, R., Murti, K. G., Biondi, A. (2000): The amino terminus targets the mixed lineage leukemia (MLL) protein to the nucleolus, nuclear matrix and mitotic chromosomal scaffolds. *Leukemia* 14, 1898-1908.
11. Chen, Y., Hoffmeister, L. M., Zaun, Y., Arnold, L., Schmid, K. W., Giebel, B., Klein-Hitpass, L., Hanenberg, H., Squire, A., Reinhardt, H. C., Dührsen, U., Bertram, S., Hanoun, M. (2020): Acute myeloid leukemia-induced remodeling of the human bone marrow niche predicts clinical outcome. *Blood Adv* 4, 5257-5268.
12. Chitteti, B. R., Cheng, Y. H., Streicher, D. A., Rodriguez-Rodriguez, S., Carlesso, N., Srour, E. F., Kacena, M. A. (2010): Osteoblast lineage cells expressing high levels of Runx2 enhance hematopoietic progenitor cell proliferation and function. *J Cell Biochem* 111, 284-294.
13. Chowdhury, D., Keogh, M. C., Ishii, H., Peterson, C. L., Buratowski, S., Lieberman, J. (2005): gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. *Mol Cell* 20, 801-809.
14. D'Souza, S., del Prete, D., Jin, S., Sun, Q., Huston, A. J., Kostov, F. E., Sammut, B., Hong, C. S., Anderson, J. L., Patrene, K. D., Yu, S., Velu, C. S., Xiao, G., Grimes, H. L., Roodman, G. D., Galson, D. L. (2011): Gfi1 expressed in bone marrow stromal cells is a novel osteoblast suppressor in patients with multiple myeloma bone disease. *Blood* 118, 6871-6880.
15. Dobson, C. L., Warren, A. J., Pannell, R., Forster, A., Lavenir, I., Corral, J., Smith, A. J., Rabbitts, T. H. (1999): The mll-AF9 gene fusion in mice controls myeloproliferation and specifies acute myeloid leukaemogenesis. *Embo j* 18, 3564-3574.
16. Döhner, H., Weisdorf, D. J., Bloomfield, C. D. (2015): Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 373, 1136-1152.
17. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., Horwitz, E. (2006): Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317.
18. Ferrando, A. (2010): NOTCH mutations as prognostic markers in T-ALL. *Leukemia* 24, 2003-2004.
19. Fiolka, K., Hertzano, R., Vassen, L., Zeng, H., Hermesh, O., Avraham, K. B., Dührsen, U., Moroy, T. (2006): Gfi1 and Gfi1b act equivalently in haematopoiesis, but have distinct, non-overlapping functions in inner ear development. *EMBO Rep* 7, 326-333.
20. Forni, M. F., Pelligia, J., Trudeau, K., Shirihai, O., Kowaltowski, A. J. (2016): Murine Mesenchymal Stem Cell Commitment to Differentiation Is Regulated by Mitochondrial Dynamics. *Stem Cells* 34, 743-755.

21. Fraszczak, J., Vadnais, C., Rashkovan, M., Ross, J., Beauchemin, H., Chen, R., Grapton, D., Khandanpour, C., Moroy, T. (2018): Reduced expression but not deficiency of GFI1 causes a fatal myeloproliferative disease in mice. *Leukemia*
22. Frisch, B. J., Ashton, J. M., Xing, L., Becker, M. W., Jordan, C. T., Calvi, L. M. (2012): Functional inhibition of osteoblastic cells in an in vivo mouse model of myeloid leukemia. *Blood* 119, 540-550.
23. Garrido, S. M., Appelbaum, F. R., Willman, C. L., Banker, D. E. (2001): Acute myeloid leukemia cells are protected from spontaneous and drug-induced apoptosis by direct contact with a human bone marrow stromal cell line (HS-5). *Exp Hematol* 29, 448-457.
24. Geissler, S., Textor, M., Stumpp, S., Seitz, S., Lekaj, A., Brunk, S., Klaassen, S., Schinke, T., Klein, C., Mundlos, S., Kornak, U., Kuhnisch, J. (2018): Loss of murine Gfi1 causes neutropenia and induces osteoporosis depending on the pathogen load and systemic inflammation. *PLoS One* 13, e0198510.
25. Glatt, V., Canalis, E., Stadmeier, L., Bouxsein, M. L. (2007): Age-related changes in trabecular architecture differ in female and male C57BL/6J mice. *J Bone Miner Res* 22, 1197-1207.
26. Grimes, H. L., Chan, T. O., Zweidler-McKay, P. A., Tong, B., Tschlis, P. N. (1996): The Gfi-1 proto-oncoprotein contains a novel transcriptional repressor domain, SNAG, and inhibits G1 arrest induced by interleukin-2 withdrawal. *Mol Cell Biol* 16, 6263-6272.
27. Habel, J., Arnold, L., Chen, Y., Möllmann, M., Bruderek, K., Brandau, S., Dührsen, U., Hanoun, M. (2020): Inflammation-driven activation of JAK/STAT signaling reversibly accelerates acute myeloid leukemia in vitro. *Blood Adv* 4, 3000-3010.
28. Hamidouche, Z., Rother, K., Przybilla, J., Krinner, A., Clay, D., Hopp, L., Fabian, C., Stolzing, A., Binder, H., Charbord, P., Galle, J. (2017): Bistable Epigenetic States Explain Age-Dependent Decline in Mesenchymal Stem Cell Heterogeneity. *Stem Cells* 35, 694-704.
29. Hanoun, M., Zhang, D., Mizoguchi, T., Pinho, S., Pierce, H., Kunisaki, Y., Lacombe, J., Armstrong, S. A., Dührsen, U., Frenette, P. S. (2014): Acute myelogenous leukemia-induced sympathetic neuropathy promotes malignancy in an altered hematopoietic stem cell niche. *Cell Stem Cell* 15, 365-375.
30. Hock, H., Hamblen, M. J., Rooke, H. M., Traver, D., Bronson, R. T., Cameron, S., Orkin, S. H. (2003): Intrinsic requirement for zinc finger transcription factor Gfi-1 in neutrophil differentiation. *Immunity* 18, 109-120.
31. Holzenberger, M., Lenzner, C., Leneuve, P., Zaoui, R., Hamard, G., Vaultont, S., Bouc, Y. L. (2000): Cre-mediated germline mosaicism: a method allowing rapid generation of several alleles of a target gene. *Nucleic Acids Res* 28, E92.

