

Die Rolle einer aberranten Osteoklastogenese in der Entwicklung von Osteosklerose in Myeloproliferativen Neoplasien

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades einer
Doktorin der Medizin (Dr. med.)

an der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Victoria Fischer

aus

Darmstadt

2025

Betreuer:in / Gutachter:in der Dissertation:	Prof. Dr. Johannes Keller
Gutachter:in der Dissertation:	PD Dr. Timur Alexander Yorgan
Vorsitz der Prüfungskommission:	PD Dr. Timur Alexander Yorgan
Mitglied der Prüfungskommission:	PD Dr. Andreas Block
Mitglied der Prüfungskommission:	Prof. Dr. Walter Fiedler
Datum der mündlichen Prüfung:	22.09.2025

Inhaltsverzeichnis

1	Arbeitshypothese und Fragestellung	5
2	Forschungsvorhaben und Zielsetzung	6
3	Einleitung	7
3.1	Myeloproliferative Neoplasien	7
3.1.1	Essentielle Thrombozythämie.....	8
3.1.2	Polycythaemia Vera	8
3.1.3	(Präfibrotische) Primäre Myelofibrose.....	9
3.1.4	Genetische Mutationen.....	11
3.2	CD133+ Stammzellfraktion in MPN.....	13
3.3	Knochenhomöostase und Osteosklerose	13
3.4	Osteoklasten.....	14
4	Material und Methoden	15
4.1	Material	15
4.1.1	Ausrüstung.....	15
4.1.2	Medien und Reagenzien	17
4.1.3	Zytokine und Fluoreszenzfarbstoffe	18
4.2	Methoden.....	20
4.2.1	Isolierung der CD133+CD34+ Stammzellfraktion	20
4.2.2	CD133+ CD34+ Zellkulturen.....	21
4.2.3	Charakterisierung und Sortierung multinukleärer Zellen	22
4.2.4	Morphologische Analyse der Zellfraktionen	25
4.2.5	Untersuchung von Knochenresorption.....	27
4.2.6	Phagozytose Assay.....	28
4.2.7	Koloniebildungstest	29
4.2.8	Mutationsanalyse	30
5	Ergebnisse.....	32
5.1	Etablierung einer humanen Osteoklastenkultur	32
5.2	TRAP-Expression humaner Osteoklasten	33
5.3	FACS-Analyse multinukleärer Zellen.....	34
5.3.1	Patientenzellen exprimieren vermindert TRAP und weisen insgesamt eine geringere Anzahl an (Prä-) Osteoklasten auf	34
5.3.2	Osteoklastenspezifische Marker erlauben die Sortierung multi-nukleärer Zellen mittels FACS	38
5.3.3	Zellen hoher Nuklearität (>8 Nuclei) weisen keinen Unterschied auf	39
5.3.4	Präosteoklasten von Patienten exprimieren signifikant weniger RANK und $\alpha_v\beta_3$	40
5.4	Funktions- und Mutationsanalyse humaner Osteoklasten	42
5.4.1	Osteoklasten von Patienten haben ein Funktionsdefizit	42

5.4.2	Funktionsfähige Osteoklasten von Patienten sind mutationsfrei	43
6	Diskussion	53
7	Zusammenfassung.....	57
8	Literaturverzeichnis.....	60
9	Patientenverzeichnis.....	64
10	Abkürzungsverzeichnis	65
11	Abbildungsverzeichnis	69
12	Tabellenverzeichnis.....	71
13	Erklärung des Eigenanteils	72
14	Eidesstattliche Versicherung.....	73
15	Danksagung	74

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Neben einer ausgeprägten Knochenmarkfibrose erleiden Myelofibrose Patienten in fortgeschrittenen Krankheitsstadien die Entwicklung einer Osteosklerose und mit ihr die Aufhebung einer physiologischen Knochenstruktur und –funktion.

Um seine Integrität zu erhalten, ist der Knochen unter physiologischen Bedingungen einem ständigen Wandel aus Produktion und Resorption durch das Zusammenspiel aus Osteoblasten und Osteoklasten unterworfen (Raggatt and Partridge, 2010). Da Osteoblasten mesenchymalen Ursprungs sind, Osteoklasten hingegen aus der Fusion monozytischer Progenitoren entstehen, lässt dies die Hypothese zu, dass die Ursache der Osteosklerose in Myeloproliferativen Neoplasien (MPN) bei den multinukleären Osteoklasten zu suchen ist (Spampinato et al., 2021, Raggatt and Partridge, 2010, Wang et al., 2022). Diese Hypothese wird durch die Tatsache untermauert, dass die einzige kurative Therapieoption die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (STX) darstellt und diese zu einer raschen Regression der Knochenfibrose und Osteosklerose führt (Sale et al., 2006, Kröger et al., 2023, Kröger et al., 2009, Thiele et al., 2005).

Um die Osteoskleroseentstehung von MPN zu verstehen, sind sowohl detaillierte Kenntnisse über den Phänotyp, genetischen Hintergrund sowie der Funktionalität von Osteoklasten notwendig. Das Forschungsvorhaben beinhaltet somit die Überprüfung der Entwicklung und Funktionsanalyse von Osteoklasten und ihren Progenitoren sowie eine Evaluation ihrer Rolle bei der Entstehung von Osteosklerose im Knochenmark (KM) von Myelofibrose-Patienten. Dafür wurden vorab verschiedene Kernfragen bzw. Hypothesen formuliert:

- (1) Liegt ein Missverhältnis im Gleichgewicht der an der Knochenhomöostase beteiligten Zellen vor, beziehungsweise ist die Anzahl von Osteoklasten von Patienten im Vergleich zu Gesunden vermindert?
- (2) Ist die Fusion und damit die Differenzierung zu Osteoklasten von Patienten beeinträchtigt? Und spezifischer: Gibt es einen Unterschied in der Kernanzahl im Vergleich zu Osteoklasten von Gesunden?
- (3) Weisen Osteoklasten von Myelofibrose-Patienten eine gestörte Funktion auf (z.B. lassen sie sich phänotypisch im Vergleich zu Gesunden nicht unterscheiden, aber resorbieren keinen Knochen)?
- (4) Gibt es eine Relation zwischen den genotypischen Veränderungen in MPN und der angenommenen Einschränkung der Osteoklastenfunktion?

Die aufgeführten Fragen dienen der vorliegenden Forschungsarbeit als Handlungsstrang und sollen im Folgenden beantwortet werden.

2 Forschungsvorhaben und Zielsetzung

In Vorarbeiten konnte die Forschungsgruppe für Stammzellbiologie erstmalig zeigen, dass eine aus dem peripheren Blut von Myelofibrose-Patienten isolierte CD133+ Stammzellfraktion in immunkompromittierten Mäusen eine Fibrose und Sklerose induzieren kann (Trivai et al., 2015). Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit verschiedene in vitro Ansätze mit mononukleären Zellen gesunder Spender entwickelt, die eine Überprüfung der Differenzierung von Monozyten sowie CD133+ hämatopoetischen Stammzellen zu multinukleären Osteoklasten zulässt. Dafür wurden einerseits CD133+CD34+ Stammzellen aus Knochenmarkbiopsien gesunder Spender und andererseits aus dem peripheren Blut von Patienten isoliert und anschließend kultiviert.

Diese Kultivierung ermöglichte eine Untersuchung der Zellen auf unterschiedlichen Entwicklungsebenen. Für eine Phänotypisierung kamen verschiedene Färbungen mit anschließender mikroskopischer Betrachtung sowie die Methode der Durchflusszytometrie zum Einsatz. Besonders die Durchflusszytometrie erlaubte es nach Färbung verschiedener Monopoese- und Osteoklasten-spezifischer Marker nicht nur die Sortierung und anschließende funktionelle Analyse der Zellen, sondern auch die mutationsassoziierten Veränderungen der differenzierten Osteoklasten zu kontrollieren. Darüber hinaus konnte zusätzlich mit Hilfe des Instituts für Osteologie und Biomechanik (IOBM) eine weitere Methode für eine funktionelle Analyse der Osteoklasten mit Dentinchips aus Elfenbein etabliert werden, die den Nachweis einer Resorptionsaktivität der kultivierten Osteoklasten, welches die wichtigste Funktionseigenschaft dieser Zellen repräsentiert, zuließ.

Die in vitro Differenzierung und genetische sowie Funktionsanalyse von Osteoklasten und ihren Progenitoren sollen ein besseres Verständnis der Prozesse, die zur Entstehung der Osteosklerose führen, liefern und die Basis für weitere Arbeiten bilden, um neue therapeutische Ansätze dieser seltenen hämatologischen Erkrankung zu etablieren.

3 Einleitung

3.1 Myeloproliferative Neoplasien

Die BCR-ABL negativen chronisch myeloproliferativen Neoplasien (MPN) stellen eine Gruppe seltener hämatologischer Erkrankungen dar, deren Ursprung in der hämatopoetischen Stammzellfraktion zu finden ist.

MPN betreffen vor allem ältere und etwas häufiger männliche Patienten mit einer jährlichen Inzidenz von 0,3-2/100.000. Die Entwicklung des myeloproliferativen neoplastischen Phänotyps wird in über 95% der MPN durch somatische Mutationen in drei Genen bedingt. Diese betreffen vorrangig die Januskinase 2 V617F (JAK2), den Thrombopoietinrezeptor (MPL) sowie Calreticulin (CALR) (Mead and Mullally, 2017, Shallis et al., 2020, McMullin and Anderson, 2020, Verstovsek et al., 2022).

Gekennzeichnet sind MPN durch die klonale Proliferation hämatopoetischer Stammzellen, welche in die Expansion einer oder mehrerer myeloischer Zelllinien resultiert. Die Einteilung erfolgt in die Polycythaemia Vera (PV), welche durch eine exzessive Produktion erythrozytärer Zellen charakterisiert ist, die Essentielle Thrombozythämie (ET), welche eine gesteigerte Thrombozytenproduktion aufweist und in die (präfibrotische) Primäre Myelofibrose ((prä-) PMF), welche von einer Knochenmarkfibrose und nachfolgender – sklerose sowie extramedullärer Hämatopoese gezeichnet ist. Weitere, von diesen abzugrenzenden MPN, stellen die BCR-ABL positive chronisch myeloische Leukämie (CML), die seltene chronische Eosinophilenleukämie not otherwise specified (CEL-NOS) sowie die chronische Neutrophilenleukämie (CNL) dar.

Neben der Knochenmarkfibrose leiden primäre oder post-ET/ -PV Myelofibrose (MF) Patienten an einer Verdickung der Knochen trabekel und Bildung von mineralisiertem Knochen innerhalb des Knochenmarkraumes (Osteosklerose), weshalb jene Patienten im Fokus dieser Arbeit stehen (Passamonti and Maffioli, 2016, Gianelli et al., 2023).

Die Lebenserwartung im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung ist aufgrund des hohen Risikos für thrombotische und hämorrhagische Komplikationen, Knochenmarkversagen, Endorganschäden sowie eine Progression in eine akute Leukämie erniedrigt, weshalb bis dato eine Stammzelltransplantation die einzige kurative Therapie darstellt (Pizzi et al., 2021).

3.1.1 Essentielle Thrombozythämie

Die ET ist primär von einer gesteigerten Megakaryopoiese geprägt und durch eine Thrombozytenzahl $\geq 450/\text{nL}$ definiert. Zu den Hauptkriterien der Erkrankung zählen darüber hinaus der Nachweis einer der drei “Driver”-Mutationen JAK2, MPL und CALR, sowie vermehrte und vergrößerte Megakaryozyten ohne signifikante Steigerung der Granulo- oder Erythropoese und der Ausschluss einer anderen MPN oder eines Myelodysplastischen Syndroms (MDS). Sollte keine Driver-Mutation nachgewiesen werden können, muss eine reaktive Thrombozytose ausgeschlossen werden oder der Nachweis eines anderen klonalen Markers erfolgen (Barbui et al., 2018).

Ein variabler Teil der Patienten leidet im Verlauf ihrer Erkrankung an Splenomegalie, Leukozytose, mikrovaskulären Symptomen, Ersttrimesteraborten, thrombozytischen und hämorrhagischen Komplikationen sowie an dem Risiko der leukämischen Transformation oder fibrotischen Progression. Morbidität und Mortalität werden vorrangig durch thrombo-hämorrhagische Komplikationen sowie leukämischer und fibrotischer Entwicklung beeinflusst und stehen daher im Zentrum der Therapieansätze (Tefferi et al., 2018a). Die Indikation für eine zytoreduktive Therapie wird vorrangig bei Hochrisikopatienten gestellt und in der Erstlinientherapie mit Hydroxyurea durchgeführt. Als “Second-line” Medikamente werden Interferon-alpha und Busulfan eingesetzt (Arber et al., 2022).

Es gibt Hinweise darauf, dass weitere DNA-Sequenzvarianten und Mutationen, welche über 53% der ET-Patienten betreffen und unter anderem Tet-Methylcytosin-Dioxygenase 2 (TET2) (16%), Additional Sex Combs-Like 1 (ASXL1) (11%), DNA Methyltransferase 3 (DNMT3) (6%), sowie SH2B adapter protein 3 (SH2B3), Splicing factor 3B subunit 1 (SF3B1), U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1 (U2AF1), Tumorsuppressorgen (TP53), Isocitratdehydrogenase 2 (IDH2) und Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) beinhalten, Risikofaktoren für das Gesamt- myelofibrosefreie oder leukämiefreie Überleben darstellen, weshalb sie Gegenstand aktueller Forschungsprojekte sind (Tefferi et al., 2016).

3.1.2 Polycythaemia Vera

Die PV ist eine vorrangig JAK2-mutierte MPN, die durch eine klonale Erythropoese charakterisiert ist. Neben der in >98% vorkommenden JAK2 Mutation gehören Hämoglobin-/ Hämatokritwerte von >16,5g/dl/ 49% bei Männern und 16g/dL/ 48% bei Frauen sowie eine in der Knochenmarksbiopsie ersichtliche Steigerung der Erythropoese, Granulopoese und Megakaryopoese mit pleomorphen, reifen Megakaryozyten zu den

Diagnosekriterien. Die Knochenmarkbiopsie ist nicht obligat, sollte parallel zu den genannten Kriterien ein erniedrigter Erythropoetinspiegel vorliegen (Barbui et al., 2018).

Das klinische Erscheinungsbild der PV ist von einer milden bis moderaten Splenomegalie, Leukozytose, Thrombozytose, mikrovaskulären Symptomen, thrombotischen wie hämorrhagischen Komplikationen, konstitutionellen Symptomen wie Fatigue und Juckreiz und darüber hinaus von dem Risiko der leukämischen Transformation oder fibrotischen Progression geprägt (Tefferi et al., 2018b).

Über 50% der Patienten weisen neben der JAK2 Mutation noch weitere Mutationen auf, von denen TET2 (18%) und ASXL1(15%) die häufigsten darstellen. Zu den weiteren Mutationen gehören unter anderem Serin/Arginin-reicher Splicing-Faktor 2 (SRSF2), Runt-Related Transcription Factor 1 (RUNX1) und U2AF1 mit einer kombinierten Inzidenz von 5%-10%. Im Fokus derzeitiger Therapien stehen vergleichbar zu den Strategien der ET neben der Thromboseprävention vor allem bei Hochrisikopatienten die zytoreduktive Therapie mit Hydroxyurea und weiter Interferon-alpha sowie Busulfan. (Tefferi and Barbui, 2023).

3.1.3 (Präfibrotische) Primäre Myelofibrose

Die WHO-Klassifikation 2016/2017 sowie die überarbeitete internationale Konsensusklassifikation für MPN und akute Leukämien von 2022 etablierten eine Einteilung der PMF in präfibrotisch und klassisch (“overt”) mit dem Ziel, die präfibrotische PMF von einer ET und die klassische PMF von einer post-ET/PV Myelofibrose (MF) abzugrenzen. Diese Kategorisierung erfolgte auf Basis retrospektiver Studien, in denen beispielsweise 14-18% der initial als ET diagnostizierten Patienten als thrombozythämische präfibrotische PMF reklassifiziert wurden (Arber et al., 2022).

Das Unterscheidungsmerkmal zwischen präfibrotischer und klassischer PMF findet sich vorrangig in der Knochenmarkshistologie. Neben der quantitativen Beurteilung (Myelofibroseggrad) ist darüber hinaus die Qualität der Fibrose entscheidend: Ab einem Myelofibroseggrad von 2 sowie einer Retikulin- und/oder Kollagenfibrose, welche von Megakaryozytenproliferation und –atypie begleitet ist, liegt eine klassische PMF vor. Hingegen weist eine präfibrotische PMF zwar auch eine gesteigerte Megakaryopoese mit Atypie auf, jedoch darf hier nur ein Myelofibroseggrad von 0 oder 1 vorliegen, welcher mit einer altersadaptierten Knochenmarkszellularität, granulozytischer Proliferation und oft reduzierter Erythropoese vergesellschaftet ist.

Für beide PMF-Formen dürfen die WHO-Kriterien einer CML, PV, ET und eines MDS nicht erfüllt sein. Zudem muss der Nachweis einer JAK2-, MPL-, CALR-Mutation oder eines

anderen klonalen Markers vorliegen sowie kein Hinweis für eine reaktive Myelofibrose (wie zum Beispiel eine minimale Retikulinfibrose Grad 1 nach einer Infektion) bestehen. Die Diagnosestellung bedarf neben der genannten Hauptkriterien eines der folgenden Nebenkriterien: Leukozytose ($>11/\text{nL}$), palpable Splenomegalie, erhöhte Laktatdehydrogenase und für die klassische PMF eine Leukoerythroblastose (Barbui et al., 2018, Arber et al., 2022).

Im Verlauf der letzten Jahre wurden verschiedene Prognose-Scores für eine geeignete Risikostratifizierung etabliert. Das initial 2009 eingeführte International Prognostic Scoring System (IPSS) wurde für den Zeitpunkt der Diagnose etabliert und bewertete ein Alter >65 Jahre, einen Hämoglobinwert $<10\text{g/dL}$, Leukozyten $>25/\text{nL}$, $\geq 1\%$ zirkulierende Blasten und Symptompräsenz als Prädiktoren für eine geringere Überlebenswahrscheinlichkeit. Diese prognostischen Variablen wurden im Verlauf in das dynamische prognostische Scoring System (DIPSS) integriert, welches eine Risikostratifizierung zu jeder Zeit der Erkrankung zulässt. Durch eine Erweiterung um drei weitere Risikofaktoren (Thrombozytenzahl, Erythrozytenkonzentrat/ Transfusionsbedarf, unvorteilhafter Karyotyp) entstand der DIPSS-plus Score. Im Zuge der zunehmenden Relevanz von Mutationen für PMF wurden in den vergangenen Jahren zwei weitere Scoring Systeme eingeführt: Das “mutation-enhanced international prognostic scoring system for transplant-age patients” (MIPSS70) und dessen Erweiterung um den Karyotyp (MIPSSv2) sowie das “genetically-inspired prognostic scoring system” (GIPSS). Während bei GIPSS Mutationen und Karyotyp im Zentrum stehen, basiert das MIPSSv2 auf genetischen und klinischen Risikofaktoren. Gemeinsam dienen sie neben der Risikoabschätzung einer Blastentransformation vor allem der Selektion geeigneter Patienten für eine Stammzelltransplantation. Neben dem Alter, Anzahl zirkulierender Blasten und Anämie deuten das Vorliegen einer IDH1, SRSF2 und ASXL1 Mutation auf ein erhöhtes Risiko für eine leukämische Entwicklung hin. Darüber hinaus resultieren aus den genannten Scoringssystemen die risikoadaptierte Therapie des jeweiligen Patienten.

Eine beobachtende Haltung wird in Patientengruppen mit niedrigem Risiko (10-Jahresüberleben 56-92%) verfolgt. Hingegen wird bei Hochrisikopatienten (geschätztes 10-Jahres-Überleben 0-13%) eine allogene Stammzelltransplantation angestrebt. Die Therapie von Patienten mit intermediärem Risiko (geschätztes 10-Jahres-Überleben 30%) adressiert neben der Behandlung klinischer Symptome, den Einschluss dieser Patienten in klinische Studien und betont auf diese Weise die Notwendigkeit, den Krankheitsursprung und damit einhergehende pathologische Mechanismen dieser Erkrankung zu erforschen, um

erfolgsversprechende Therapien zu etablieren. So spielen JAK2-Inhibitoren wie Ruxolitinib oder Feratinib (und des Weiteren Hydroxurea) nur in der Symptombekämpfung der Splenomegalie eine Rolle. Androgene, Prednisolon, Thalidomid und Danazol werden hingegen bei Anämie eingesetzt. Eine kuratives Therapiekonzept stellen diese Medikamente allerdings nicht dar (Tefferi, 2021).

3.1.4 Genetische Mutationen

Vor dem Hintergrund der Klonalität ist das Initialereignis der MPN in der hämatopoetischen Stammzellfraktion zu verorten. Die direkte oder indirekte Dysregulation des JAK/STAT-Signalwegs als Folge somatisch erworbener Drivermutationen stellt dabei das zentrale Kennzeichen des molekularen Pathomechanismus von MPN dar und bedingt deren Phänotyp. Resultierend aus einer Hypersensitivität oder Entkopplung von physiologischen Zytokinregulationen mit fehlenden Feedbackmechanismen ist dieser Phänotyp geprägt von exzessiver Myeloproliferation (Vainchenker et al., 2011, Nangalia and Green, 2017).

3.1.4.1 JAK2

Mit der Entdeckung der JAK2V617F Mutation 2005 wurde ein großer Fortschritt im Verständnis der Pathogenese von MPN vollzogen. JAK2 ist eine Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase, welche eine essentielle Rolle bei der Signaltransduktion von Klasse 1 Zytokinrezeptoren wie dem Erythropoietin Rezeptor (EPOR), dem Thrombopoietinrezeptor (THPOR) sowie dem Granulozyten-Koloniestimulierendem Faktor-Rezeptor (G-CSFR) im Rahmen der normalen Myelopoese spielt (Zoi and Cross, 2017).

Eine Punktmutation in Exon 14 des JAK2 Gens mündet in einer Substitution der Aminosäure Valin zu Phenylalanin und einer folglichen Konformationsänderung mit einer dauerhaften Aktivierung von JAK2 und somit auch des JAK/STAT Signalweges, auch ohne der normalerweise obligaten Ligandenbindung. Diese Mutation ist in 95% der PV-Patienten und nahezu 50% der ET- und PMF-Patienten zu finden. 5% der PV Patienten weisen hingegen eine Mutation in Exon 12 des JAK2 Gens auf, welche weder bei ET noch bei PMF Patienten nachzuweisen ist und durch Überstimulation des EPOR Signalweges zu einer Erythrozytose führt (Greenfield et al., 2021).

3.1.4.2 MPL

Eine indirekte Dysregulation der JAK2 Signaltransduktion erfolgt hauptsächlich durch aktivierende Mutationen in MPL oder CALR.

Es wurden bereits diverse Gain-of-Function-Mutationen von MPL in Exon 10 gefunden, von denen MPLW515L und MPLW515K, welche die Substitution von Tryptophan (W) an Codon 515 zu Leucin (L) oder Lysin (K) abbilden, die häufigsten darstellen und zwischen 3-8% der ET- und (prä-)PMF-Patienten betreffen. Die Aminosäure 515 ist in eine Abfolge von fünf Aminosäuren eingebettet, welche eine wichtige Funktion in der zytosolischen Konformation des THPORA durch eine Verhinderung dessen spontaner Aktivierung spielt. Die genannten MPL Mutationen bewirken somit ebenfalls eine wesentliche Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs (Nangalia and Green, 2017, Vainchenker and Kralovics, 2017).

3.1.4.3 CALR

Im Jahr 2013 wurden in JAK2- und MPL-negativen ET-/MF-Patienten die Mutationen von CALR entdeckt. Diese Mutationen zeigen Insertionen oder Deletionen des terminalen Exons und bewirken eine Leserasterverschiebung mit konsekutivem neuartigen C-Terminus. 80% der Mutationen betreffen dabei Typ 1 (52bp Deletion) oder Typ 2 (5bp Insertion). Die Identifizierung der Mutation von CALR stellte zunächst eine überraschende Entdeckung dar, da es kontrastierend zu den bisherigen Mutationen nicht als direkter Akteur des JAK/STAT Signalwegs, sondern vielmehr als Chaperon des endoplasmatischen Retikulums (ER) bekannt war. In seiner Funktion als Haushaltsgen adressiert es die korrekte Konformation von Glykoproteinen, bevor diese in Richtung Zellwand oder zur extrazellulären Sekretion wandern. In verschiedenen Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass in Anwesenheit von MPL, die CALR-Mutation einen ET/MF-Phänotyp bedingen kann. Der genaue Mechanismus der Komplexbildung mit folgender Aktivierung des THPORA und damit JAK2 ist bisher jedoch nicht abschließend geklärt (Gangat and Tefferi, 2020, Marty et al., 2016, Zoi and Cross, 2017).

3.1.4.4 Triple-negativ

Patienten, welche keine der drei Driver-Mutationen (JAK2, CALR und MPL) aufweisen, werden als “Triple negativ” bezeichnet. Durch die verstärkte Entwicklung und Verfügbarkeit der genetischen Sequenzierung in den letzten Dekaden wurde die genetische Heterogenität der MPN-Gruppe immer deutlicher. Nicht nur bei Triple negativen Patienten, sondern bei bis zu einem Drittel der MPN Patienten, finden sich eine Reihe von weiteren pathologischen Genen, welche die DNA Methylierung (DNMT3A, TET2, IDH1/2), Chromatin Modifikationen (ASXL1, EZH2, IDH1/2), das Spleißen der Messenger RNA (mRNA)

(U2AF1, SF3B1, SRSF2) und die DNA-Reparatur (TP53) verändern (Liu et al., 2020, Triviai et al., 2019).

3.2 CD133+ Stammzellfraktion in MPN

Die Ursprünge der MPN lassen sich bis in die hämatopoetische Stammzellfraktion, welche die Klonalität dieser Erkrankungsgruppe prägt und bestimmt, verfolgen. In den letzten Jahren konnte durch verschiedene Studien die angenommene Hypothese, dass die Zielzelle von MPN an der Spitze der Hämatopoese steht und somit eine multipotente Stammzelle abbildet, bestätigt werden (Jacobson et al., 1978, Levine et al., 2006, Jamieson et al., 2006, Delhommeau et al., 2007).

Im Fokus dieser Arbeiten standen CD34+ hämatopoetische Stamm-/ und Progenitorzellen (HSPCs), welche bei MPN und besonders bei PMF-Patienten in hoher Konzentration im peripheren Blut zu finden sind. Durch weitere Untersuchungen und Vorarbeiten in unserer Forschungsgruppe konnte das CD133 Antigen, welches in der Stammzellhierarchie noch vor CD34 exprimiert werden kann, somit ein „Long-term“ HSCs markiert, und darüber hinaus auch bei soliden Tumoren zu der Identifikation maligner Stammzellen eingesetzt wird, als Marker der potentiell relevanten neoplastischen Stammzelle bestimmt werden (Gallacher et al., 2000, Mizrak et al., 2008, Bhatia, 2001). Diese CD133+CD34+ HSPCs zeigten in den Untersuchungen multipotentes Differenzierungspotenzial in vitro und verursachten das Erkrankungsbild von PMF im Sinne einer Fibrose und Sklerose bis zu einer leukämischen Transformation in immunkompromittierten Mäusen (Triviai et al., 2015).

3.3 Knochenhomöostase und Osteosklerose

Die genaue Rolle der zuvor aufgeführten HSC-verbundenen genetischen Aberrationen in der neoplastischen Myelopoese ist bisher nicht vollständig erforscht. Ebenso lückenhaft ist das Verständnis über die damit verknüpften zellulären Interaktionen, die eine Knochenmineralisation stimulieren und vermutlich auf einer aberranten Monopoese beziehungsweise auf einem gestörten Gleichgewicht zwischen knochenaufbauenden Osteoblasten und knochenabbauenden Osteoklasten (OSC) basieren (Veletic et al., 2019).

Hingegen erster Annahmen, dass eine MF Osteosklerose durch überstimulierte und von mesenchymalen Stromazellen (MSC) abstammenden Osteoblasten ausgelöst oder durch den osteoklastischen Inhibitor Osteoprotegerin induziert werde (Bock et al., 2005, Wang et al., 2004), konnte dies weder von klinischen noch experimentellen Daten bestätigt werden (Veletic et al., 2019). Da, wie bereits zuvor beschrieben, Osteoklasten in Kontrast zu

Osteoblasten durch die Fusion monozytischer Progenitoren entstehen, wurde die Hypothese aufgestellt, dass mögliche Hintergründe einer Osteosklerose bei den multinukleären Osteoklasten zu erforschen sind (Spampinato et al., 2021, Raggatt and Partridge, 2010, Wang et al., 2022). Die genannte Hypothese wird zudem im Hinblick auf die einzige kurative Therapieoption der Erkrankung, die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation, welche einen Austausch des gesamten Blutsystems bedeutet, sowie zu einer Rückbildung der Knochenmarksfibrose und Osteosklerose führt, bestärkt (Kröger et al., 2023, Kröger et al., 2009, Thiele et al., 2005, Sale et al., 2006). Erkenntnisse dieser Therapiestrategien fußen auf Arbeiten der neunziger Jahre, in welchen bereits gezeigt werden konnte, dass eine durch Überproduktion von Thrombopoetin (THPO) entstandene Myelofibrose und Osteosklerose in Mäusen durch eine sekundäre Knochenmarktransplantation geheilt werden konnten (Yan et al., 1996).

Dabei sei jedoch angemerkt, dass die Mehrzahl bisheriger Studien bei der Untersuchung von Osteoklasten auf Zellebene vorrangig ihren Fokus auf die Kultivierung CD14 positiver Monozyten aus dem peripheren Blut setzte, um unter anderem Differenzierung, Mutationslast und Funktionalität zu analysieren. Ergebnisse dieser Arbeiten führten zu der Erkenntnis, dass Osteoklasten von Patienten im Vergleich zu denen von gesunden Spendern eine hohe (JAK2V617-) Mutationslast, eine verminderte Kernanzahl sowie eine geringere Resorptionsfähigkeit aufwiesen (Veletic et al., 2017). Diese Arbeiten waren und sind wichtig, um die Beeinträchtigung der Osteoklasten als Zellen hämatopoetischen Ursprungs und ihrer Rolle besonders in den Endstadien von MPN hervorzuheben. Es sei dabei jedoch festzuhalten, dass in Bezug auf die Klonalität sowie den Ursprung dieser Erkrankungen jene Arbeiten nur die „Endstrecke“ der osteoklastischen Differenzierung berücksichtigen und somit nicht den Entwicklungsweg von der hämatopoetischen Stammzelle, also der Ursprungszelle, beleuchten.

3.4 Osteoklasten

Der Ursprung der multinukleären, knochenresorbierenden Zellen geht auf eine pluripotente hämatopoetische Stammzelle zurück. Auch wenn in einem Großteil bisheriger Studien der Fokus auf die Differenzierung von Osteoklasten (OSC) aus monozytischen Progenitoren gelegt wurde, gibt es wenige Arbeiten, die eine Kultivierung von Osteoklasten aus der bipotenten hämatopoetischen Stammzelle “granulocyte-macrophage colony-forming unit” (CFU-GM) zeigen konnten (Menaar et al., 2000). Mausmodellstudien konnten darüber hinaus die enge Verknüpfung zwischen Stromazellen und Prä-Osteoklasten in der

Entwicklung von OSCs, welche vorrangig über Mediatoren, wie zum Beispiel M-CSF und RANKL, abgebildet wird, nachweisen. Die Bindung dieser Liganden an ihre Zielrezeptoren auf den hämatopoetischen Vorläuferzellen induziert die Expression typischer Gene der Osteoklastogenese, zu denen unter anderem die Tartrate-resistant-acid-Phosphatase (TRAP), Cathepsin K (CTK) und das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin gehören, und führt anschließend zu der Entwicklung reifer multinukleärer Osteoklasten.

Die Aktivierung eines reifen Osteoklasten wird primär durch eine Interaktion von RANKL und dessen Rezeptor RANK auf der Zellmembran der Knochenzellen ausgelöst und initiiert über eine Neuordnung des Aktin-Zytoskeletts die Polarisierung des Zellkörpers, welches anschließend eine Knochenresorption ermöglicht. Die Hauptfunktionen schließen demnach die Adhärenz zu sowie die Migration über Knochenoberflächen, die Synthese und gesteuerte Sekretion hydrolysierender Enzyme, Azidifikation der zu resorbierenden Umgebung über Protonenpumpen und abschließend die Aufnahme der abgebauten extrazellulären Knochenprodukte ein (Bruzzaniti and Baron, 2006, Soysa and Alles, 2016).

Das Überleben reifer und funktionsfähiger Osteoklasten wird durch diverse Zytokine und Hormone reguliert, von denen Interleukin 1 (IL1) sowie RANKL das Überleben der Zellen in vitro sowie in vivo verlängern konnten (Boyle et al., 2003).

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Ausrüstung

Tabelle 1: Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Name	Hersteller
Hämatologie Analysator	KX-21	Sysmex
Zytozentrifuge	Cytospin 2	Shandon
Microzentrifuge	MC-13	Heraeus
Sicherheitswerkbank	Hera Safe	Heraeus
Pipetten (10µl, 200µl, 1000µl)	Research plus	Eppendorf
Elektronische Pipettierhilfe	Easy Pet 3	Eppendorf
Vortexer	Reax 2000	Heidolph
Inverses Lichtmikroskop	Wilovert S	Hund Wetzlar

Inkubator (Colony Assays)	Hera Cell	Heraeus
Inkubator (Zellkultur)	Hera Cell 240	Heraeus
ApoTome Mikroskop	Axiovert 200 MAT	Zeiss
Durchflusszytometrie	FACSaria Fusion, FACSaria Illu	BD
Thermocycler PCR	T100 Thermal Cycler	Bio-Rad
Diamantensäge	EXAKT Diamantbandsäge 300	EXAKT

Tabelle 2: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Artikel	Größe	Hersteller	Artikelnummer
Pipettenspitzen	10µl	Greiner-bio-one	771 261
Pipettenspitzen	100µl, 200µl, 1250µl	Sarstedt (Biosphere)	70.118.210, 70.760.211/212
Serologische Pipette	5ml, 10ml	Sarstedt	86.1253.001/ 86.1254.001
Serologische Pipette	2ml, 25ml	Falcon	356507, 356525
Zentrifugenröhrchen	15ml, 50ml	Cellstar by Greiner Bio One	188271, 227261
FACS-Röhrchen	12 x 75 mm	Falcon	352054
SafeSeal Reagiergefäß	1,5ml	Sarstedt	72706400
Eppendorf Protein LoBind Tubes	1,5ml	Eppendorf	30108116
Kryoröhrchen	1,8ml	Thermo Scientific	363401
Spritzenvorsatzfilter	Filtropur S 0,2µm	Sarstedt	831.826.001
Zellkultur Multiwellplatte	48 wells	Greiner-bio-one	677980
Zellkultur Petrischalen	35 x 10mm	Thermo Scientific	153066
Zellkulturschale	100 x 20 mm	Sarstedt	83.3902
Objektträger, unbeschichtet	Shandon™ Single Cytoslides™	Epredia	5991051
Einmalspritzen	Luer-Solo, 2ml	B.Braun	4606027V
Shuntkatheternadel	1.7mm/ 16G	Medikit	SP502-16 (33)

Verbrauchsmaterial für Zytozentrifugen Cellspin®, Single Cellfunnel®	Cellspin®, Single Cellfunnel®	TH Geyer	4660918
Neubauer Zählkammer improved	0,1mm	Marientfeld	0640010

4.1.2 Medien und Reagenzien

Tabelle 3: Liste der verwendeten Medien und Reagenzien

Artikel	Hersteller	Artikelnummer
Dulbecco's Balanced Salt Solution (DPBS)	Gibco	14190-094
Hitzeinaktiviertes fetales Rinderserum (FBS)	Gibco	10500
MEM α, keine Nukleoside	Gibco	12561-056
Iscove's modified Dulbecco's medium	Gibco	12440-053
(IMDM 1x)	Sigma	A9418-100G
Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml)	Gibco	15140-122
Ciprofloxacin, 98 %	Thermo Scientific	85721-33-1
0.25% Trypsin-EDTA	Gibco	25200-056
MethoCult H4435, enriched	StemCell Technologies	04435
Red blood cell lysis buffer (10x)	BioLegend	420301
Ficoll-Paque PLUS	GE Healthcare	17-1440-03
Trizol reagent	Ambion	15596-026
RosetteSep™ Human Bone Marrow Progenitor Cell Pre-Enrichment Cocktail	StemCell Technologies	15027
Trypan blue solution (0.4%)	Sigma	T8154
Giemsa-Stammlösung für die Mikroskopie	TH Geyer	T862-500ml
May-Grünwald's solution	Merck	1014240500
Puffertabletten pH 6,4	Merck	111373
Chloroform	Sigma	288306-100ML
Isopropanol	Fisher scientific	10366430
Methanol	Roth	4627.1