32. Hones, J. M., Botezatu, L., Helness, A., Vadnais, C., Vassen, L., Robert, F., Hergenhan, S. M., Thivakaran, A., Schutte, J., Al-Matary, Y. S., Lams, R. F., Fraszczak, J., Makishima, H., Radivoyevitch, T., Przychodzen, B., da Conceicao Castro, S. V., Gorgens, A., Giebel, B., Klein-Hitpass, L., Lennartz, K., Heuser, M., Thiede, C., Ehninger, G., Duhrsen, U., Maciejewski, J. P., Moroy, T., Khandanpour, C. (2016): GFI1 as a novel prognostic and therapeutic factor for AML/MDS. *Leukemia* 30, 1237-1245.
33. Hsu, H., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Solovyev, I., Colombero, A., Timms, E., Tan, H. L., Elliott, G., Kelley, M. J., Sarosi, I., Wang, L., Xia, X. Z., Elliott, R., Chiu, L., Black, T., Scully, S., Capparelli, C., Morony, S., Shimamoto, G., Bass, M. B., Boyle, W. J. (1999): Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3540-3545.
34. Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., Zumla, A. (2005): Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* 6, 279-284.
35. Jacoby, M. A., De Jesus Pizarro, R. E., Shao, J., Koboldt, D. C., Fulton, R. S., Zhou, G., Wilson, R. K., Walter, M. J. (2014): The DNA double-strand break response is abnormal in myeloblasts from patients with therapy-related acute myeloid leukemia. *Leukemia* 28, 1242-1251.
36. Juliusson, G., Lazarevic, V., Hörstedt, A.-S., Hagberg, O., Höglund, M., Group, f. t. S. A. L. R. (2012): Acute myeloid leukemia in the real world: why population-based registries are needed. *Blood* 119, 3890-3899.
37. Karsunky, H., Zeng, H., Schmidt, T., Zevnik, B., Kluge, R., Schmid, K. W., Duhrsen, U., Moroy, T. (2002): Inflammatory reactions and severe neutropenia in mice lacking the transcriptional repressor Gfi1. *Nat Genet* 30, 295-300.
38. Khandanpour, C., Kosan, C., Gaudreau, M. C., Dührsen, U., Hébert, J., Zeng, H., Möröy, T. (2011): Growth factor independence 1 protects hematopoietic stem cells against apoptosis but also prevents the development of a myeloproliferative-like disease. *Stem Cells* 29, 376-385.
39. Khandanpour, C., Krongold, J., Schütte, J., Bouwman, F., Vassen, L., Gaudreau, M. C., Chen, R., Calero-Nieto, F. J., Diamanti, E., Hannah, R., Meyer, S. E., Grimes, H. L., van der Reijden, B. A., Jansen, J. H., Patel, C. V., Peeters, J. K., Löwenberg, B., Dührsen, U., Göttgens, B., Möröy, T. (2012): The human GFI136N variant induces epigenetic changes at the Hoxa9 locus and accelerates K-RAS driven myeloproliferative disorder in mice. *Blood* 120, 4006-4017.
40. Khandanpour, C., Phelan, J. D., Vassen, L., Schütte, J., Chen, R., Horman, S. R., Gaudreau, M. C., Krongold, J., Zhu, J., Paul, W. E., Dührsen, U., Göttgens, B., Grimes, H. L., Möröy, T. (2013): Growth factor independence 1 antagonizes a p53-induced DNA damage response pathway in lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 23, 200-214.

41. Khandanpour, C., Thiede, C., Valk, P. J., Sharif-Askari, E., Nüchel, H., Lohmann, D., Horsthemke, B., Siffert, W., Neubauer, A., Grzeschik, K. H., Bloomfield, C. D., Marcucci, G., Maharry, K., Slovak, M. L., van der Reijden, B. A., Jansen, J. H., Schackert, H. K., Afshar, K., Schnittger, S., Peeters, J. K., Kroschinsky, F., Ehninger, G., Lowenberg, B., Dührsen, U., Möry, T. (2010): A variant allele of Growth Factor Independence 1 (GFI1) is associated with acute myeloid leukemia. *Blood* 115, 2462-2472.
42. Kode, A., Manavalan, J. S., Mosialou, I., Bhagat, G., Rathinam, C. V., Luo, N., Khiabani, H., Lee, A., Murty, V. V., Friedman, R., Brum, A., Park, D., Galili, N., Mukherjee, S., Teruya-Feldstein, J., Raza, A., Rabadan, R., Berman, E., Kousteni, S. (2014): Leukaemogenesis induced by an activating β -catenin mutation in osteoblasts. *Nature* 506, 240-244.
43. Kong, Y. Y., Yoshida, H., Sarosi, I., Tan, H. L., Timms, E., Capparelli, C., Morony, S., Oliveira-dos-Santos, A. J., Van, G., Itie, A., Khoo, W., Wakeham, A., Dunstan, C. R., Lacey, D. L., Mak, T. W., Boyle, W. J., Penninger, J. M. (1999): OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 397, 315-323.
44. Konopleva, M., Konoplev, S., Hu, W., Zaritsky, A. Y., Afanasiev, B. V., Andreeff, M. (2002): Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins. *Leukemia* 16, 1713-1724.
45. Krevvata, M., Silva, B. C., Manavalan, J. S., Galan-Diez, M., Kode, A., Matthews, B. G., Park, D., Zhang, C. A., Galili, N., Nickolas, T. L., Dempster, D. W., Dougall, W., Teruya-Feldstein, J., Economides, A. N., Kalajzic, I., Raza, A., Berman, E., Mukherjee, S., Bhagat, G., Kousteni, S. (2014): Inhibition of leukemia cell engraftment and disease progression in mice by osteoblasts. *Blood* 124, 2834-2846.
46. Krivtsov, A. V., Twomey, D., Feng, Z., Stubbs, M. C., Wang, Y., Faber, J., Levine, J. E., Wang, J., Hahn, W. C., Gilliland, D. G., Golub, T. R., Armstrong, S. A. (2006): Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature* 442, 818-822.
47. Lennartz, K., Lu, M., Flasshove, M., Moritz, T., Kirstein, U. (2005): Improving the biosafety of cell sorting by adaptation of a cell sorting system to a biosafety cabinet. *Cytometry A* 66, 119-127.
48. Lian, J. B., Javed, A., Zaidi, S. K., Lengner, C., Montecino, M., van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Stein, G. S. (2004): Regulatory controls for osteoblast growth and differentiation: role of Runx/Cbfa/AML factors. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 14, 1-41.
49. Lin, Y. W., Slape, C., Zhang, Z., Aplan, P. D. (2005): NUP98-HOXD13 transgenic mice develop a highly penetrant, severe myelodysplastic syndrome that progresses to acute leukemia. *Blood* 106, 287-295.