Tween 20	Roth	9127.1
75% EtOH	EMD Millipore	24105-1L-M
Triton X-100	Sigma	9036-19-5
autoMACS® Running Buffer	Miltenyi Biotec	130-091-221
Accutase - Enzyme Cell Detachment Medium	ThermoFisher	00-4555-56
Dentine Discs	IOBM	-
Toluidinblau O (C.I. 52040)	Sigma-Aldrich	92-31-9
ROTI®Histol, 1 l, Glas	ROTH	6640.1
Saure Phosphatase, Leukozyten (TRAP) Kit	Sigma-Aldrich	42010102
Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit für RT-qPCR	Thermo Fisher	K1641
QIAamp DNA Micro Kit	Qiagen	56304
eBioscience™ 1x RBC Lysepuffer	Invitrogen	00-4333-57
Phagocytosis Assay Kit (IgG FITC)	Cayman	500290
Pierce™ 16 % Formaldehyd (w/v), methanolfrei	ThermoFisher	28908
Tartrate solution	Sigma	3873-10ML
RNase-Hemmer	ThermoFisher	N8080119
FACSClean Solution	BD	340345

4.1.3 Zytokine und Fluoreszenzfarbstoffe

Tabelle 4: Liste der verwendeten Zytokine und Wachstumsfaktoren

Zytokin/ Wachstumsfaktor	Hersteller	Artikelnummer
Recombinant Human IL-6	PeproTech	200-06
Recombinant Human IL-1β	PeproTech	200-01B
Recombinant Human IL-3	PeproTech	200-03
Recombinant Human SCF	PeproTech	300-07
Recombinant Human GM-CSF	PeproTech	300-03

Tabelle 5: Liste der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und -konjugaten

Fluoreszenzfarbstoff/ -konjugierte Antikörper	Klon	Hersteller	Artikelnummer
CD90 PE-Cy™7	5E10	BD	561558
CD38 APC-H7	HB7	BD	656646
CD41 BV510	HIP8	Biolegend	303736
CD123 Brilliant Violet 785	6H6	Biolegend	306032
CD45RA APC	HI100	BD	550855
CD133 PE	293C3	Miltenyi Biotec	130-107-453
CD34 PerCP Cy5.5	581	BioLegend	343522
CD2 FITC	RPA-2.10	BD	555326
CD3 FITC	HIT3a	Beckman Coulter	555339
CD4 FITC	RPA-T4	BD	555346
CD8 FITC	DK25	Dako	F0765
CD11b FITC	ICRF44	BD	562793
CD14 FITC	RMO52	Beckman Coulter	IM0645
CD19 FITC	HIB19	BD	555412
CD20 FITC	2H7	BD	555622
CD56 FITC	B159	BD	562794
CD235a FITC	JC159	Dako	F0870
CD16 FITC	B73.1	BD	561308
CD45 PECy7	HI30	BioLegend	304016
HLA-DR APC	TU36	BD	559868
RANK AF405	80704	R&D Systems	FAB683V-100UG
CTK PeCy	polyklonal	biorbyt	orb130760
CD51/CD61 BV711	23C6	BD	744092
CD254 (RANKL) APC	DN254	Miltenyi Biotec	130-098-511
CAII FITC	polyklonal	AssayPro	30109-05141
CD83 PE	HB15e	Biolegend	305322

CD1a FITC	HI149	Biolegend	300104
DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride)		ThermoFisher	D1306
Propidium Iodide		Thermo Fisher	BMS500PI
ELF™ 97 Endogenous Phosphatase Detection Kit		Thermo Fisher	E6601

4.2 Methoden

4.2.1 Isolierung der CD133+CD34+ Stammzellfraktion

Für eine Isolierung mononukleärer Vorläuferzellen wurde nach erfolgreicher Einwilligungserklärung peripheres Patientenblut sowie das Knochenmark gesunder Spender verwendet. Für eine spezifische Anreicherung von Stamm- und Progenitorzellen wurde das RosetteSep™ Human Bone Marrow Progenitor Cell Pre-Enrichment Cocktail, welches "Lineage"-spezifische Zellen durch negative Selektion aussortiert, verwendet. Mit Hilfe tetramerischer Antikörper gegen die Lineage-spezifischen Marker CD2, CD3, CD4, CD8, CD11b, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56, und CD235a gelingt eine Vernetzung der Lineage-positiven Zellen mit Erythrozyten, wodurch die sogenannten Rosetten entstehen. Bei der Durchführung wird 1ml der jeweiligen Probe mit 20µl des Cocktails für einen Zeitraum von 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 35 ml MACS-Puffer verdünnt sowie vorsichtig auf 15 ml Ficoll-Medium eines 50 ml Falcon Röhrchens gegeben. Danach erfolgt eine pausenlose Zentrifugation mit geringer Beschleunigung (2000 rpm, 15 Minuten). Ficoll ist ein aus Saccharose und Epichlorhydrin sowie Natriumdiatrizoat bestehendes und hochverzweigtes Polymer, welches als Dichtegradientenmedium der Fraktionierung mononukleärer Zellen (MNC) aus dem peripheren Blut dient. Die Inkubation der Antikörper und Bettung auf Ficoll mit anschließender Dichtegradientenzentrifugation bewirkt, dass sich die Rosetten in der erythrozytären Phase am Boden des Ficoll-Röhrchens als Pelett anordnen und nicht in der mononukleären Phase, in der sich dann nur Lineage-negative Progenitorzellen finden. Während sich reife Lineage-Zellen mit Erythrozyten also im Sediment des Röhrchens finden, ordnet sich die MNC-Phase zwischen Medium und Serum an. Zur Gewinnung der MNCs wird die beschriebene Phase mit Hilfe einer 5 ml Pipette aspiriert und erneut zentrifugiert, um überschüssiges Medium und Serum zu entfernen. Für maximale Reinheit

der Proben wurden verbleibende Erythrozyten mit Erythrozyten-Lyse-Puffer inkubiert und erneut zentrifugiert. Der Lysepuffer, bestehend aus Ammoniumchlorid, Kaliumkarbonat und Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), erlaubte die effektive Lyse der roten Blutzellen bei gleichzeitiger Schonung nukleärer Zellen.

Für eine weitere effektive Isolierung der Lin-CD133+CD34+ Stammzellfraktion wurden die MNCs mit einerseits Lineage- und andererseits Stammzell- und Progenitor-spezifischen Antikörpern gefärbt (s. Tabelle 6). Diese Färbung erfolgte in MACS-Puffer auf Eis mit einer anschließenden Inkubation von 30 min bei 4°C. Nach Inkubation wurden die Zellen erneut mit MACS-Puffer gewaschen und die gewünschten Zellfraktionen mit Hilfe der Durchflusszytometrie an einem FACS Aria Fusion oder Aria Illu (BD Biosciences) in Mikrozentrifugenröhrchen mit geringer Proteinbindung sortiert. In Abhängigkeit des jeweils folgenden Experiments erfolgte die Zellsortierung in MACS-Puffer, Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) oder Zellkulturmedium (s.u.).

Tabelle 6: Antikörper zur Isolation einer CD133+CD34+ Stammzellfraktion

Analyse	Antikörper	Fluorchrom
Lineage Depletion	anti-human CD2, 3, 4, 8, 11b, 14, 19, 20, 56, 253a	FITC
HSC Isolation/Detektion	anti-human CD133	PE
HSC Isolation/Detektion	anti-human CD34	PerCP Cy 5.5
HSC Isolation/Detektion	anti-human CD45RA	APC
HSC Isolation/Detektion	anti-human CD90	PE Cy7
HSC Isolation/Detektion	anti-human CD123	BV 785
HSC Isolation/Detektion	anti-human CD38	APC H7
HSC Isolation/Detektion	anti-human CD41	BV 510

4.2.2 CD133+ CD34+ Zellkulturen

Nach erfolgreicher Zellsortierung mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde die Zellviabilität mit Hilfe einer Trypanblaufärbung mikroskopisch überprüft. Während Trypanblau von perforierten und abgestorbenen Zellen aufgenommen wird, werden lebensfähige Zellen hingegen nicht von dem Farbstoff angefärbt.

Die im gleichen Schritt in einer Neubauer Zählkammer mikroskopisch gezählten Lin-CD133+CD34+ Zellen wurden mit einer Konzentration von 1×10^6 pro "Well" einer "48-well-plate" (= Zellkulturplatte) in 0,5 ml Medium pro Well aus α -MEM mit 20% fetalem

Kälberserum, 1% bovinem Serumalbumin sowie jeweils 10 µl des Granulozyten-/Makrophagen Koloniestimulierenden Faktors (GM-CSF), Stammzellfaktors (SCF) und den Interleukinen IL-1, IL-3 sowie IL-6 für eine (Phagozytose-Assay) bzw. drei bis fünf Wochen (Osteoklastenkultur), wie zuvor von Matayoshi et al. beschrieben, kultiviert (Matayoshi et al., 1996). Das Kulturmedium inklusive der Wachstumsfaktoren wurde zweimal pro Woche gewechselt.

Von jeder Probe wurden 3×10^6 Zellen auf drei Dentin-Chips aus Elfenbein mit jeweils 1×10^6 Zellen pro Chip und pro Well ausplattiert. Durch die Kollaboration mit dem Institut für Osteologie und Biomechanik (IOBM) hatten wir Zugang zu verschiedenen Dentinchargen, welche vorab bereits getestet wurden und vergleichbare Ergebnisse in Mausmodellen lieferten. Vor Ausplattierung wurde das Elfenbein mit einer Diamantensäge in 200 µm dicke Chips geschnitten und in 80% reinem Ethanol gelagert. Abbildung 1 veranschaulicht die wichtigsten Schritte des Versuchsaufbaus von der Probengewinnung aus humanem KM und Patientenblut bis hin zu der Ausplattierung der humanen Stammzellen.

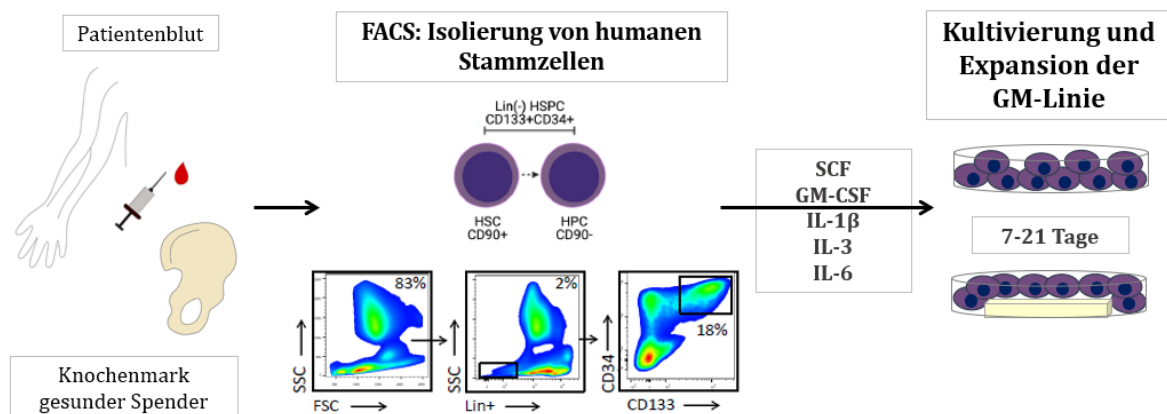


Abbildung 1: Etablierung einer humanen Osteoklastenkultur

4.2.3 Charakterisierung und Sortierung multinukleärer Zellen

Als bald in der Lichtmikroskopie multinukleäre Zellen (>10 Nuclei/ Zelle) zu detektieren waren, wurden die reifen Osteoklasten mit Hilfe der Durchflusszytometrie an einem FACS Aria-Fusion oder –Illu isoliert. Dazu erfolgten vorab zwei kombinierte aufwendige und neu etablierte Färbeprotokolle für humane Osteoklasten (FACS panel 1 und FACS panel 2), deren Basis ein Paper von Ibáñez et al. mit murinen Osteoklasten bildete, welche im Folgenden verbunden erläutert werden (Ibáñez et al., 2016).

Um zunächst die adhärenenten (Prä-) Osteoklasten von den Zellkulturplattenböden abzulösen, wurden die Zellen in einem ersten Schritt 60 Minuten mit Accutase inkubiert. Accutase enthält kollagenolytische und proteolytische Enzyme, welche die Spaltung von Zelladhäsionsstrukturen adhärenter Zellen ermöglicht.

Für eine anschließende Fixierung, welche für eine suffiziente Färbung mit dem OSC-spezifischem Enzym Tartrate-resistant acid-phosphatase (TRAP) nötig ist, wurden die Zellen in methanolfreiem Formaldehyd resuspendiert. Im darauffolgenden Schritt erfolgte dann in FACS panel 1 die Färbung mit den Oberflächenmarkern CD14, CD16, sowie CD45 und in FACS panel 2 mit Human Leukocyte Antigen (HLA)-DR, $\alpha_v\beta_3$, Receptor Activator of NF- κ B (RANK) und Receptor Activator of NF- κ B ligand (RANKL) auf Eis.

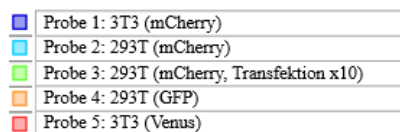
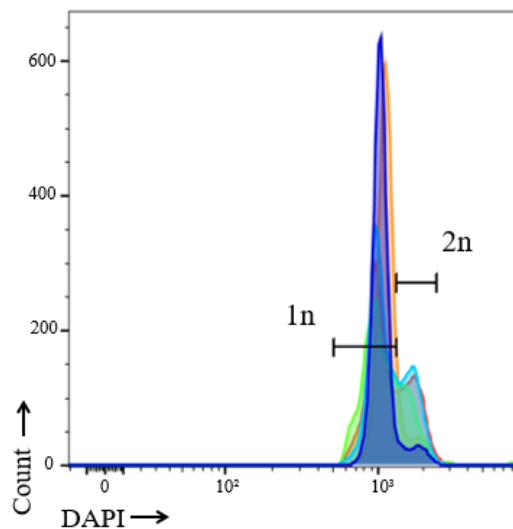
Um darüber hinaus eine effektive intrazelluläre Färbung zu gewährleisten, wurden die Zellen mit 0,2% Tweenlösung permeabilisiert und für das zweite FACS panel mit Carboanhydrase 2 (CA2) und Cathepsin K (CTK) gefärbt. Nach der abgeschlossenen intrazellulären Färbung wurden die Zellen für eine TRAP-Färbung, welche mit dem ELF97 Endogenous Phosphatase Detection Kit und nach Herstellerprotokoll erfolgte, vorbereitet. Der vermeintlich wichtigste Schritt, die intranukleäre Färbung zum Nachweis der Multinuklearität, erfolgte am Ende mit 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) (1 μ g/ml) oder Propidium-Iodid (PI) (20 μ g/ml + 10 μ g/ml RNase) (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Antikörper zur Detektion von Zellen der Osteoklastogenese

Analyse	Antikörper/ Zielstruktur	Fluorchrom	FACS-panel
Monopoese	anti-human CD14	PerCP Cy5.5	1
Monopoese	anti-human CD16	FITC	1
Monopoese	anti-human CD45	PeCy 7	1
Monopoese	anti-human HLA-DR	APC	1
Osteoklastogenese	anti-human CTK	PeCy 7	2
Osteoklastogenese	anti-human CA2	FITC	2
Osteoklastogenese	anti-human CD51/CD61 ($\alpha_v\beta_3$)	BV711	2
Osteoklastogenese	anti-human CD254 (RANKL)	APC	2
Osteoklastogenese	anti-human CD265 (RANK)	AF405	2
Osteoklastogenese	TRAP	ELF 97 Phosphatase Substrat	1+2
Osteoklastogenese	Nuclei	DAPI	1
Osteoklastogenese	Nuclei	PI	2

Die Fluoreszenzintensität des entsprechenden Farbstoffs, welche einem Nucleus entspricht, wurde mit der Hilfe von zwei verschiedenen Zelllinien (293T und 3T3) mit fluoreszierenden Proteinen (GFP, mCherry, Venus) auf Basis etablierter Methoden der Forschungsabteilung Zell- und Gentherapie des UKEs überprüft (siehe Abbildung 2) (Weber et al., 2010, Weber et al., 2012).

2A: DAPI



2B: PI

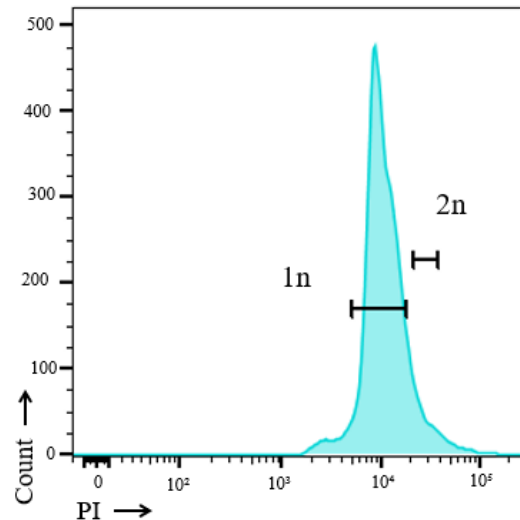


Abbildung 2A-B: Darstellung der Fluoreszenzintensität von DAPI (2A) und PI (2B) für einen Zellkern (1n) sowie in Mitose befindliche Zellen (2n)

Kongruent zu den Intensitäten im Sinne der Kernanzahl erfolgte bei der Durchführung der beiden FACS-panels eine Sortierung in MACS-Puffer, die die phänotypische Kontrolle der Multinuklearität und Beurteilung der Zellen erlaubte, und des Weiteren in DNA-Lysepuffer für eine anschließende Mutationsanalyse.

Abbildung 3 zeigt beispielhaft verschiedene mithilfe der Durchflusszytometrie sortierte Zellfraktionen in Abhängigkeit der DAPI-Intensität und bestätigte somit die Korrelation von Kernanzahl zu DAPI-Intensität.

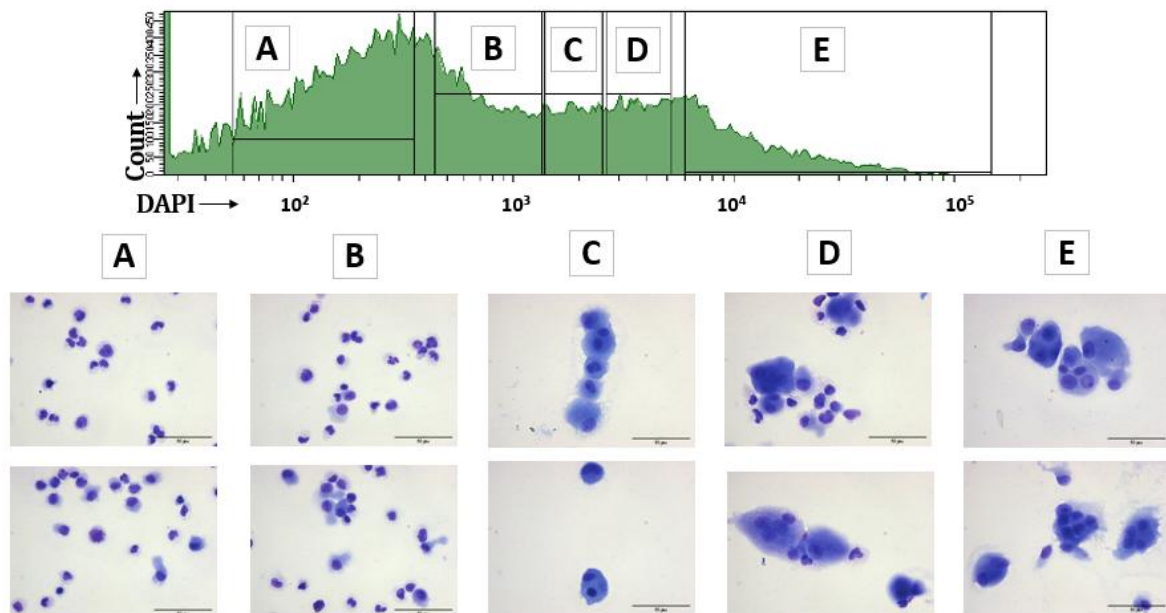


Abbildung 3A-D: Zunahme der Kernanzahl bei gleichzeitiger Steigerung der Farbstoffintensität. Stufenweise Veranschaulichung durch Zytospins in den Abschnitten A-D.

A: Mononukleäre Zellen auf frühen Differenzierungsebenen der Monopoese mit einem Kern-Plasma-Verhältnis zugunsten des Zellkerns; B: Viele reife und teilungsaktive mononukleäre Zellen bis $n=2$; C: Zunahme der Zellgröße und Multinuklearität; D+E: Multinukleäre Zellen mit $n>3$ (D) und $n>4$ (E).

Die Daten der Durchflusszytometrie wurden anschließend mit der Flowjo Software V10 analysiert. Die weitere statistische Datenverarbeitung erfolgte mit GraphPad Prism 5. Zunächst wurden die zu analysierenden Kohorten durch den Shapiro-Wilk-Test auf ihre Normalverteilung nach Gauss überprüft. Konnte die Normalverteilung bestätigt werden, wurde die statistische Signifikanz mit Hilfe des ungepaarten T-Tests überprüft. Waren die Kohortengrößen zu klein oder wiesen keine Normalverteilung auf, wurde der Mann-Whitney-U Test durchgeführt.

4.2.4 Morphologische Analyse der Zellfraktionen

Die mit der Durchflusszytometrie sortierten Zellpopulationen von Patienten und gesundem Knochenmark wurden unter Verwendung einer Zytocentrifuge auf Objektträger gebracht und anschließend für eine morphologische Beurteilung der Färbung nach Papenheim unterzogen. Bei dieser Methode wurden die Zellen zunächst in PBS oder MACS-Puffer sortiert, vorsichtig in die Probenkammer pipettiert und zehn Minuten bei 400 Umdrehungen (rpm) zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurden die Objektträger horizontal getrocknet und anschließend nach Papenheim gefärbt, welche eine Giesma- und May-Grünwald-Färbung

kombiniert und für eine gute Diskrimination hämatopoetischer Zellen bekannt ist. Abbildung 4 zeigt beispielhaft eine Färbung nach Papenheim nach einer Woche Zellkultur.

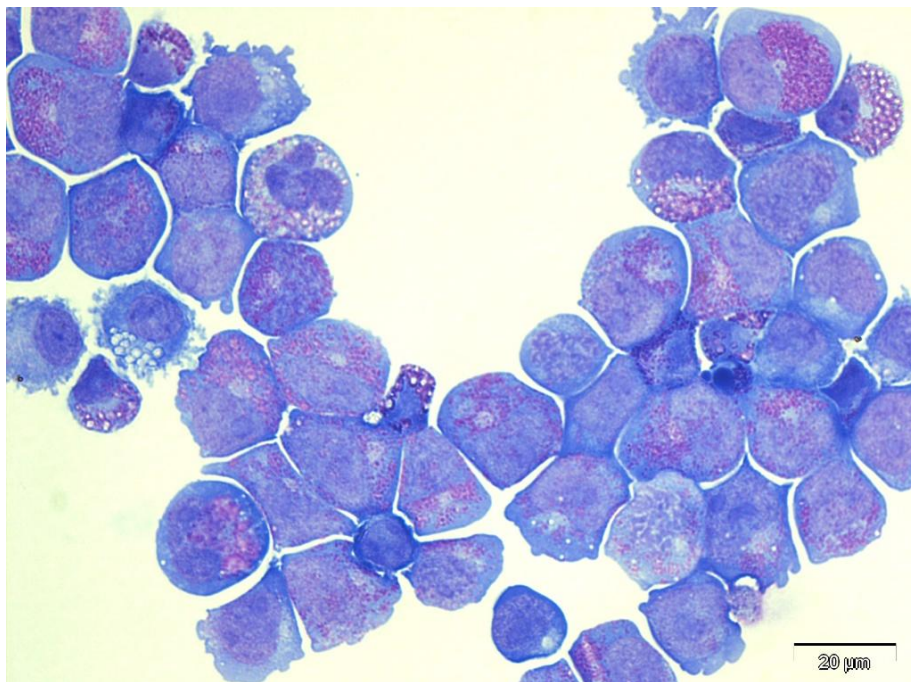
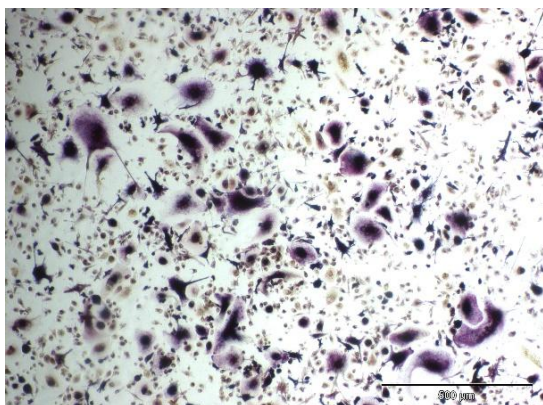


Abbildung 4: Papenheim Färbung von CD133+CD34+ Zellen nach einer Woche Zellkultur (Vergrößerung 10x)

Um darüber hinaus TRAP-positive multinukleäre Zellen in der Zellkultur nachzuweisen und morphologisch beurteilen zu können, wurden die Zellen zunächst mit Roti®Histofix fixiert, mit 0,1% Triton X-100 permeabilisiert und anschließend mit dem „Saure Phosphatase, Leukozyten-(TRAP-)Kit streng nach Herstellerprotokoll innerhalb der Zellkulturplatte gefärbt. Die TRAP-Positivität trat durch einen lila Farbstoff in Erscheinung (s. Abb. 5).

5 A



5 B

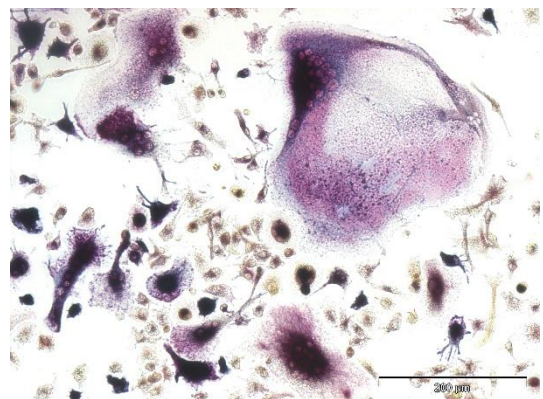


Abbildung 5A-B: TRAP-positive multinukleäre Zellen nach Abschluss der Zellkultur (Vergrößerungen: A: 4x, B: 10x)

4.2.5 Untersuchung von Knochenresorption

Neben der Durchflusszytometrie zum Nachweis osteoklastenspezifischer Enzyme, welche für eine Knochenresorption obligat sind, erfolgte die funktionelle Analyse von Osteoklasten durch eine Beurteilung von Resorptionslakunen auf Dentinchips aus Elfenbein des IOBM. Dafür wurden nach Beendigung jeder Zellkultur die Dentinchips in BD FACSClean Lösung eingetaucht, um überschüssige Zellen zu entfernen. Es folgte die mehrmalige Waschung mit destilliertem Wasser sowie eine Lufttrocknung, bevor die Elfenbeinstücke für die Dauer von einer Minute mit Toluidinblau inkubiert wurden. Die Reagenzien dieser Färbemethode wurden vorab nach Herstellerprotokoll vorbereitet. Nach abgeschlossener Inkubation wurden die Dentinchips erneut mehrfach mit Wasser abgespült und luftgetrocknet. Abbildung 6 zeigt für eine bessere Visualisierung eine vergrößerte Darstellung von toluidinblaugefärbten Resorptionslakunen.

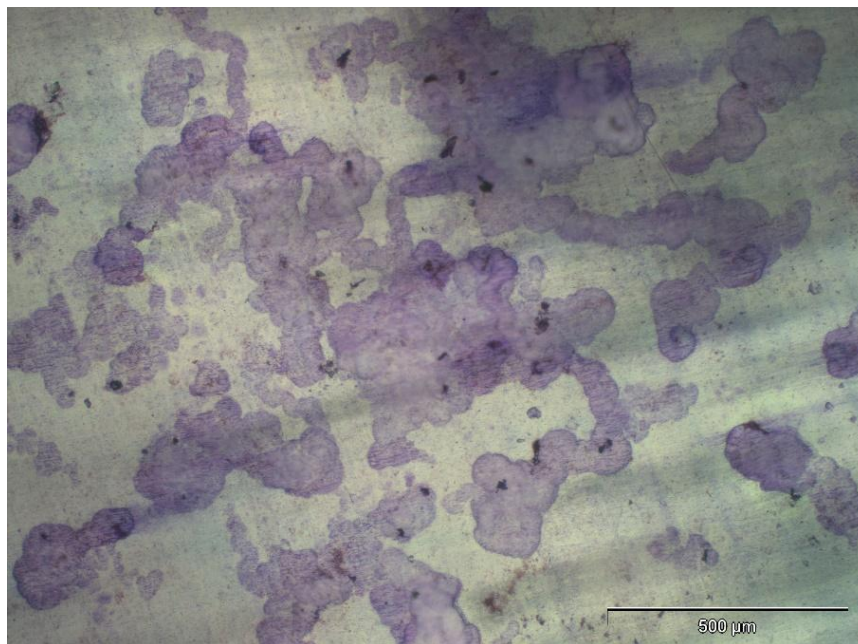


Abbildung 6: Toluidinblaugefärbte Resorptionslakunen auf einem Dentinchip

Zur Etablierung einer objektiven Vergleichsmethode wurden fotografische Aufnahmen jedes einzelnen Dentinchips mit Hilfe des Zeiss ApoTome in Auflichtmikroskopie angefertigt, welche nachfolgend mit Hilfe der Bildanalyse-Software Imaris der Firma FIJI die Ausmessung angefärbter Resorptionslakunen und –pfade erlaubte. Durch die Unterstützung der Microscopy Core Unit des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

gelang es, eine standardisierte Methode zur Bemessung von Resorptionseignissen als resorbierte Fläche in Prozent pro Chip zu entwickeln. Die einzelnen Schritte des Versuches von der Zellkultur bis hin zur mikroskopischen Analyse werden in Abbildung 7 veranschaulicht. Die statistische Signifikanz wurde in Graphpad Prism 5 mit Hilfe des Wilcoxon-Rank Tests untersucht.

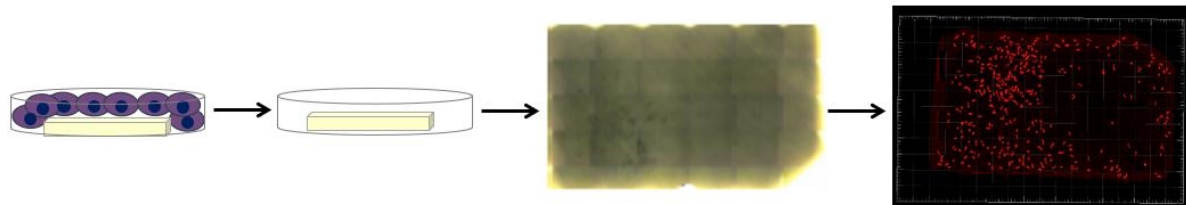


Abbildung 7: Mikroskopische Analyse von Resorptionslakunen

4.2.6 Phagozytose Assay

Um nicht nur reife Osteoklasten, sondern auch deren Vorläuferzellen phänotypisch und funktionell beurteilen zu können, erfolgte gegen Ende der Promotionsarbeit eine Erweiterung der Versuche um einen Phagozytose-Assay. Dafür wurden ebenfalls Lin-CD133+CD34+ Zellen von Patienten und gesunden Spendern nach dem bereits erläuterten Protokoll in einer 48-Well Zellkulturplatte für eine Woche kultiviert. Nach sieben Tagen erfolgte die Zellgewinnung ebenfalls durch Accutaseinkubation (5-10 min). Zum Nachweis der Phagozytoseaktivität wurde das Phagocytosis Assay Kit der Firma Cayman Chemical verwendet, welches Kanninchen-IgG beschichtete Latexperlen enthält und diese durch integrierte Fluorescein-Markierung in der Durchflusszytometrie sichtbar gemacht werden können. Dafür wurden die gewonnenen Zellen mit den beschriebenen Latex-Beads bei 37°C über vier Stunden streng nach Herstellerprotokoll inkubiert und anschließend die Färbung mit den Oberflächenmarkern CD14, CD16, HLA-DR und $\alpha_v\beta_3$ sowie in einem Randexperiment mit CD1a und CD83 durchgeführt, die eine Zuordnung zu Makrophagen und des Weiteren eine Unterscheidung von dendritischen Zellen erlauben sollte (siehe Tabelle 8). Auch bei diesem Versuch diente die Flowjo Software V10 der Datenanalyse und Graphpad Prism 5 der statistischen Auswertung. Der Versuchsaufbau wird in Abbildung 8 dargestellt.

Tabelle 8: Antikörper zur Charakterisierung phagozytierender Zellen

Analyse	Antikörper	Fluorchrom
---------	------------	------------

Monopoese	anti-human CD14	PerCp Cy5.5
Monopoese	anti-human CD16	PE
Monopoese	anti-human HLA-DR	APC
Monopoese	anti-human CD51/61	BV711
Dendritische Zellen	anti-human CD1a	FITC
Dendritische Zellen	anti-human CD83	PE
Phagozytose	IgG-FITC beads	FITC

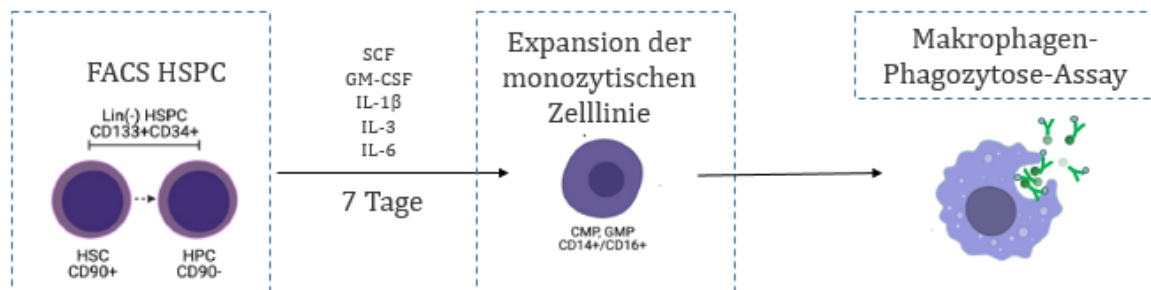


Abbildung 8: Versuchsaufbau Phagozytose-Assay

4.2.7 Koloniebildungstest

Um das Kolonie-Bildungspotential von HSPCs zu untersuchen, ist das Colony-Forming Unit (CFU) Assay ein weit verbreiteter in-vitro-Test. Hierbei werden die Zellen in dem halbfesten Medium Methylzellulose (MethoCult™ H4435 Enriched), ergänzt mit Nährmedien und den Wachstumsfaktoren SCF, IL-3, IL-6, humanes Erythropoietin (EPO), GM-CSF und Granulo-zyten stimulierendem Faktor (G-CSF), kultiviert, was eine Differenzierung zu Kolonien erlaubt. Die Anzahl der entstehenden Kolonien sowie deren morphologische Eigenschaften können Hinweise über die Differenzierungs- und Proliferationsfähigkeit der Ausgangszellen liefern. Zur Beurteilung der HSPCs nach einer Woche Zellkultur wurden diese zunächst nach Inkubation mit Accutase bei 37°C von den Zellkulturplattenböden gelöst. Es erfolgten zwei Waschschrte mit PBS und ein Zentrifugationsschritt für sieben Minuten bei 1400 rpm. Das entstandene Zellpellet wurde in 200µl Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) mit zwei Prozent FBS resuspendiert. Eine Zellzählung erfolgte mit der vorab erläuterten Trypanblaufärbung in einer Neubauer Zählkammer. Danach

wurden zwei Eppendorf Tubes mit jeweils 150µl IMDM + 2% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin sowie 1% Ciprofloxacin vorbereitet. Es wurden 1×10^4 und $1,5 \times 10^4$ Zellen in das jeweilige Tube gegeben und die Zellsuspensionen anschließend in zwei 1,6ml Methocult™ H4435 Tubes pipettiert. Es schloss sich unmittelbar das Vortexen dieser Proben für eine Dauer von 15 Sekunden sowie die nachfolgende Zentrifugation für eine Minute an, um eine homogene Verteilung der Zellen in dem Medium zu gewährleisten. Unter Verwendung einer Dialysekatheternadel wurden jeweils 1,5ml der Suspensionen unter sorgfältiger Vermeidung von Luftblasen aspiriert und in jeweils eine 35mm Petrischale gegeben. Jegliche dabei entstandene Luftblasen wurden mit einer Pipette entfernt. Die zwei vorbereiteten 35mm Petrischalen wurden anschließend in eine jeweils 10cm große Petrischale gestellt. Zusätzlich wurde pro 10 cm Schale eine offene 35 mm Schale mit destilliertem Wasser hinzugestellt, um die Humidität während einer Inkubationszeit von 13 Tagen bei 37°C und 5% CO₂ zu erhöhen. Nach der Inkubationszeit wurden entstandene Kolonien gezählt und anhand ihrer Morphologie unter dem Lichtmikroskop beurteilt. Die Anzahl der gebildeten Kolonien bildete die Grundlage zur Beurteilung des klonogenen Potentials der Ausgangszellen. Abbildung 9 demonstriert den Aufbau des Koloniebildungstests.