50. Lüllmann-Rauch, R., Asan, E. (2019a). Blut und Blutbildung. In: R. Lüllmann-Rauch, E. Asan (Hrsg.): Taschenlehrbuch Histologie. 6., vollständig überarbeitete Auflage Aufl.: Georg Thieme Verlag
51. Lüllmann-Rauch, R., Asan, E. (2019b). Herkunft der Blutzellen. In: R. Lüllmann-Rauch, E. Asan (Hrsg.): Taschenlehrbuch Histologie. 6., vollständig überarbeitete Auflage Aufl.: Georg Thieme Verlag
52. Marlein, C. R., Zaitseva, L., Piddock, R. E., Robinson, S. D., Edwards, D. R., Shafat, M. S., Zhou, Z., Lawes, M., Bowles, K. M., Rushworth, S. A. (2017): NADPH oxidase-2 derived superoxide drives mitochondrial transfer from bone marrow stromal cells to leukemic blasts. *Blood* 130, 1649-1660.
53. Maurer, B., Kollmann, S., Pickem, J., Hoelbl-Kovacic, A., Sexl, V. (2019): STAT5A and STAT5B-Twins with Different Personalities in Hematopoiesis and Leukemia. *Cancers (Basel)* 11
54. Menea, C., Kurihara, N., Roodman, G. D. (2000): CFU-GM-derived cells form osteoclasts at a very high efficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 267, 943-946.
55. Méndez-Ferrer, S., Lucas, D., Battista, M., Frenette, P. S. (2008): Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature* 452, 442-447.
56. Minkin, C. (1982): Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif Tissue Int* 34, 285-290.
57. Mirzaei, A., Mohammadi, S., Ghaffari, S. H., Nikbakht, M., Bashash, D., Alimoghaddam, K., Ghavamzadeh, A. (2017): Osteopontin b and c isoforms: Molecular Candidates Associated with Leukemic Stem Cell Chemoresistance in Acute Myeloid Leukemia. *Asian Pac J Cancer Prev* 18, 1707-1715.
58. Moschoi, R., Imbert, V., Nebout, M., Chiche, J., Mary, D., Prebet, T., Saland, E., Castellano, R., Pouyet, L., Collette, Y., Vey, N., Chabannon, C., Recher, C., Sarry, J. E., Alcor, D., Peyron, J. F., Griessinger, E. (2016): Protective mitochondrial transfer from bone marrow stromal cells to acute myeloid leukemic cells during chemotherapy. *Blood* 128, 253-264.
59. Nadri, S., Soleimani, M., Hosseni, R. H., Massumi, M., Atashi, A., Izadpanah, R. (2007): An efficient method for isolation of murine bone marrow mesenchymal stem cells. *Int J Dev Biol* 51, 723-729.
60. Nolan, T., Hands, R. E., Bustin, S. A. (2006): Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* 1, 1559-1582.
61. Owen, T. A., Aronow, M., Shalhoub, V., Barone, L. M., Wilming, L., Tassinari, M. S., Kennedy, M. B., Pockwinse, S., Lian, J. B., Stein, G. S. (1990): Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol* 143, 420-430.

62. Paull, T. T., Rogakou, E. P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C. U., Gellert, M., Bonner, W. M. (2000): A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol* 10, 886-895.
63. Person, R. E., Li, F. Q., Duan, Z., Benson, K. F., Wechsler, J., Papadaki, H. A., Eliopoulos, G., Kaufman, C., Bertolone, S. J., Nakamoto, B., Papayannopoulou, T., Grimes, H. L., Horwitz, M. (2003): Mutations in proto-oncogene GFI1 cause human neutropenia and target ELA2. *Nat Genet* 34, 308-312.
64. Puchtler, H., Meloan, S. N., Terry, M. S. (1969): On the history and mechanism of alizarin and alizarin red S stains for calcium. *J Histochem Cytochem* 17, 110-124.
65. Raaijmakers, M. H., Mukherjee, S., Guo, S., Zhang, S., Kobayashi, T., Schoonmaker, J. A., Ebert, B. L., Al-Shahrour, F., Hasserjian, R. P., Scadden, E. O., Aung, Z., Matza, M., Merckenschlager, M., Lin, C., Rommens, J. M., Scadden, D. T. (2010): Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature* 464, 852-857.
66. Rahn, B. A., Perren, S. M. (1970): Calcein blue as a fluorescent label in bone. *Experientia* 26, 519-520.
67. Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S., Bonner, W. M. (1998): DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273, 5858-5868.
68. Saleque, S., Kim, J., Rooke, H. M., Orkin, S. H. (2007): Epigenetic regulation of hematopoietic differentiation by Gfi-1 and Gfi-1b is mediated by the cofactors CoREST and LSD1. *Mol Cell* 27, 562-572.
69. Satoh, Y., Matsumura, I., Tanaka, H., Ezoe, S., Sugahara, H., Mizuki, M., Shibayama, H., Ishiko, E., Ishiko, J., Nakajima, K., Kanakura, Y. (2004): Roles for c-Myc in self-renewal of hematopoietic stem cells. *J Biol Chem* 279, 24986-24993.
70. Schepers, K., Pietras, E. M., Reynaud, D., Flach, J., Binnewies, M., Garg, T., Wagers, A. J., Hsiao, E. C., Passegue, E. (2013): Myeloproliferative neoplasia remodels the endosteal bone marrow niche into a self-reinforcing leukemic niche. *Cell Stem Cell* 13, 285-299.
71. Scott, E. W., Simon, M. C., Anastasi, J., Singh, H. (1994): Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* 265, 1573-1577.
72. Shares, B. H., Busch, M., White, N., Shum, L., Eliseev, R. A. (2018): Active mitochondria support osteogenic differentiation by stimulating β -catenin acetylation. *J Biol Chem* 293, 16019-16027.
73. Silva, M. J., Brodt, M. D., Ko, M., Abu-Amer, Y. (2005): Impaired marrow osteogenesis is associated with reduced endocortical bone formation but does not impair periosteal bone formation in long bones of SAMP6 mice. *J Bone Miner Res* 20, 419-427.