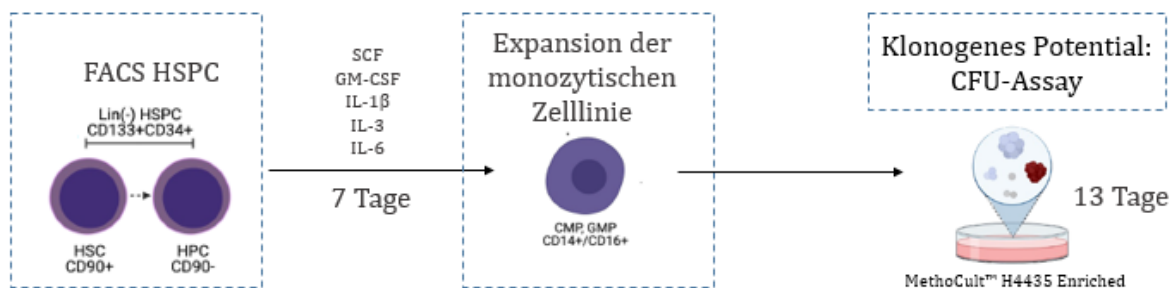


Abbildung 9: Versuchsaufbau CFU-Assay

4.2.8 Mutationsanalyse

Um die Präsenz von Mutationen sortierter Zellfraktionen nach der Durchflusszytometrie oder von einzelnen Kolonien zu überprüfen, wurde die DNA der entsprechenden Zellen zunächst mit dem QIAmp DNA Micro Kit streng nach Herstellerprotokoll isoliert.

Für eine standardisierte Analyse wurden bisher beschriebene, mit MPN verknüpfte Mutationen mittels quantitativer und digitaler PCR sowie Sanger-Sequenzierung nach bereits etablierten Protokollen der Forschungsgruppe durchgeführt (Trivai et al., 2019). Die Sangersequenzierung erfolgte durch die Firma Eurofins, welche die in unserem Labor

vorbereiteten und amplifizierten DNA-Sequenzen via Einsendung erhielt. Die Methode nach Sanger wurde vor allem verwendet, um die Mutationen ASXL1, EZH2, Casitas B-Lineage Lymphoma Proto-Oncogene (CBL), IDH2, SRSF2 und U2AF1 zu detektieren. PCR- und Sequenzierungsprimer finden sich in Tabelle 9.

Beide Methoden konnten darüber hinaus dazu verwendet werden, die Mutationslast von resorbierenden versus nicht resorbierende Zellen zu überprüfen. Dazu wurden die Zellen, welche auf den Dentinchips zu finden waren, über den zuvor beschriebenen Waschschrift gewonnen und mit Zellen, welche sich neben den Chips befanden, verglichen. Jene, von den Dentinchips gelösten Zellen, wurden als funktionsfähig gewertet und bei der Analyse den verbleibenden Zellen der jeweiligen Wells gegenübergestellt.

Tabelle 9: PCR- und Sequenzierungsprimer

Gen_Exon (mut)	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	Sequenzierungs-primer
ASXL1_Ex14	AGTCCACGGATACA GCCTCT	AAGATCCCATGCG TAGCGAG	GGATCTTCGGTCCACAAG G
ASXL1_Ex14	CCTCGCAGACATTAA AGCCC	CTAGCTCTGGACAT GGCAGT	CCTCGCAGACATTAAAGC CC
ASXL1_Ex14	CCTCGCAGACATTAA AGCCC	CTAGCTCTGGACAT GGCAGT	CCTCGCAGACATTAAAGC CC
ASXL1_Ex14-c	GAGGAGGCAGTGAC AGCAAT	TGGAGGGAGTCAA AACTTGG	GAGGAGGCAGTGACAGC AAT
CBL_Ex8	ACCCTGGAGCTTAA AATAGGACC	GTGTCCACAGGGC TCAATCT	AGACTAGATGCTTTCTGG
IDH2_Ex5	TTCTGGTTGAAAGAT GGCGG	ACTTCCCACTCCTT GACACC	GGTGAAGACCATTTTGAA AGTGC
EZH2_Ex5	TGCTTATTGGTGAGA GGGGT	CTCACCTCTATCCC CGTGTAC	TGCTTATTGGTGAGAGGG GT
SFSR2_Ex1	CCGCCACTCAGAGCT ATGA	GCCGCGGACCTTTG TGAG	TGAGCCCAGGGGAGGCC
U2AF1_Ex2	TTTGCAGAAAGGGA AGTTGAA	AGTCGATCACCTGC CTCACT	AGTCGATCACCTGCCTCA CT
U2AF1_Ex7	AAAAATGAAGGCAA CATTTGG	CTCTGGAAATGGG CTTCAAA	AAAAATGAAGGCAACAT TTGG
JAK2	ACAGGGGTTTCCTCA GAACG	GACACCTAGCTGT GATCCTGA	ACAGGGGTTTCCTCAGAA CG
CALR-L	CCCTGAGGTGTGTGC TCTG	TCTCTACAGCTCGT CCTTGG	CCCTGAGGTGTGTGCTCT G

5 Ergebnisse

5.1 Etablierung einer humanen Osteoklastenkultur

Die Auswahl der CD133+CD34+ Stammzellfraktion geht auf Vorarbeiten der Forschungsgruppe für Stammzellbiologie zurück und wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie nach entsprechender Färbung sortiert und kultiviert. Abbildung 10 zeigt die Gating-Strategie an Tag 0 der Zellkultur. Nach Ausschluss abgestorbener, fluoreszierender Zellen (P1) erfolgte die Auswahl von Zellen, welche negativ für die Lineage-Marker CD2, CD3, CD4, CD8, CD11b, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56 und CD253a waren sowie eine geringe Granularität aufwiesen. Ausgehend von dieser Lineage negativen (Lin-) Zellfraktion erfolgte die Sortierung nach CD133 und CD34 Positivität.

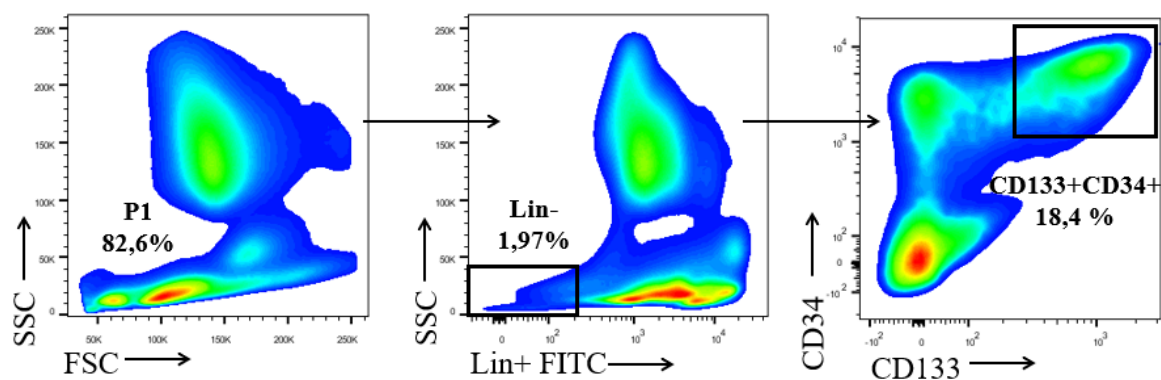
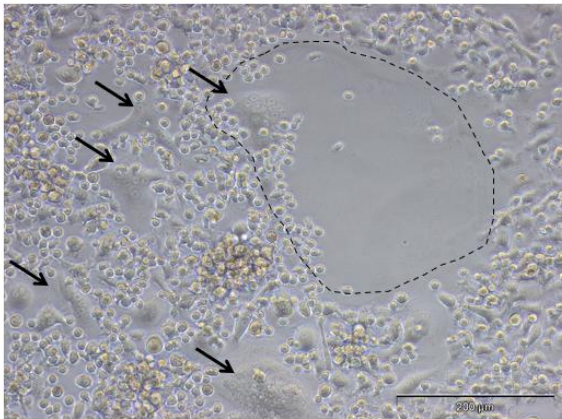


Abbildung 10: Gating-Strategie zur Isolierung der CD133+CD34+ Stammzellfraktion

Nach Ausplattierung von 1×10^6 CD133+CD34+ Stammzellen pro $0,8 \text{ cm}^2$ erfolgte die Kultivierung in Zellkulturmedium mit den Wachstumsfaktoren SCF, GM-CSF, IL-1, IL-3 und IL-6. Die Differenzierung der Zellen wurde regelmäßig lichtmikroskopisch überprüft und zeigte nicht nur morphologisch (Abb. 11A-B), sondern auch in Bezug auf die Kultivierungszeit bis zur Entstehung reifer Osteoklasten einen signifikanten Unterschied zwischen Patientenblut ($n=21$) und gesundem Knochenmark ($n=12$), ($p = 0,0321$; Abb. 12).

11 A

Knochenmark 2 - 17 Tage



11 B

Patient 9 - 30 Tage

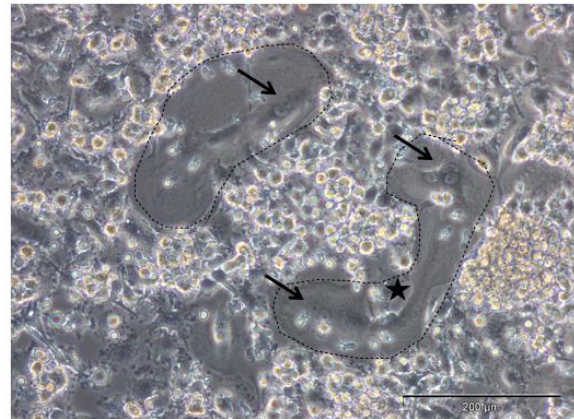


Abbildung 11 A-B: Lichtmikroskopische Aufnahmen reifer Osteoklasten in der Zellkultur. A: KM 136 zeigt multinukleäre ($\rightarrow$) Osteoklasten (---) bereits nach 17 Tagen Kulturzeit. B: Patient 281 zeigt diese OSC-Formation erst deutlich später, nach 30 Tagen [($\rightarrow$ = Nuklei); (--- = Osteoklasten)]

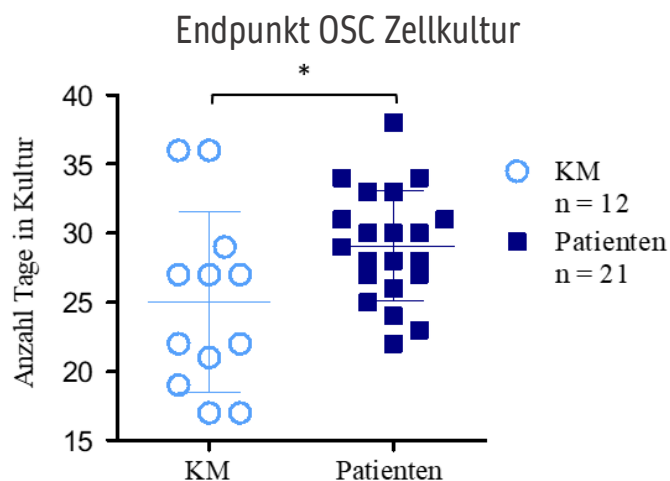


Abbildung 12: Kultivierungszeit bis zur Entstehung reifer Osteoklasten. Bei einem Vergleich der Differenzierung bis zur Entstehung multinukleärer Zellen ist die Kulturzeit von Stammzellen von Patienten signifikant länger als die von Gesunden.

5.2 TRAP-Expression humaner Osteoklasten

Im Sinne einer phänotypischen Beurteilung erfolgte am Ende der Zellkultur eine TRAP-Färbung der Firma Roth in der Zellkulturplatte. Anschließend wurden Fotografien der Zellen mit der Auflichtmikroskopie angefertigt. Diese Methode diente der ersten Kontrolle der Zellkultur und bestätigte, dass sich die humane CD133+CD34+ Stammzellfraktion von gesundem Knochenmark sowie von peripherem Patientenblut zu Osteoklasten differenzieren lässt (s. Abb. 13).

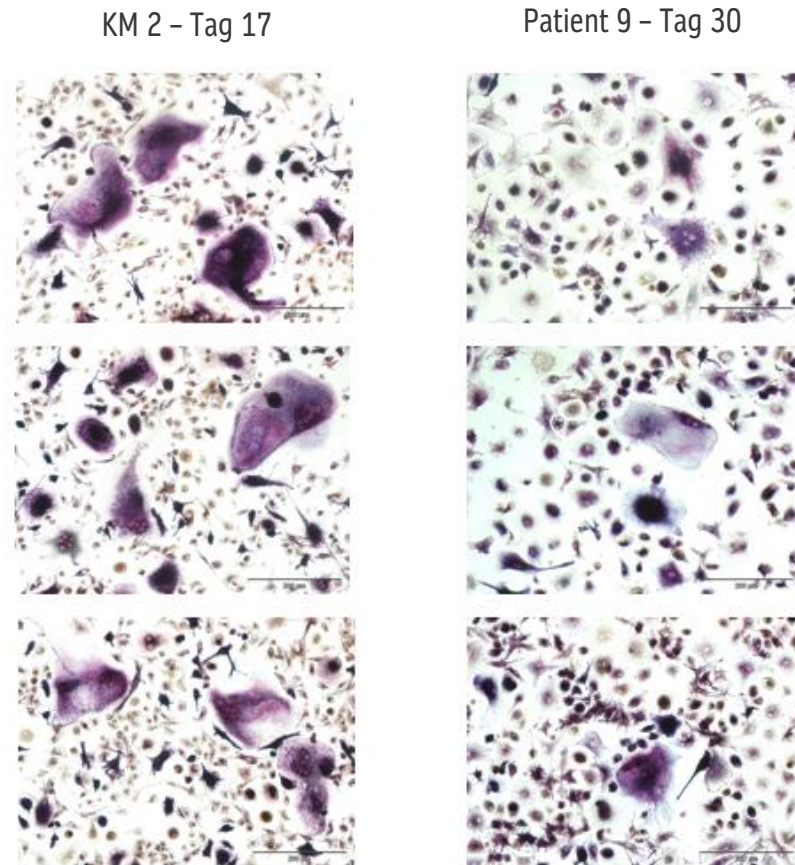


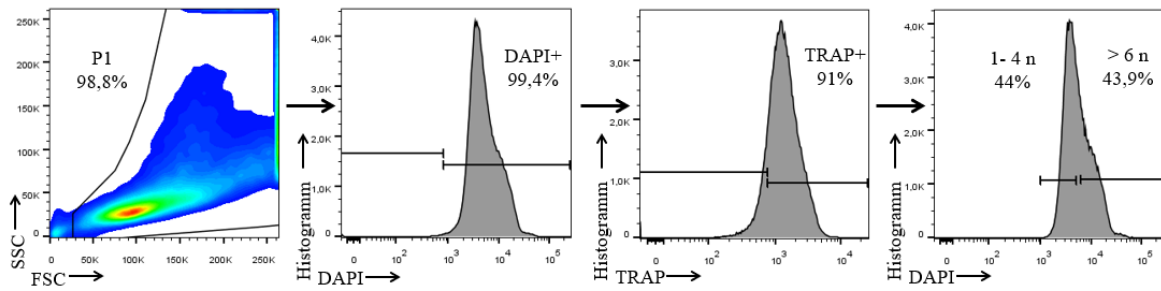
Abbildung 13: TRAP-Positivität multinukleärer Osteoklasten (Vergrößerung: 10x)

5.3 FACS-Analyse multinukleärer Zellen

5.3.1 Patientenzellen exprimieren vermindert TRAP und weisen insgesamt eine geringere Anzahl an (Prä-) Osteoklasten auf

Für eine Charakterisierung sowie Sortierung im Hinblick auf eine weitere Phäno- und Genotypisierung multinukleärer Zellen wurde zunächst ein FACS-Panel angewendet, welches auf Vorarbeiten mit murinen Osteoklasten von Ibáñez et al. zurückgeht (Ibáñez et al., 2016). Der Fokus des Panels wurde einerseits auf die Anfärbung des osteoklastenspezifischen Enzyms TRAP sowie andererseits auf die intranukleäre Färbung mit DAPI zur Überprüfung einer Multinuklearität gelegt. Abbildung 14 zeigt die Gating-Strategie dieses ersten FACS-Panels in FlowJo V10 und lässt durch eine Gegenüberstellung einer gesunden Knochenmarkprobe zu einer Patientenprobe auch hier bereits Unterschiede erkennen.

14 A Knochenmark 6



14 B Patient 3

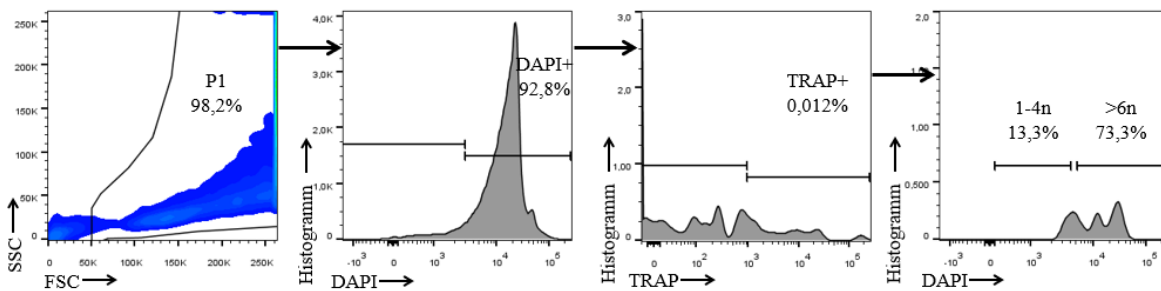
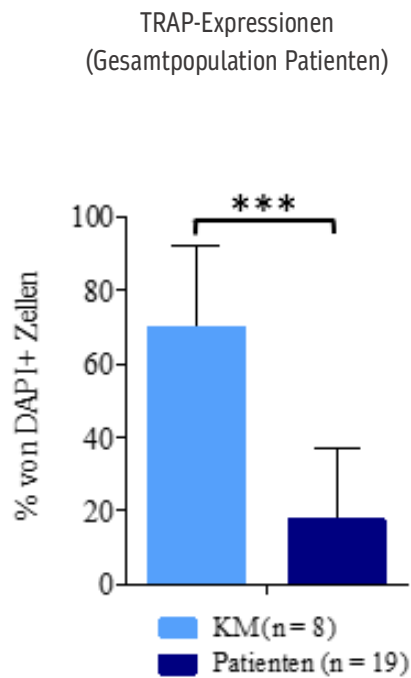


Abbildung 14 A-B: Gating-Strategie FACS-Panel 1. 14 A: Knochenmark 6; 14 B: Patient 3. Nach Exklusion von vorrangig Zellabfall (P1) wurde die DAPI-Positivität überprüft und anschließend DAPI positive Zellen auf eine TRAP-Expression untersucht. Im nachfolgenden Schritt schloss sich eine Unterteilung der DAPI-Intensität in einerseits 1-4 Nuclei sowie andererseits in >6 Nuclei an. Dabei wurden auf Basis der Vorversuche mit transfizierten Zellen (s. Methoden Abb. 2) zur Bestimmung eines Nucleus die verschiedenen DAPI-Intensitäten der Zellen für eine Zuordnung der Kernanzahl genutzt.

In der statistischen Analyse in Graphpad zeigte sich im Anschluss des Experiments ein signifikanter Unterschied zwischen der TRAP-Expression der Patientenkohorte im Vergleich zu der Kohorte von gesunden Knochenmarkspendern ($p < 0,0001$, s. Abb.15). Dies war nicht nur für die gesamte Patientenkohorte, sondern auch die einzelnen Subgruppen im Hinblick auf Driver-Mutationen zutreffend (JAK2 multiple: $p < 0,0001$; JAK2 single: $p = 0,04$; CALR: $p = 0,048$; MPL: $p = 0,012$).

15 A



15 B

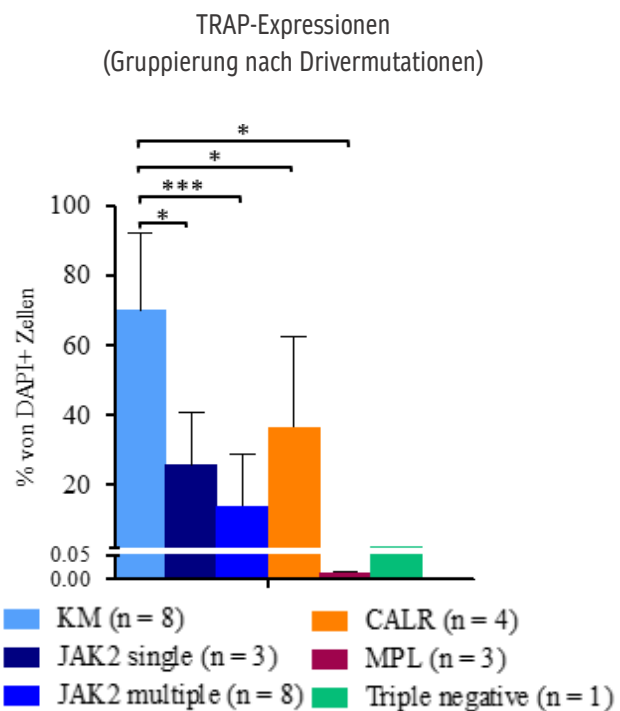
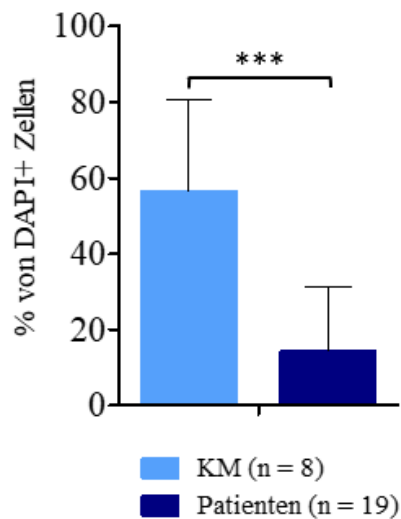


Abbildung 15: TRAP-Expression der Zellpopulation von gesunden Knochenmarkspendern und Patienten im Vergleich (A: Gesamtpopulation Patienten, B: Gruppierung nach Drivermutationen; JAK2 multiple = Patienten, welche neben JAK2 weitere Mutationen tragen)

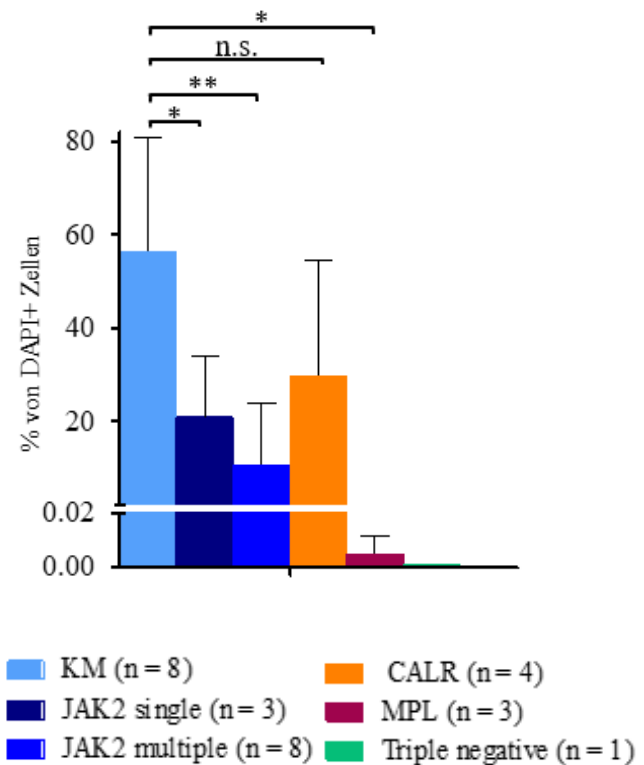
Darüber hinaus wiesen die gesunden Proben eine signifikant höhere Populationsgröße von Prä-Osteoklasten (1-4 Nuclei) sowie multinukleärer Zellen (>6 Nuclei) in Kontrast zu Patientenproben (1-4 Nuclei: $p < 0,0001$; >6 Nuclei: $p = 0,0276$) (s. Abb.16) auf. Auch hier erfolgte die Unterteilung der Patientenkohorte nach Drivermutationen. Für die Kohorte der Prä-Osteoklasten mit 1-4 Nuclei ergab sich ebenso für die Subpopulationen, CALR ausgenommen, trotz der kleinen Populationsgröße bereits ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu Gesunden: JAK2 single: $p = 0,0485$; JAK2 multiple: $p = 0,0011$; CALR: $p = 0,15$; MPL: $p = 0,0121$. Hingegen ergab die Untersuchung der Osteoklasten nur einen signifikanten Unterschied für MPL-Patienten ($p = 0,0121$).

16 A Prä-Osteoklasten (1-4 Nuclei)

Gesamtpopulation Patienten

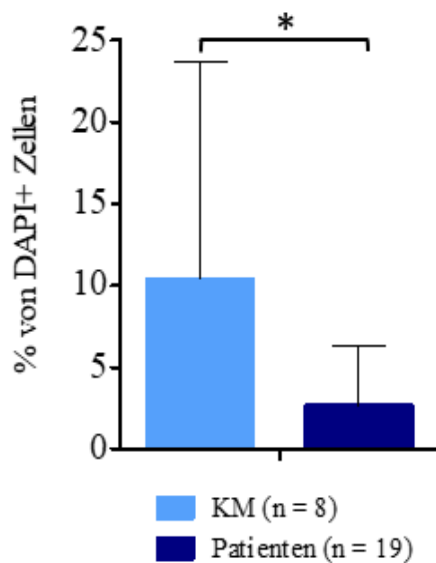


Gruppierung nach Drivermutationen



16 B Osteoklasten (>6 Nuclei)

Gesamtpopulation Patienten



Gruppierung nach Drivermutationen

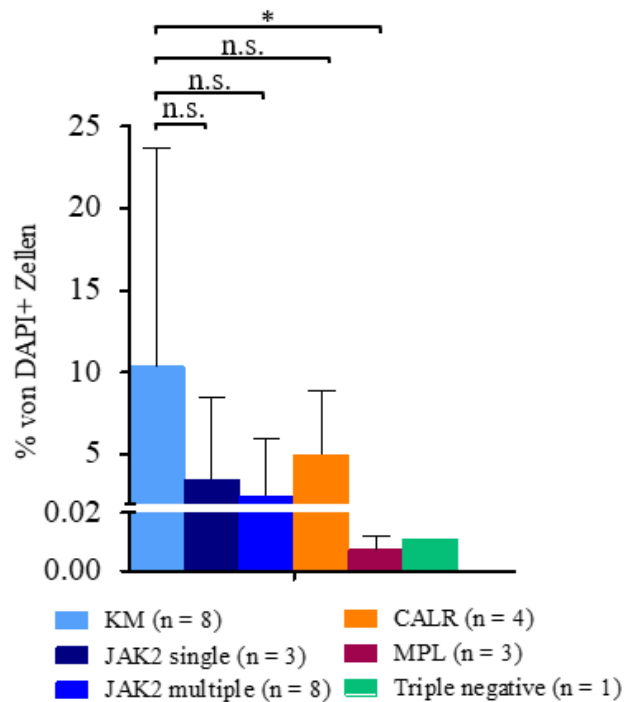


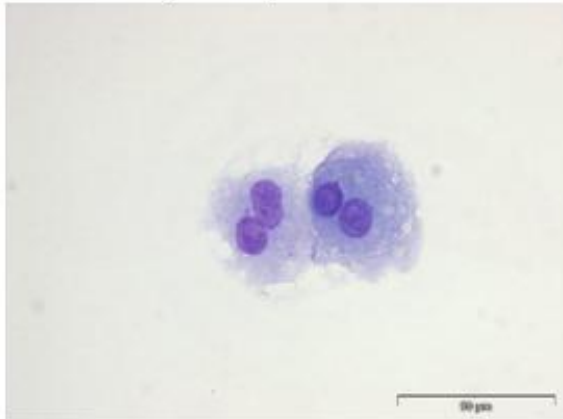
Abbildung 16: Vergleich der Populationsgröße von A: Prä-Osteoklasten (1-4 Nuclei) und B: Osteoklasten (> 6 Nuclei) zwischen Patienten und Gesunden

5.3.2 Osteoklastenspezifische Marker erlauben die Sortierung multinukleärer Zellen mittels FACS

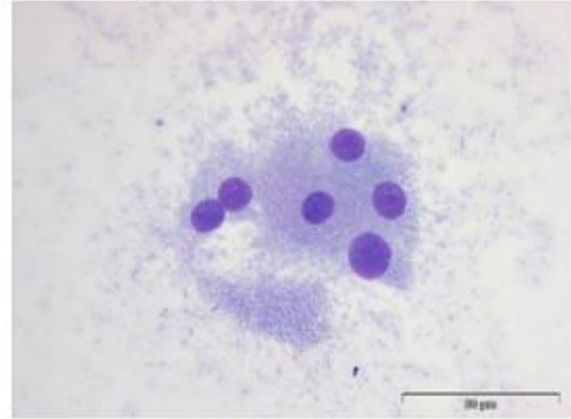
Als sich im Laufe der Promotionsarbeit abzeichnete, dass es tatsächlich möglich ist, humane Osteoklasten in der Durchflusszytometrie zu analysieren sowie zu sortieren, wurde für eine präzisere Charakterisierung und Untersuchung der multinukleären Zellen ein weiteres FACS-Panel etabliert. Dieses zweite Panel beinhaltete zum Einen die Oberflächenmarker RANK und RANKL, welche eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von Prä-Osteoklasten zu multinukleären Zellen und ihrer Aktivierung spielen, und zum Anderen die funktionellen Marker TRAP, CTK, $\alpha_v\beta_3$ und CA2, die für den Prozess der Knochenresorption essentiell sind. Auch wenn es bisher keine hinreichenden Daten zu einer RANKL-Expression auf (Prä-) Osteoklasten gab, schlossen wir diesen Marker mit in unser Panel ein, da bisherige Studien bis heute diesen Liganden der Zellkultur manuell für eine erfolgreiche Differenzierung hinzugeben (Chandrabalan et al., 2024, Hansen et al., 2024, Ibáñez et al., 2022, Arai et al., 1999, Susa et al., 2004, Veletic et al., 2019, Marino et al., 2014).

Die Multinuklearität wurde in diesem zweiten Panel mit Hilfe von PI überprüft. Auch hier erfolgte zunächst die 1-Nucleuskontrolle in Vorversuchen, wie in Abbildung 3B gezeigt. Aufgrund der Tatsache, dass bisher keine Arbeiten veröffentlicht wurden, in denen die osteoklastenspezifische Marker CTK, CA2, $\alpha_v\beta_3$ und RANK zum Nachweis von multinukleären Zellen in der Durchflusszytometrie verwendet wurden, erfolgte zunächst die Sortierung der Zellen in MACS-Puffer, die eine phänotypische Untersuchung mit Hilfe von Zytospins zuließ. Abbildung 17 zeigt nach Sortierung verschiedene Fotografien von Zytospins multinukleärer Zellen, welche die genannten osteoklastenspezifische Marker tragen, und diente neben der phänotypischen Veranschaulichung der Kontrolle des neuen FACS-Panels. Aufgrund dieser Bestätigung erfolgte des Weiteren die Sortierung in Lyse-Puffer für eine nachfolgende Mutationsanalyse.

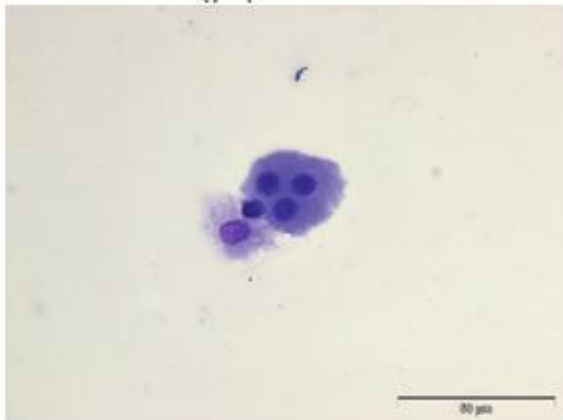
17 A Carboanhydrase 2 positiv



17 B Cathepsin K positiv



17 C RANK und $\alpha_v\beta_3$ positiv



17 D Cathepsin K und Carboanhydrase 2 positiv

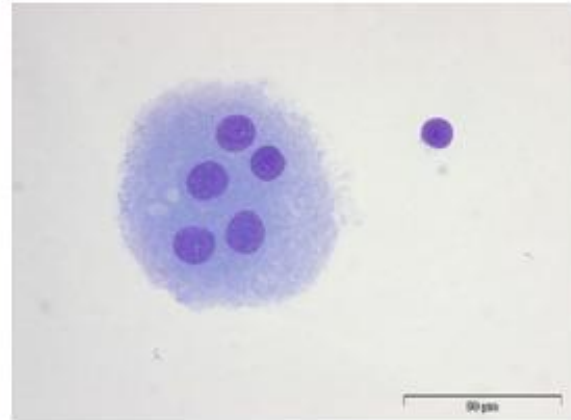


Abbildung 17: Darstellung von Zytospins multinukleärer Zellen, welche zuvor mit osteoklastenspezifischen Marker gefärbt wurden: A Carboanhydrase 2 positiv; B: Cathepsin K positiv; C: RANK und $\alpha_v\beta_3$ positiv; D: Cathepsin K und Carboanhydrase 2 positiv

5.3.3 Zellen hoher Nuklearität (>8 Nuclei) weisen keinen Unterschied auf

Auf Basis der Gatingstrategie in Abbildung 18 wurden nach vorheriger Unterteilung der Gesamtpopulation in kleine und große Zellen, jene mit hoher Nuklearität, also einer PI-Intensität, welche >8 Nuclei entsprach, auf eine osteoklastenspezifische Markerexpression untersucht, um den Fokus auf Osteoklasten zu legen.

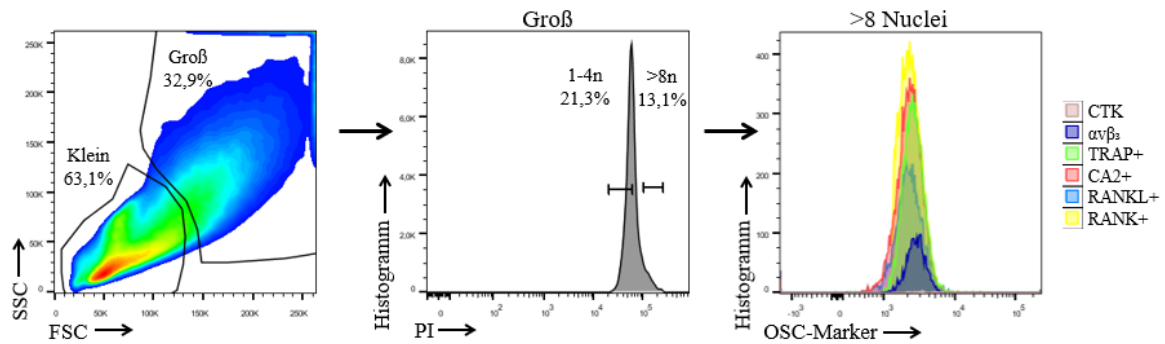


Abbildung 18: Gating-Strategie FACS-Panel 2 (KM 10)

Dabei zeigte sich statistisch weder für die Kernanzahl (s. Abb. 19, $p = 0,67$) noch für die Markerexpression (Daten nicht abgebildet) ein signifikanter Unterschied zwischen gesunden und Patientenproben.