74. Sriskanthadevan, S., Jeyaraju, D. V., Chung, T. E., Prabha, S., Xu, W., Skrtic, M., Jhas, B., Hurren, R., Gronda, M., Wang, X., Jitkova, Y., Sukhai, M. A., Lin, F. H., Maclean, N., Laister, R., Goard, C. A., Mullen, P. J., Xie, S., Penn, L. Z., Rogers, I. M., Dick, J. E., Minden, M. D., Schimmer, A. D. (2015): AML cells have low spare reserve capacity in their respiratory chain that renders them susceptible to oxidative metabolic stress. *Blood* 125, 2120-2130.
75. Steenhuis, P., Carr, K. M., Pettway, G. J., Ignelzi, M. A., Jr. (2009): Osteogenic and adipogenic cell fractions isolated from postnatal mouse calvaria. *Cells Tissues Organs* 190, 150-157.
76. Steenhuis, P., Pettway, G. J., Ignelzi, M. A., Jr. (2008): Cell surface expression of stem cell antigen-1 (Sca-1) distinguishes osteo-, chondro-, and adipoprogenitors in fetal mouse calvaria. *Calcif Tissue Int* 82, 44-56.
77. Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M., Nagasawa, T. (2006): Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* 25, 977-988.
78. Sugrue, T., Brown, J. A., Lowndes, N. F., Ceredig, R. (2013): Multiple facets of the DNA damage response contribute to the radioresistance of mouse mesenchymal stromal cell lines. *Stem Cells* 31, 137-145.
79. Sung, J. H., Yang, H. M., Park, J. B., Choi, G. S., Joh, J. W., Kwon, C. H., Chun, J. M., Lee, S. K., Kim, S. J. (2008): Isolation and characterization of mouse mesenchymal stem cells. *Transplant Proc* 40, 2649-2654.
80. Takam Kamga, P., Bassi, G., Cassaro, A., Midolo, M., Di Trapani, M., Gatti, A., Carusone, R., Resci, F., Perbellini, O., Gottardi, M., Bonifacio, M., Nwabo Kamdje, A. H., Ambrosetti, A., Krampera, M. (2016): Notch signalling drives bone marrow stromal cell-mediated chemoresistance in acute myeloid leukemia. *Oncotarget* 7, 21713-21727.
81. Tikhonova, A. N., Dolgalev, I., Hu, H., Sivaraj, K. K., Hoxha, E., Cuesta-Dominguez, A., Pinho, S., Akhmetzyanova, I., Gao, J., Witkowski, M., Guillaumot, M., Gutkin, M. C., Zhang, Y., Marier, C., Diefenbach, C., Kousteni, S., Heguy, A., Zhong, H., Fooksman, D. R., Butler, J. M., Economides, A., Frenette, P. S., Adams, R. H., Satija, R., Tsirigos, A., Aifantis, I. (2019): The bone marrow microenvironment at single-cell resolution. *Nature* 569, 222-228.
82. Toyota, M., Kopecky, K. J., Toyota, M. O., Jair, K. W., Willman, C. L., Issa, J. P. (2001): Methylation profiling in acute myeloid leukemia. *Blood* 97, 2823-2829.
83. Vadnais, C., Chen, R., Fraszczak, J., Yu, Z., Boulais, J., Pinder, J., Frank, D., Khandanpour, C., Hebert, J., Dellaire, G., Cote, J. F., Richard, S., Orthwein, A., Drobetsky, E., Moroy, T. (2018): GFI1 facilitates efficient DNA repair by regulating PRMT1 dependent methylation of MRE11 and 53BP1. *Nat Commun* 9, 1418.

84. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., Thompson, C. B. (2009): Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324, 1029-1033.
85. Vassen, L., Dührsen, U., Kosan, C., Zeng, H., Möröy, T. (2012): Growth factor independence 1 (Gfi1) regulates cell-fate decision of a bipotential granulocytic-monocytic precursor defined by expression of Gfi1 and CD48. *Am J Blood Res* 2, 228-242.
86. Wang, W., Zimmerman, G., Huang, X., Yu, S., Myers, J., Wang, Y., Moreton, S., Nthale, J., Awadallah, A., Beck, R., Xin, W., Wald, D., Huang, A. Y., Zhou, L. (2016): Aberrant Notch Signaling in the Bone Marrow Microenvironment of Acute Lymphoid Leukemia Suppresses Osteoblast-Mediated Support of Hematopoietic Niche Function. *Cancer Res* 76, 1641-1652.
87. Wang, Y. G., Qu, X. H., Yang, Y., Han, X. G., Wang, L., Qiao, H., Fan, Q. M., Tang, T. T., Dai, K. R. (2016): AMPK promotes osteogenesis and inhibits adipogenesis through AMPK-Gfi1-OPN axis. *Cell Signal* 28, 1270-1282.
88. Wang, Z., Li, G., Tse, W., Bunting, K. D. (2009): Conditional deletion of STAT5 in adult mouse hematopoietic stem cells causes loss of quiescence and permits efficient nonablative stem cell replacement. *Blood* 113, 4856-4865.
89. Winkler, I. G., Sims, N. A., Pettit, A. R., Barbier, V., Nowlan, B., Helwani, F., Poulton, I. J., van Rooijen, N., Alexander, K. A., Raggatt, L. J., Levesque, J. P. (2010): Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. *Blood* 116, 4815-4828.
90. Yang, L., Wang, L., Kalfa, T. A., Cancelas, J. A., Shang, X., Pushkaran, S., Mo, J., Williams, D. A., Zheng, Y. (2007): Cdc42 critically regulates the balance between myelopoiesis and erythropoiesis. *Blood* 110, 3853-3861.
91. Yang, Y. K., Ogando, C. R., Wang See, C., Chang, T. Y., Barabino, G. A. (2018): Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro. *Stem Cell Res Ther* 9, 131.
92. Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Mochizuki, S., Tomoyasu, A., Yano, K., Goto, M., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T., Higashio, K., Udagawa, N., Takahashi, N., Suda, T. (1998): Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3597-3602.
93. Yavropoulou, M. P., Yovos, J. G. (2008): Osteoclastogenesis--current knowledge and future perspectives. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 8, 204-216.
94. Young, K., Loberg, M. A., Eudy, E., Schwartz, L. S., Mujica, K. D., Trowbridge, J. J. (2020): Heritable genetic background alters survival and phenotype of Mll-AF9-induced leukemias. *Exp Hematol* 89, 61-67.e63.