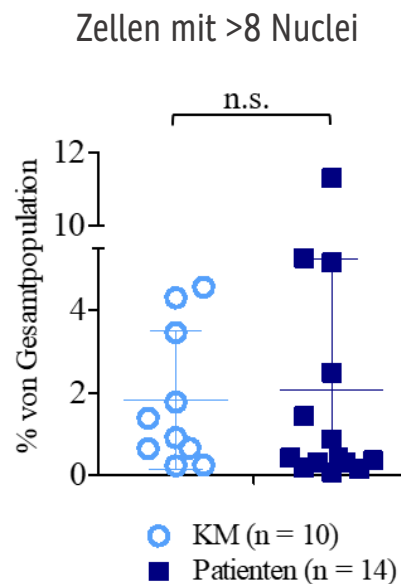
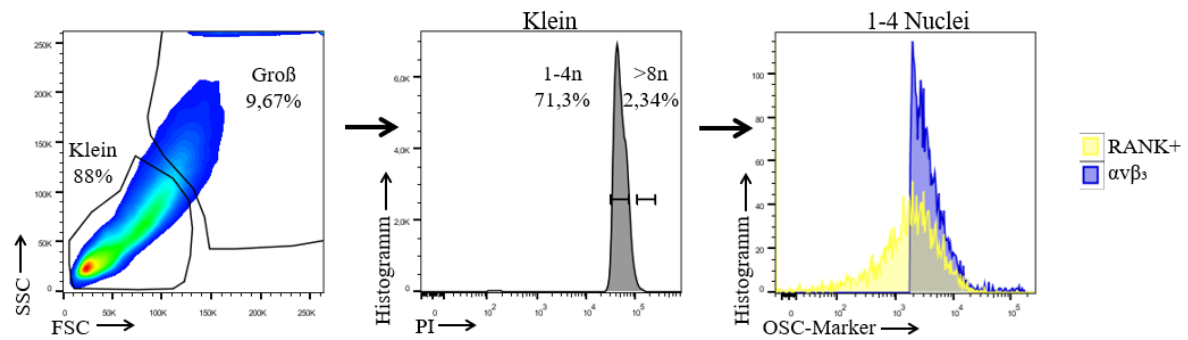


Abbildung 19: Vergleich der Kernanzahl (>8 Nuclei) zwischen KM und Patienten

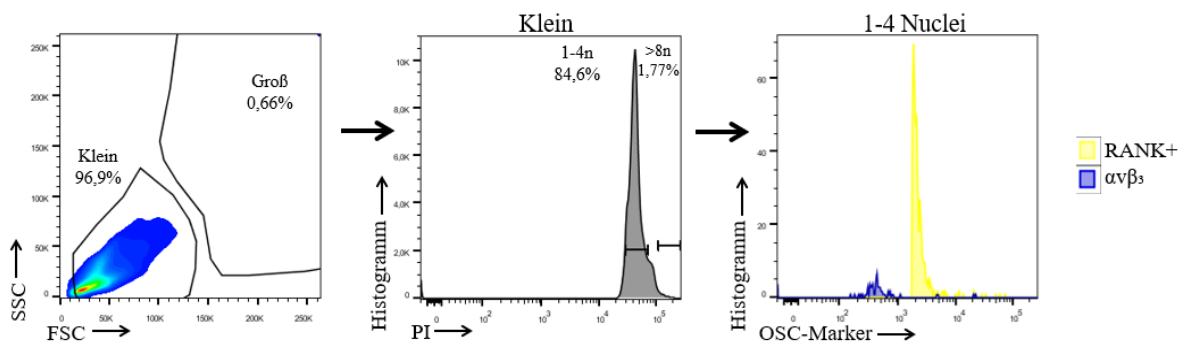
5.3.4 Präosteoklasten von Patienten exprimieren signifikant weniger RANK und $\alpha_v\beta_3$

Bei Betrachtung der Population, welche 1-4 Nuclei trägt und mutmaßlich Präosteoklasten repräsentiert, fiel jedoch ein Unterschied in der Expression von RANK und $\alpha_v\beta_3$ auf: Patientenzellen exprimierten signifikant weniger RANK und $\alpha_v\beta_3$ im Vergleich zu gesunden Zellen (s. Abb.20, RANK: $p^*=0,02$; $\alpha_v\beta_3$: $p^*=0,0128$).

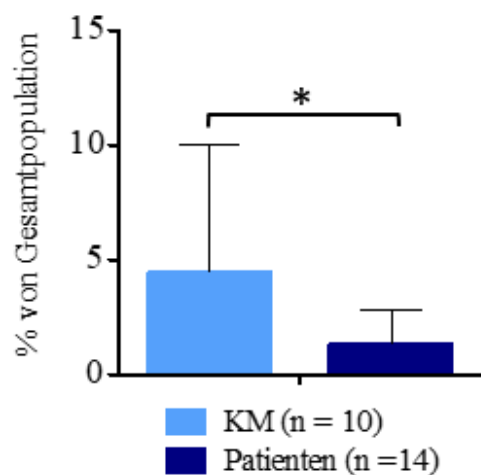
20 A Knochenmark 4



20 B Patient 17



20 C RANK positive Zellen mit 1-4 Nuclei



20 D αvβ₃ positive Zellen mit 1-4 Nuclei

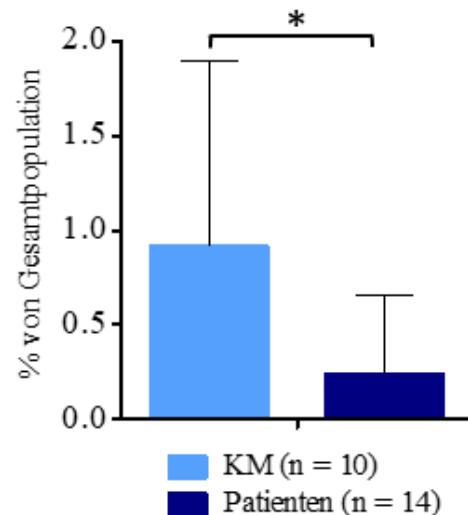


Abbildung 20A-D: RANK- und $\alpha_v\beta_3$ -Expression von Zellen mit 1-4 Nuclei. Gegenüberstellung einer gesunden (A) versus einer Patientenprobe (B) hinsichtlich der RANK- und $\alpha_v\beta_3$ -Expression von Zellen mit 1-4 Nuclei. C: Statistische Auswertung der RANK-Expression von Zellen mit 1-4 Nuclei. D: Statistische Auswertung der $\alpha_v\beta_3$ -Expression von Zellen mit 1-4 Nuclei.

5.4 Funktions- und Mutationsanalyse humaner Osteoklasten

5.4.1 Osteoklasten von Patienten haben ein Funktionsdefizit

Um wohl die wichtigste Funktion der Osteoklasten zu untersuchen, erfolgte die Kultivierung der hämatopoetischen Stammzellfraktion zusätzlich auf jeweils drei Dentinchips pro Probe. Am Ende jeder Kultur wurden die Chips von Zellen bereinigt und mit Toluidinblau für eine Markierung der Resorptionslakunen gefärbt, welche anschließend mit Hilfe der Microscopy Core Unit des UKEs analysiert wurde. Abbildung 7 zeigte, für eine bessere Verständlichkeit, bereits beispielhaft eine vergrößerte Darstellung von Resorptionslakunen eines gesunden Spenders. In Abbildung 21 werden hingegen zwei Dentinchips einer gesunden und Patientenprobe für eine bessere Gegenüberstellung vollständig abgebildet.

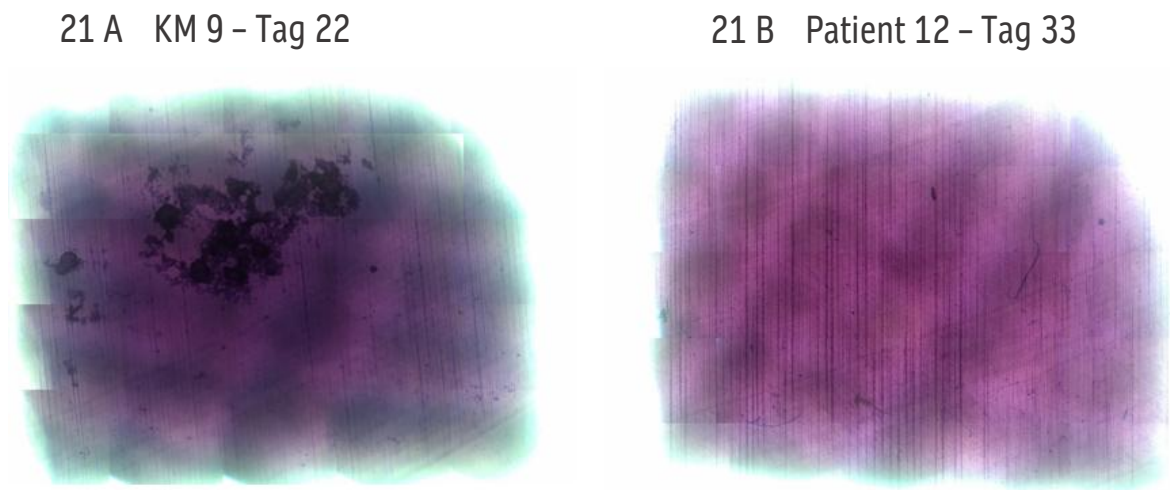


Abbildung 21A-B: Darstellung von zwei Dentinchips in der Auflichtmikroskopie nach Toluidinblaufärbung (Resorptionslakunen in dunkellila gefärbt).

Der bereits mit bloßem Auge erkennbare Unterschied hinsichtlich der Ausdehnung der Resorptionslakunen ließ sich ebenfalls in der statistischen Analyse bestätigen ($p=0,0003$, s. Abb. 22): Osteoklasten von Patienten resorbierten im Gegensatz zu Osteoklasten von Gesunden wenig oder sogar kein Dentin, was einen gravierenden Funktionsverlust der Zellen aufzeigt und somit eine Erklärung für die Entwicklung von Osteosklerose darstellen kann.

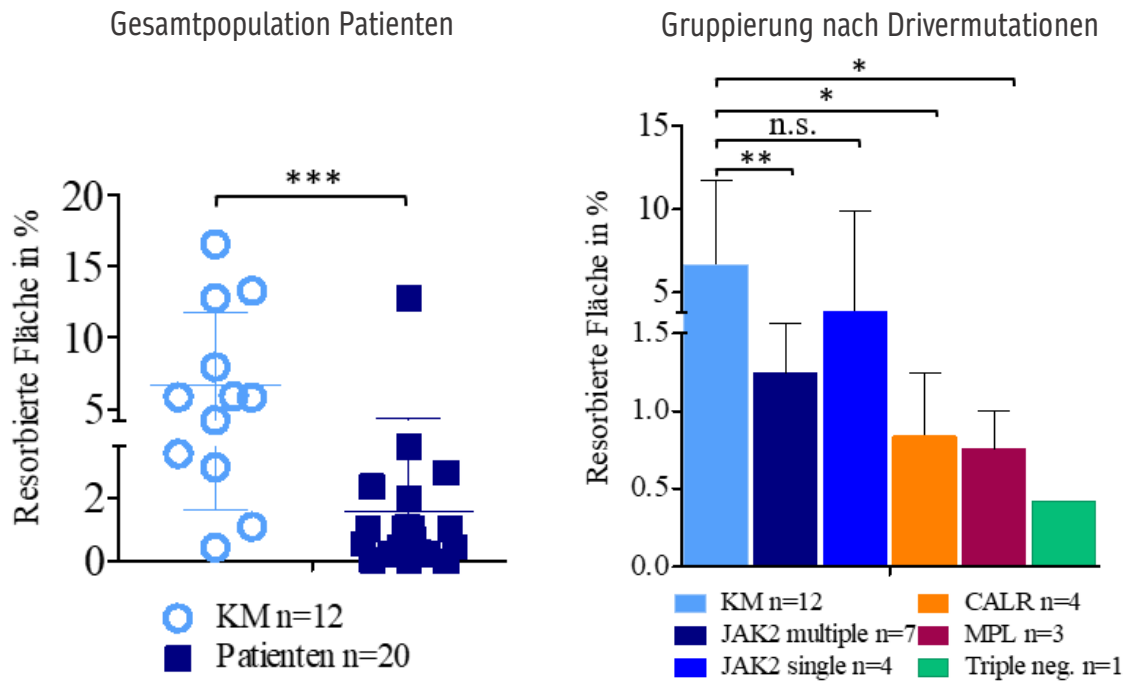


Abbildung 22: Gegenüberstellung der Resorptionsfläche pro analysierte Probe von Gesunden und Patienten.

5.4.2 Funktionsfähige Osteoklasten von Patienten sind mutationsfrei

Die zuvor gewonnenen Erkenntnisse wurden durch eine weitere Mutationsanalyse der Zellen untermauert. Dafür wurden genetische Untersuchungen mit Hilfe der PCR und Sanger-Sequenzierung durchgeführt, welche zwei verschiedene Patientenzellkohorten überprüfte: Zellen, welche sich am Ende der Kultur auf den Dentinechips befanden und somit als resorbierende Zellen zu werten waren, wurden mit Zellen, welche sich nach Kultivierung neben den Dentinechips ohne scheinbare Resorptionsaktivität angesiedelt hatten, verglichen. Es zeigte sich hierbei ein signifikanter Unterschied zwischen den Zellen: Während die Zellen auf den Dentinechips keine Mutationen aufwiesen, ließen sich im gleichen Well bei Zellen neben den Chips genetische Mutationen nachweisen ($p=0,0156$). Abbildung 23 präsentiert neun Patientenproben, deren Datensatz die genannten Ergebnisse veranschaulicht.

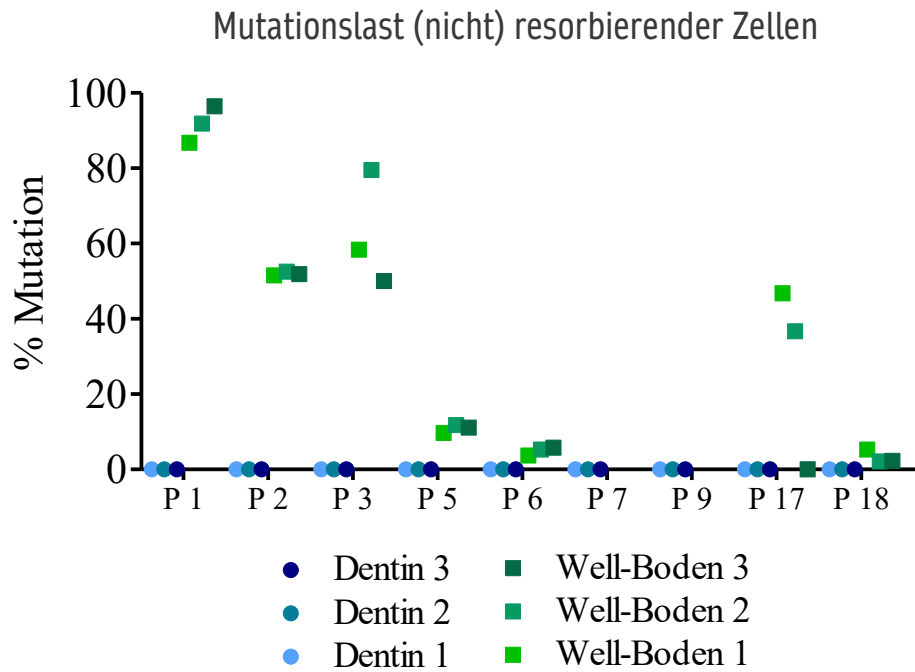


Abbildung 23: Mutationslast von mutmaßlich resorbierenden (blau) versus nicht resorbierenden (grün) Patientenzellen.

Tabelle 10 zeigt des Weiteren eine Auflistung von Patientenproben, welche hinsichtlich der zum Erkrankungsbeginn nachgewiesenen Mutationen in verschiedenen Experimenten am Ende der Kultur untersucht wurden. Die aufgeführte Mutationslast der Tabelle 10 entspricht dabei der initial erhobenen Befunde von Blutproben (MNCs) von Patienten wie zuvor bereits beschrieben wurde (Trivai et al., 2019). Dargestellt werden die Ergebnisse der Zellen aus den Dentinwells sowie multinukleärer Zellen mit OSC-Marker (PI) und ohne OSC-Marker (DAPI), welche mit Hilfe der Durchflusszytometrie sortiert und anschließend hinsichtlich ihrer Mutation mittels PCR oder Sanger Sequenzierung analysiert wurden. Die Tabelle fasst die zuvor erhobenen Ergebnisse zusammen und verdeutlicht, dass multinukleäre Zellen (= DAPI high und PI high) sowie Zellen auf Dentin in Kontrast zu Zellen des Wellbodens keine Mutation aufweisen.

Tabelle 10: Mutationsnachweise in verschiedenen Zellpopulationen von Patientenproben gruppiert nach Driver-Mutationen (JAK2, CALR, MPL). In grau hervorgehoben sind Proben, in denen Ergebnisse aus allen Experimenten vorliegen. Mut = mutiert. WT = Wildtyp.

Gruppe	Patient	Mutiertes Gen	Mutationslast (%)	Well-Boden	Dentin	PI high TRAP+ CTK+ CA2+/-	DAPI high TRAP+	Resorbierte Fläche (%)
JAK2 multiple	6	JAK2 (V617F)	43,8	mut	wt			0
		ASXL1 (M1050T)	48,9	mut	wt			
	18	JAK2 (V617F)	15,8	mut				3,6
		ASXL1 (643fs)	43,5	wt				
		CBL (Y371C)	41,2	mut	wt			
	16	JAK2 (V617F)	94,6	mut	wt			2,78
		EZH2 (F145S)	97,1	mut				
		IDH2 (R140Q)	45,6	wt				
	10	JAK2 (V617F)	74,6	mut			mut	0,03
		SRSF2 (P95H)	35	mut				
	8	JAK2 (V617F)	24,8	PCR low		wt		0,23
		ASXL1 (S1168T)	49,4	mut				
	20	JAK2 (V617F)	92,1	mut		wt	wt	0,27
		ASXL1 (G652S)	54,7	wt				
	19	JAK2 (V617F)	91,3	mut				1,05
		ASXL1	56,4	mut				

		(G652S)						
	21	JAK2 (V617F)	85,9	mut		wt		1,97
		U2AF1 (S43F)	43,5	mut				
		U2AF1 (Q157R)	41,3	mut				
JAK2 single	5	JAK2 (V617F)	88,2	mut	wt		wt	0
	17	JAK2 (V617F)	100	mut	wt	wt	wt	2,35
	14	JAK2 (V617F)	92,7	mut			mut	0,45
	12	JAK2 (V617F)	67,9	mut				12,74
CALR	9	CALR-L (L367fs*46)	44	mut	wt		mut	0,23
	7	CALR-L (L367fs*46)	64,9	mut	wt			1,02
MPL	1	MPL (W515L)	86,2	mut	wt	wt		1,02
	3	MPL (W515K)	41,8	mut	wt		wt	0,7
	2	MPL (W515L)	52,1	mut		wt		0,54
		ASXL1 (G658)	23,4	wt				

4.1 Funktionstestung Monopoese

4.1.1 Phagozytose

4.1.1.1 Patienten-Stammzellen weisen bereits nach einer Woche eine eingeschränkte Differenzierung auf

Als im Verlauf der vorliegenden Arbeit ein Funktionsdefizit von reifen Osteoklasten erkenntlich wurde und auch die Durchflusszytometrie Hinweise auf eine beeinträchtigte Differenzierung lieferte, stellte sich die Frage, ob auch noch weitere Zellen der Monopoese auf früheren Differenzierungsebenen ebenso in ihrer Funktion eingeschränkt sein könnten.