95. Zambetti, N. A., Bindels, E. M., Van Strien, P. M., Valkhof, M. G., Adisty, M. N., Hoogenboezem, R. M., Sanders, M. A., Rommens, J. M., Touw, I. P., Raaijmakers, M. H. (2015): Deficiency of the ribosome biogenesis gene *Sbds* in hematopoietic stem and progenitor cells causes neutropenia in mice by attenuating lineage progression in myelocytes. *Haematologica* 100, 1285-1293.
96. Zambetti, N. A., Ping, Z., Chen, S., Kenswil, K. J. G., Mylona, M. A., Sanders, M. A., Hoogenboezem, R. M., Bindels, E. M. J., Adisty, M. N., Van Strien, P. M. H., van der Leije, C. S., Westers, T. M., Cremers, E. M. P., Milanese, C., Mastroberardino, P. G., van Leeuwen, J., van der Eerden, B. C. J., Touw, I. P., Kuijpers, T. W., Kanaar, R., van de Loosdrecht, A. A., Vogl, T., Raaijmakers, M. (2016): Mesenchymal Inflammation Drives Genotoxic Stress in Hematopoietic Stem Cells and Predicts Disease Evolution in Human Pre-leukemia. *Cell Stem Cell* 19, 613-627.
97. Zeng, H., Yücel, R., Kosan, C., Klein-Hitpass, L., Möröy, T. (2004): Transcription factor *Gfi1* regulates self-renewal and engraftment of hematopoietic stem cells. *Embo j* 23, 4116-4125.
98. Zweidler-Mckay, P. A., Grimes, H. L., Flubacher, M. M., Tschlis, P. N. (1996): *Gfi-1* encodes a nuclear zinc finger protein that binds DNA and functions as a transcriptional repressor. *Mol Cell Biol* 16, 4024-4034.

7 ANHANG

7.1 ZUORDNUNG DER MÄUSE ZU EXPERIMENTEN, FÜR DIE SIE VERWENDET WURDEN

Tabelle 12 Liste der wt Mäuse im Leukämiemodell mit Kontrollen

Mausnr.	<i>Gfil</i>	Leu	Irr.	FACS KM/MI	HG	Gew.	FACS bone	μCT	Histo	BFR
110239	wt	-	-	x/x	-	x	-	-	-	-
110240	wt	-	-	x/x	-	x	-	-	-	-
110250	wt	-	-	x/x	-	x	-	-	-	-
110255	wt	-	-	-/-	-	x	x	-	-	-
110677	wt	-	-	x/	-	x	x	-	-	-
112196	wt	-	-	x/x	-	-	x	-	-	-
112598	wt	-	-	x/x	-	-	x	-	-	-
112194	wt	-	-	x/x	-	-	x	-	-	-
112597	wt	-	-	x/x	-	-	x	-	-	-
115235	wt	-	-	x/x	x	x	x	-	-	-
115251	wt	-	-	x/x	x	x	x	-	x	-
115247	wt	-	-	x/x	x	x	-	-	x	-
120062	wt	-	-	-/-	-	-	-	-	x	-
110822	wt	-	x	-/-	x	x	x	x	-	-
111110	wt	-	x	-/-	x	x	x	x	-	-
111072	wt	-	x	x/x	x	x	x	x	-	-
112526	wt	-	x	x/x	-	x	x	-	-	x
112527	wt	-	x	x/x	-	x	x	-	-	x
111775	wt	-	x	x/x	x	x	x	-	-	x
112270	wt	-	x	x/x	x	x	x	-	-	x
111080	wt	x	x	-/-	x	x	x	x	-	-
111284	wt	x	x	-/-	x	x	x	x	-	-
111108	wt	x	x	x/x	-	x	x	x	-	-
112211	wt	x	x	x/x	x	x	x	-	-	x
112110	wt	x	x	x/x	x	x	x	-	-	x
112524	wt	x	x	x/x	-	x	x	-	-	x
112525	wt	x	x	x/x	-	x	x	-	-	x
115229	wt	x	x	x/-	x	x	-	-	x	-
115233	wt	x	x	x/x	x	x	-	-	x	-

Tabelle 13 Liste der *Gfi1*-KO Mäuse im Leukämiemodell mit Kontrollen

Mausnr.	<i>Gfi1</i>	leu	irr.	FACS KM/MI	HG	Gew.	FACS Kno	μCT	Histo	BFR
115245	KO	-	-	x/x	x	x	x	-	x	-
115232	KO	-	-	x/-	x	x	x	-	x	-
115250	KO	-	-	-/-	-	-	-	-	x	-
111189	KO	-	x	x/x	x	x	x	x	-	-
110809	KO	-	x	x/x	x	x	x	x	-	-
110955	KO	-	x	x/x	x	x	x	x	-	-
110518	KO	x	x	x/x	x	x	x	x	-	-
110519	KO	x	x	x/x	x	x	x	x	-	-
110520	KO	x	x	-/-	-	x	-	x	-	-
112489	KO	x	x	x/x	x	x	x	-	-	x
112490	KO	x	x	x/x	-	x	x	-	-	x
112514	KO	x	x	x/x	x	x	x	-	-	x
115234	KO	x	x	x/x	x	x	-	-	x	-
115231	KO	x	x	x/x	x	x	-	-	x	-

Legende zu Tabelle 12 und 13:

- leu: Leukämie (*MLL-AF9*)
- irr: bestrahlt
- FACS KM/MI bzw. Kno: Durchflusszytometrie Knochenmark / Milz bzw. Zellen d. Röhrenknochen
- HG: Hämatogramm (maschinell)
- Gew.: Körper-, Milz- & Lebergewicht
- μCT: Micro-Computertomographie
- Histo: Histologiepräparate der Femora
- BFR: Knochenformationsrate

7.2 ZUORDNUNG DER DURCHGEFÜHRTEN STATISTISCHEN TESTS ZU DEN ABBILDUNGEN

Tabelle 14 Liste der verwendeten statistischen Tests

Abbildung	Student's T-Test	Mann Withney Test	Einfache Varianz- analyse & Tukey Test	Kruskal Wallis & Dunn Bon-ferroni- Test	Log Rank Test
1 A		x			
1 B			x		
3 B				x	
4 A-H				x	
5 C-D			x		

8 C-D	x				
10 A-C			x		
10 D				x	
12 B, E			x		
12 C				x	
12 D, F		x			
13 A-C			x		
14 A-C			x		
14 D, E				x	
14 F					x
15 A-D			x		
16 A, C, D			x		
16 B		x			
17 A, B, D				x	
17 C			x		
19 A-C			x		
19 D-F				x	
21 A-F			x		
22 B			x		
23 C-D			x		

7.3 SIGNIFIKANZNIEVAUS ZUM VERGLEICH DER MEDIANEN γ H2AX-FOCI-ZAHL

Tabelle 15 Signifikanzniveaus beim Vergleich der medianen Foci-Zahl

Vergleich von:	0 Gy	2 Gy 0,5 h	2 Gy 1 h	2 Gy 2 h
wt / wt+Lin ⁻	**	ns	ns	ns
wt / wt+leu	ns	ns	****	ns
wt+Lin ⁻ / wt+leu	ns	*	****	ns
KO / KO+Lin ⁻	***	**	****	***
KO / KO+leu	ns	ns	*	ns
KO+Lin ⁻ / KO+leu	**	ns	ns	**
wt/KO	Ns	****	**	****
wt+Lin ⁻ / KO+Lin ⁻	ns	ns	ns	ns
wt+leu / KO+leu	ns	ns	*	****

Kruskal-Wallis- und Dunn-Bonferroni-Test

7.4 GETRENNTE DARSTELLUNG VON BESTRAHLTEN UND UNBESTRAHLTEN KONTROLLEN

Abbildung 24

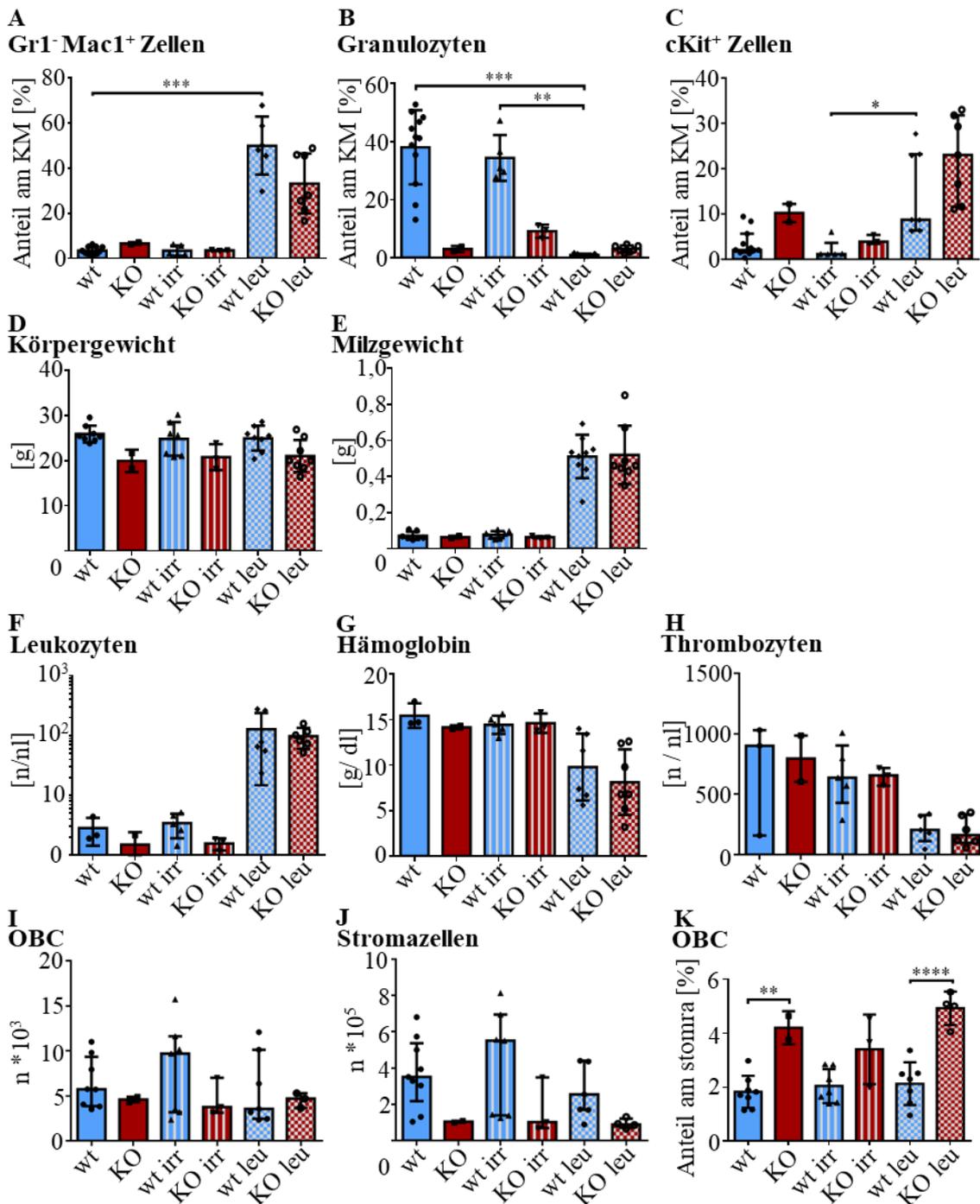


Abbildung 24: Getrennte Darstellung unbehandelter und bestrahlter (irr) Kontrollen

A Anteil der Mac-1⁺ Gr-1⁻ Zellen, **B** Anteil der Granulozyten (Mac-1⁺ Gr-1⁺) **C** Anteil der cKit⁺ Zellen an kernhaltigen KM-Zellen.; **D** Körpergewicht in g **E** Milzgewicht in g; **F-H** maschinelles Hämogramm: **F** Leukozyten / nl Blut **G** Hb g / dl **H** Thrombozyten / nl Blut; **I-K** Ergebnisse der Durchflusszytometrie langer Röhrenknochen: **I** Anzahl der OBC (CD45⁻ Lin⁻ CD31⁻ CD51⁺ Sca-1⁺) in langen Röhrenknochen. **J** Anzahl der Stromazellen (CD45⁻ Lin⁻) in langen Röhrenknochen. **K** Anteil der OBC an den Stromazellen (CD45⁻ Lin⁻) in %.

7.5 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A – Adenin	DPBS – Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
AG – Arbeitsgruppe	DTT – Dithiothreitol
AML – akute myeloische Leukämie	EC – Endotheliale Zellen
AMSC- AML-assoziierte mesenchymale Stammzellen	EDTA - Ethylindiamintetraacetat
AMSPC – AML-assoziierte mesenchymale Stamm- & Progenitorzellen	F - forward
APC – Allophycocyanin	FACS – Fluorescent activated cell sorting
BFR – Knochenbildungsrate (englisch: bone formation rate)	FCCP – Carbonylcyanid-4-phenylhydrazon
Bglap – bone γ -carboxylglutamic acid-containing protein	g – Gramm / Erdbeschleunigung
BPO – Benzylperoxid	G – Guanin
BV – Knochenvolumen (bone volume)	GBR – Großbritannien
C – Cytosin	Gew. – Gewicht
CA – Kalifornien	Gfi1 – Growth Factor independence 1
Ca – Kanada	GFP – green fluorescent protein (grün fluoreszierendes Protein)
CD – Unterscheidungsgruppen (englisch: Cluster of differentiation)	GM-CSF – Granulozyten-Monozyten Kolonie-stimulierender Faktor
cDNA – complementary DNA	Gran – Granulozyten
CLP – gemeinsamer lymphoider Progenitor (common lymphoid progenitor)	Gy - Gray
cm – Zentimeter	H2AX – Histon 2 AX
CMP – gemeinsamer myeloischer Progenitor (common myeloid p.)	Hb – Hämoglobin
CO ₂ – Kohlenstoffdioxid	HBSS – Hank Balanced Salt Solution (HBSS) Gibco
d – Tage	HE – Hämatoxylin-Eosin-Färbung
DAPI – 4',6-Diamidin-2-phenylindol	hi – hitzeinaktiviert
DDSB – DNA-Doppelstrang-Bruch	Histo - Histologie
DE - Deutschland	HOXD13 – Homebox D13
DMSO - Dimethylsulfoxid	HSC – hämatopoetische Stammzellen
DNA – Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic acid)	HSPC – hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen
DNase – Desoxyribonuklease	IF – Immunfluoreszenz
DNTP – Desoxyribonukleosidtriphosphat	IL – Interleukin
	IMDM – Iscove's Modified Dulbecco's Medium
	IRCM – Institute des Recherches Cliniques de Montréal

irr. – bestrahlt (englisch: irradiated)

JAK-STAT – Janus kinase / signal transducer and activator of transcription

Kas – Kasumi 1

KD – knockdown (englisch für herunterreguliert)

KI – knock-in

KM – Knochenmark

KO – knockout

LEPR⁺ – Leptin-Rezeptor positiv

leu – leukämisch / Leukämie

Lin⁻ – Lineage negativ

m – männlich

M – Molar

MA – Massachusetts

M-CSF – Macrophage colony stimulating factor

MDS – myelodysplastisches Syndrom

MEM α – Minimal Essential Medium α

min – Minuten

mm – Millimeter

mM – millimolar

MMA - Methylmetacrylat

Mo – monozytäre Zellen

MPP – multipotente Progenitoren

MPS – myeloproliferative Störung, myeloproliferatives Syndrom

mg – Milligramm

MG – Masson-Goldner-Trichromfärbung

MO - Missouri

mRNA – messenger Ribonukleinsäure

MSC – mesenchymale Stammzellen

MSPC – mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen

MT – Montana

NEC – Nicht endotheliale Zellen (englisch: non endothelial cells)

NJ – New Jersey

nl - Nanoliter

nm - Nanometer

NPG – Nonylphenyl-Polyethyleneglycol Acetat

ns – nicht signifikant

NV – Nevada

O₂ – Sauerstoff

OBC – Zellen der osteoblastischen Linie (englisch Osteoblastic lineage cells)

OD – Osteogene Differenzierung

o.g. – oben genannt

ON – Ontario

p – Signifikanzwert

PA – Pennsylvania

PBS – phosphate buffered saline

PCR – Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)

PE – Phycoerythrin

PFA – Paraformaldehyd

P/S – Penicillin, Streptomycin

QC – Quebec

qRT-PCR – quantitative RT-PCR

r – reverse

RANK receptor activator of NF- κ B

RANKL – Ligand für RANK

RNA – Ribonukleinsäure

RNase - Ribonuklease

ROS – reactive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)

RPMI 1640 - Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium

Runx2 – Runt-verwandter Transkriptionsfaktor 2

SBDS – Shwachmann Bodian Diamond Syndrom

Sca-1 – stem cell antigen 1

s. – siehe	tg – transgen
SCF – Stem Cell Factor	TRAP – Tartrat-resistente saure Phosphatase
SDF-1 – Stromal Cell Derived Factor 1	TV – Gewebevolumen (Tissue volume)
SPF – special pathogen free	w – weiblich
Spp1 – secreted phosphoprotein 1 (Osteopontin)	wt – Wildtyp
STAT – signal transducers and activators of transcription	µl – Microliter
s.u. – siehe unten	µm – Micrometer = 10 ⁻⁶ Meter
T – Thymin	µCT – Micro-Computertomographie
	°C – Grad Celsius

7.6 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1 – Liste der verwendeten Medien, Reagenzien, Lösungen.....	12
Tabelle 2 – Liste der selbst angesetzten Lösungen und Medien.....	14
Tabelle 3 – Liste der Fluoreszenzantikörper für Durchflusszytometrie.....	15
Tabelle 4 – Liste der verwendeten Kits.....	16
Tabelle 5 – Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	16
Tabelle 6 – Liste der verwendeten Maschinen und Geräte.....	18
Tabelle 7 – Liste der verwendeten Software.....	20
Tabelle 8 – Liste der verwendeten Mauslinien.....	21
Tabelle 9 – Mäuse, aus deren Knochenmark primäre Stromazellen stammen.....	26
Tabelle 10 – Primer Sequenzen SYBRGreen / Gene Assay Bezeichnungen TaqMan.....	31
Tabelle 11 – Protokoll qRT-PCR.....	32
Tabelle 12 – Liste der wt Mäuse im Leukämiemodell mit Kontrollen.....	91
Tabelle 13 – Liste der <i>Gfi1</i> -KO Mäuse im Leukämiemodell mit Kontrollen.....	92
Tabelle 14 – Liste der verwendeten statistischen Tests.....	92
Tabelle 15 – Signifikanzniveaus beim Vergleich der medianen Foci-Zahl.....	93

7.7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1 - GFI1-Expression in humanen AMSPC und Einfluss der Gfi1-Expression in murinen MSPC auf das Wachstum von Leukämiezellen.....	37
Abbildung 2 - Charakterisierung der MSPC mittels Mikroskopie.....	38
Abbildung 3 - Charakterisierung der MSPC mittels Durchflusszytometrie.....	39
Abbildung 4 - Genexpression der MSPC im Osteodifferenzierungsassay.....	41
Abbildung 5 - Mitochondriale Funktion der MSPC in vitro.....	43
Abbildung 6 - DNA-Reparatur der MSPC – Fotos der γH2AX Foci.....	44

Abbildung 7 - DNA-Reparatur in wt und Gfi1-KO MSPC und AMSPC.....	46
Abbildung 8 - Durchflusszytometrie der Zellen langer Röhrenknochen.....	47
Abbildung 9 - Durchflusszytometrie des Gewebes langer Röhrenknochen – Mikroskopie der Sca1- CD51- NEC-Population.....	48
Abbildung 10 - Durchflusszytometrische Analyse der Zellpopulationen langer Röhrenknochen von Mäusen mit unterschiedlicher Gfi1-Expression.....	49
Abbildung 11- In vivo Model der AML in wt und Gfi1-KO Mäusen.....	51
Abbildung 12 - Durchflusszytometrischer Nachweis der Leukämie im Mausmodell.....	53
Abbildung 13 - Durchflusszytometrischer Ausschluss einer lymphatischen Leukämie.....	54
Abbildung 14 - Blastenlast in Knochenmark und Blut, Blutbild und krankheitsfreies Überleben...	56
Abbildung 15 - Alter sowie Körper-, Milz- und Lebergewicht der Versuchstiere.....	57
Abbildung 16 - Durchflusszytometrische Analysen der Milzzellen.....	58
Abbildung 17 - Durchflusszytometrie der Zellen aus Röhrenknochen in wt & Gfi1-KO Mäusen ohne und mit AML.....	59
Abbildung 18 - Repräsentative Anschnitte von kortikalem und trabekulärem Knochen – Rekonstruktion aus microcomputertomographischen Aufnahmen.....	61
Abbildung 19 - Micro-Computertomographie (μCT) der Femora.....	62
Abbildung 20 - Repräsentative histologische Schnitte des kortikalen Knochens.....	64
Abbildung 21 - Kortikale Knochenhistologie der Femora.....	65
Abbildung 22 - Knochenbildungsrate durch Calcein-Färbung in vivo.....	67
Abbildung 23 - TRAP-Färbung – Osteoklastenzahl & Osteoklastenaktivität.....	69
Abbildung 24 - Getrennte Darstellung unbehandelter und bestrahlter (irr) Kontrollen.....	94

8 DANKSAGUNG

Ich möchte mich herzlich bei all den Personen bedanken, die mich bei meiner Dissertation unterstützt haben, mir mit Rat und oft auch Tat zur Seite standen.

Allen voran gilt mein Dank meinem Doktorvater Professor Cyrus Khandanpour, der mit mir ein spannendes Thema ausgearbeitet hat und der auch auf Distanz immer eine gute Betreuung ermöglichte. Auch danke ich Herrn Professor Opalka, der mich bei der Niederschrift der Dissertation mit Rat und konstruktiver Kritik unterstützt hat. Ich möchte auch der gesamten AG Khandanpour danken. Dr. Yahya Al-Matary, Dr. Daria Frank und Dr. Pradeep Patnana brachten mir verschiedene Methoden bei und hatten immer ein offenes Ohr für meine Fragen. Auch in Münster wurde ich von der dortigen AG Khandanpour, insbesondere von Dr. Helal Noman bei meinen Besuchen herzlich aufgenommen. Ferner möchte ich in Münster bei Professor Wolfgang Hartmann und Annette Struk, Judith Obernüfemann, Sabine Schäfer und Christiane Hammesfahr am Gerhard-Domagk-Institut für die technische Unterstützung bei der Anfertigung der histologischen Paraffinschnitte danken.

Von Herzen danke ich auch Herrn Professor Ulrich Dührsen, der mich mit seinen Vorlesungen für die Hämatologie begeisterte, mir als Vertrauensdozent den Rat gab, während des Studiums ins Ausland zu gehen und mir schließlich die Doktorarbeit bei Professor Khandanpour vermittelte mit der Möglichkeit, ein halbes Jahr bei Professor Möröy am IRCM in Montreal zu forschen. In Montreal möchte ich mich bei Herrn Professor Möröy bedanken. Er hat mir die außergewöhnliche Erfahrung ermöglicht, eine andere Kultur innerhalb und außerhalb des Labors kennenzulernen und von hervorragenden Wissenschaftlern zu lernen. Dr. Jennifer Fraszczak war eine hilfsbereite Betreuerin und auch von Dr. Charles Vadnais, Dr. Hugues Beauchemin, Dr. Anne Hellness und dem Rest der Arbeitsgruppe habe ich viel gelernt. Mein Dank geht auch an Dr. Mathieu Ferron und Dr. Omar Al-Rifai, die mir inhaltlich, aber vor allem methodisch viel über Knochen beibrachten. Ebenfalls eine große Hilfe und ein Lehrer war Eric Massicotte in der Flow cytometry.

Wichtig war auch mein Besuch bei der AG Tuckermann in Ulm, wo mir Dr. Mubashir Ahmad die Auswertung der Calcein-gefärbten Knochen beibrachte und Ulrike Kelp mich mit der TRAP-Färbung unterstützte. Zudem habe ich inhaltlich von Herrn Professor Tuckermann und Dr. Ahmad viel über die Knochenphysiologie gelernt.

Auch zuhause in Essen war die Zusammenarbeit mit den anderen Arbeitsgruppen sowie mit dem IMCES und dem HO-Labor ausgesprochen gut. Hier möchte ich mich insbesondere bei Dr. Maher Hanoun, Dr. Yiyang Chen, Lucas Arnold, Michael Möllmann und Dr. Nils Leimkühler bedanken, die immer ein offenes Ohr für mich hatten, mich unterstützten und es mir ermöglichten, meine Doktorarbeit nach dem Umzug der AG Khandanpour nach Münster in Essen fertigzustellen.

Zuletzt geht noch ein großes Dankeschön an meine Familie, meine Freunde und noch einmal an Lucas. Ihr habt mir Mut zugesprochen und einen guten Mittelweg gefunden, zu akzeptieren, dass ich wenig Zeit für euch hatte, und mich von der Arbeit abzulenken, wenn ich Abwechslung brauchte. Danke für Eure Unterstützung!

9 CURRICULUM VITAE

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.