Daher wurde die Versuchsreihe um einen funktionellen Assay ergänzt, welcher eine der wichtigsten Funktionen von Makrophagen, die Phagozytose, untersucht. Das Experiment erfolgte sieben Tage nach Ausplattierung der CD133+CD34+ Stammzellfraktion, welche in dem zuvor beschriebenen Medium inklusive der Wachstumsfaktoren kultiviert wurde. Das Zeitfenster von sieben Tagen wurde anhand der klassischen “Spiegelei”-Morphogie von Makrophagen in der Auflichtmikroskopie bestimmt.

In einem ersten Schritt des Experiments erfolgte zunächst die Auszählung der Zellen nach einer Woche Zellkultur. Diese wurde für eine interne Überprüfung auf zwei unterschiedliche Arten durchgeführt: Während direkt vor der Färbung der Zellen eine Zählung mit dem Hämozytometer erfolgte, wurden die Zellen anschließend noch einmal in der Durchflusszytometrie gezählt. Aufgrund vergleichbarer Ergebnisse veranschaulicht Abbildung 24 die gemittelten Zellzahlen aus beiden Methoden. Auf Basis des dargestellten Unterschiedes zwischen den Kohorten, ließ sich bereits nach sieben Tagen eine eingeschränkte Differenzierung von Patientenzellen nachweisen ($p=0,0167$).

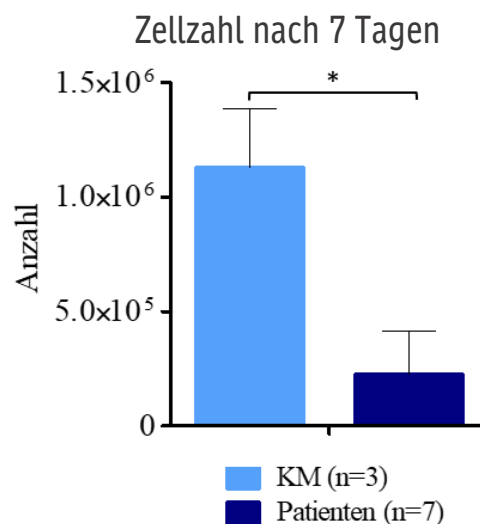


Abbildung 24: Zellzahlen von gesunden und Patientenproben nach sieben Tagen Zellkultur

4.1.1.2 Die Anzahl HLA-DR⁺ phagozytierender Zellen ist in Patienten vermindert

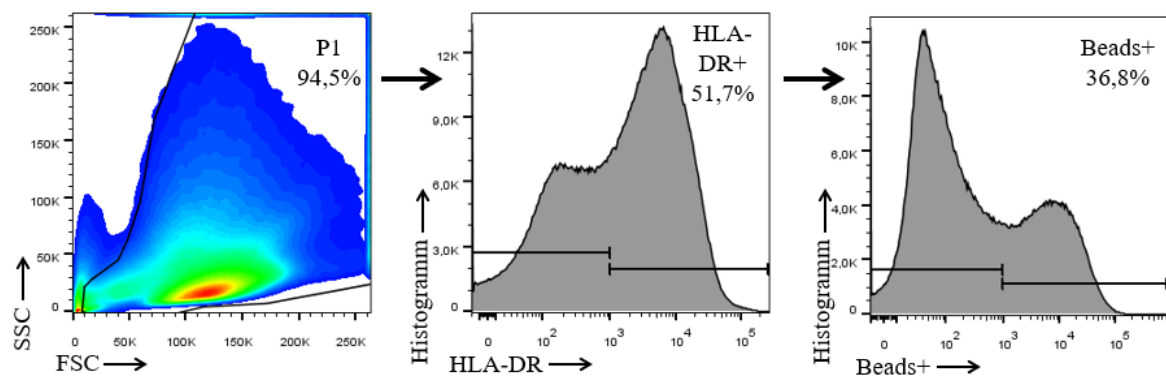
Mit Hilfe des Phagocytose-Assays konnte anschließend die Funktionalität bei gleichzeitiger phänotypischer Charakterisierung durchflusszytometrisch untersucht werden. Hierbei kamen die makrophagenspezifischen Oberflächenmarker CD14, CD16 sowie HLA-DR zum Einsatz. HLA-DR, gehört als “Human Leukocyte Antigen” Isotyp DR zu dem Haupthistokompatibilitätskomplex und befindet sich auf antigenrepräsentierenden Zellen.

Während CD14 und CD16 auch von Osteoklasten bzw. Präosteoklasten exprimiert werden kann, wird HLA-DR häufiger dazu verwendet, zwischen Makrophagen-Polykaryons und Osteoklasten zu unterscheiden (Maggiani et al., 2011).

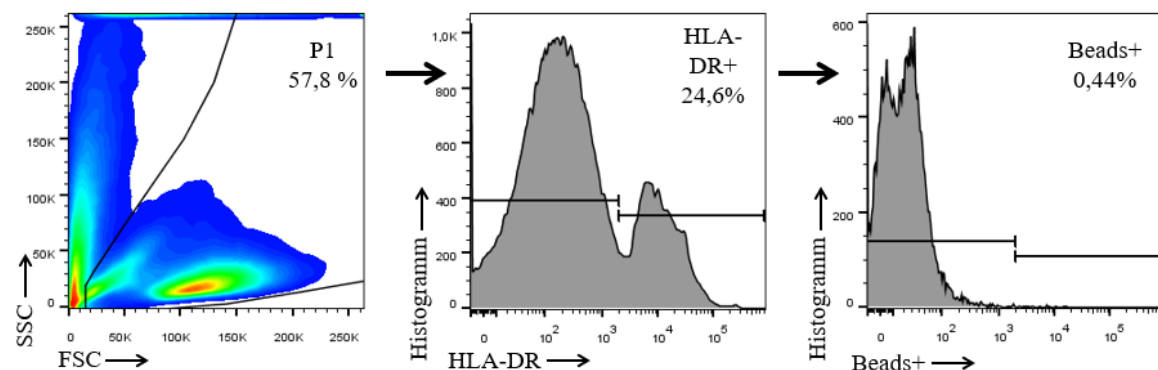
Im Sinne der funktionellen Untersuchung von monopoietischen gesunden und Patientenzellen erfolgte zunächst die Betrachtung HLA-DR positiver phagozytierender Zellen im Vergleich. Abbildung 25A zeigt dabei anschaulich die verschiedenen Expressionsmuster am Beispiel einer Patienten- und einer gesunden Probe. Der bereits augenscheinliche Unterschied bestätigte sich in der statistischen Untersuchung (s. Abb. 25B) und deutet darauf hin, dass die hämatopoetische Stammzellfraktion von Patienten weniger HLA-DR positive phagozytierende Zellen hervorbringt ($p=0,0023$).

25 A

Knochenmark 14



Patient 10



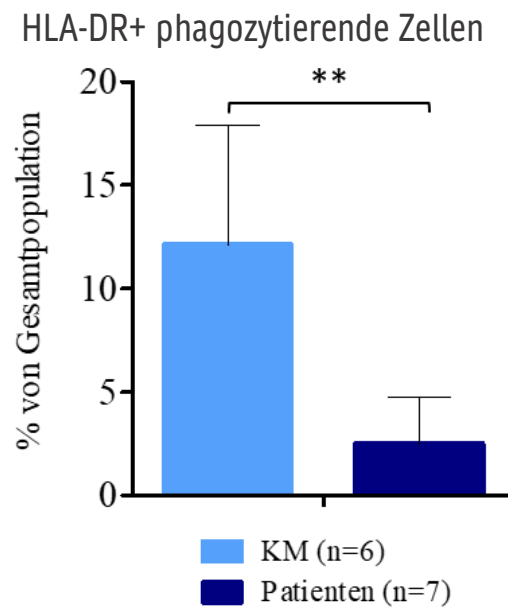
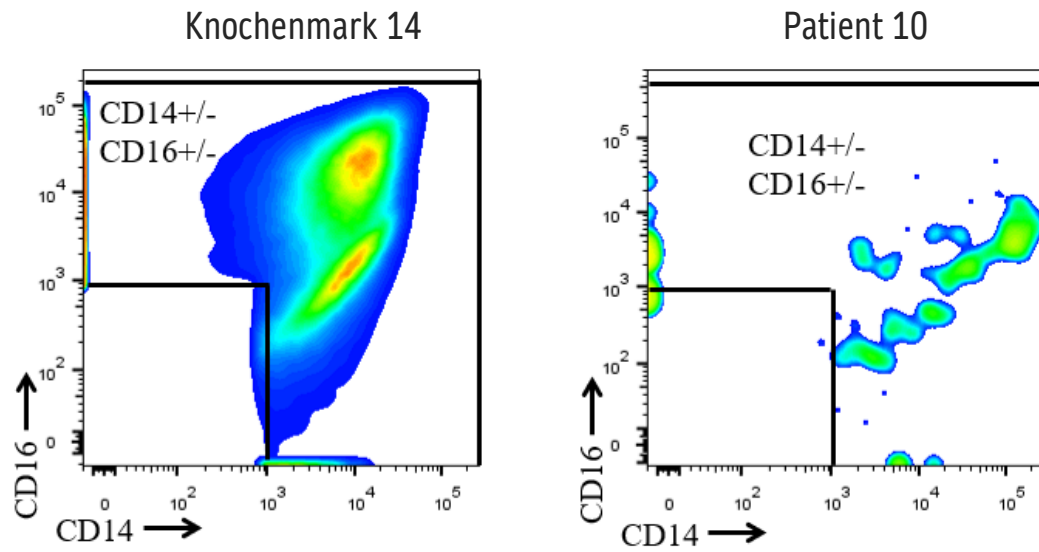


Abbildung 25 A-B: A: Expressionsmuster und Gating-Strategie des Phagozytose-Assays einer Knochenmarkprobe kontrastierend zu einer Patientenprobe. B: Vergleich der Phagozytose-aktivität HLA-DR-positiver Zellen von Patienten und Gesunden.

In einem nächsten Schritt erfolgte die Überprüfung einer CD14 und CD16 Positivität. Dafür wurde die phagozytierende HLA-DR positive Zellfraktion untersucht, um sie näher zu charakterisieren. Abbildung 26A zeigt auf Basis der Gatingstrategie von Abb. 25A die Expressionsmuster einer gesunden KM- und Patientenprobe im Vergleich.

Während der Großteil dieser Zellfraktion bei Gesunden CD14 und/ oder CD16 exprimierte und sich damit den Monozyten bzw. Makrophagen zuordnen lässt, zeigte bei Patienten hingegen nur die Minderheit eine CD14/ CD16 Expression. Abbildung 26B zeigt den Anteil HLA-DR positiver phagozytierender Zellen, welche entweder einfach oder doppelt positiv für CD14 und CD16 waren (CD14+CD16+, CD14+CD16-, CD14-CD16+) an der Gesamtpopulation im Vergleich (0,0047).

26 A



26 B

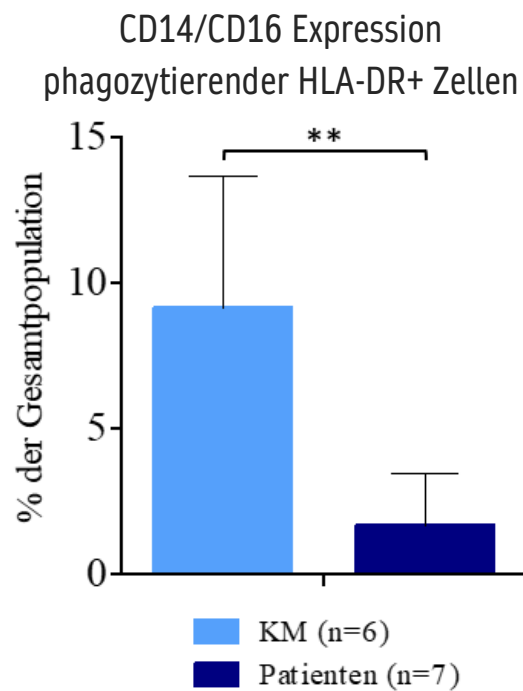


Abbildung 26 A-B: CD14 und CD16 Expression HLA-DR+ phagozytierender Zellen. A: Expressionsmuster von CD14/CD16 der HLA-DR positiven und phagozytierenden Zellpopulation einer KM- und Patientenprobe im Vergleich; B: Gegenüberstellung der CD14/CD16 Expression von gesunden und Patientenzellen.

4.1.1.3 Randexperiment: Dendritische Zellen

Um die Gesamtpopulation nach einer Woche Zellkultur noch weiter charakterisieren zu können, erfolgte in einem Randexperiment in der gesunden Kohorte (n=3) die Färbung der CD14/CD16 negativen und HLA-DR positiven Zellfraktion mit CD1a und CD83, um eine mögliche Zuordnung zu dendritischen Zellen zuzulassen. Tatsächlich zeigte sich in den drei untersuchten Knochenmarkproben in ca. der Hälfte der Zellen eine Positivität für einen oder beide Marker, was eine vorsichtige Einteilung in diese Zellfraktion erlaubt (s. Abbildung 27).

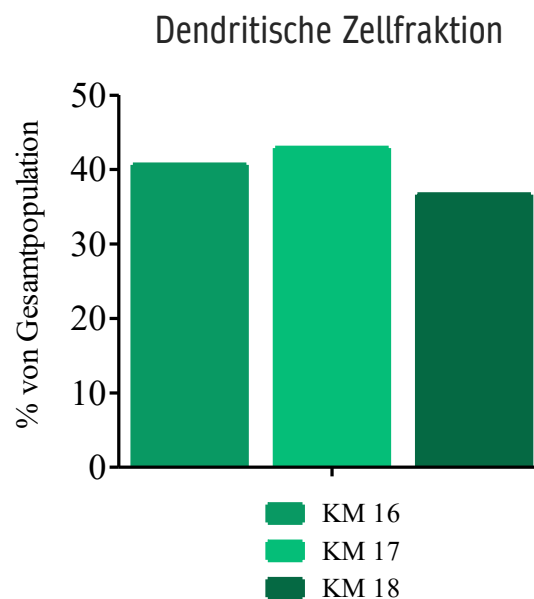


Abbildung 27: Anteil der mutmaßlich dendritischen Zellfraktion an der Gesamtpopulation

4.1.2 Das klonogene Potential von Patientenzellen ist vermindert

Auf Basis der Erkenntnisse des Phagozytose-Experiments, welches neben einer Funktionseinschränkung auch eine verminderte Bildung reifer monopoetischer Zellen zeigte, wurde ein CFU-Assay mit den gleichen Zellen nach einer Woche Zellkultur durchgeführt, um das klonogene Potential der Zellpopulationen zu überprüfen. Das eingesetzte Medium (MethoCult™ H4435 Enriched), welches für Knochenmark sowie peripheres Blut eingesetzt werden kann, unterstützt das Wachstum (multipotenter) Progenitorzellen von Erythrozyten, Granulozyten, Makrophagen sowie Megakaryozyten.

Im vorliegenden Experiment wurden die CFU-Assays in regelmäßigen Abständen auf die Bildung von Zellkolonien überprüft. Nach einer Inkubationszeit von 13 Tagen erfolgte die Zählung und morphologische Beurteilung durch zwei verschiedene Personen als interne

Kontrolle. Abbildung 28 veranschaulicht jeweils ein Beispiel der Koloniebildung von gesunden und Patientenproben im Vergleich, welche in der Gesamtheit der vorliegenden Assays ausschließlich eine Differenzierung zu Makrophagen zeigte.

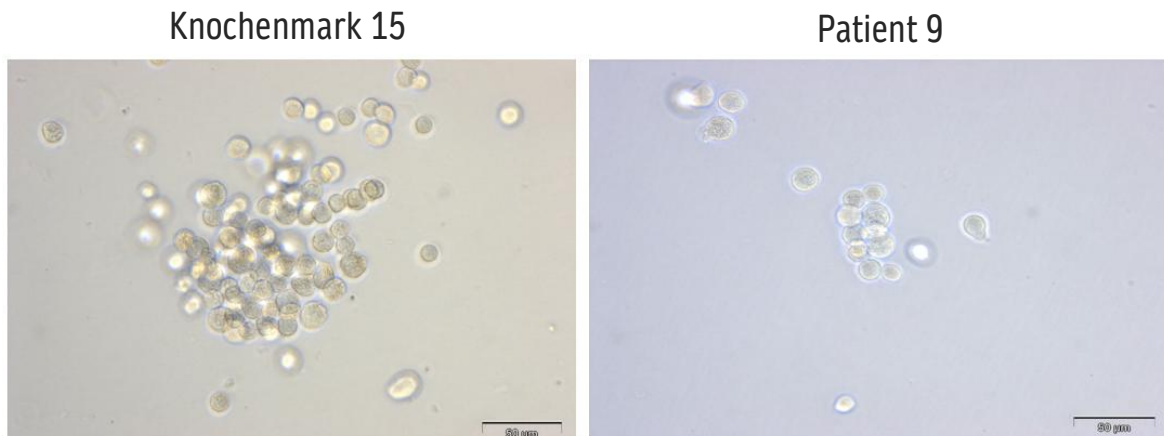


Abbildung 28: CFU-Assay nach 13 Tagen: Koloniebildung der initial CD133+CD34+ Zellpopulation nach einer Woche Zellkultur im Vergleich

Bei Betrachtung der einzelnen Kolonien im Detail von gesunden und Patientenproben war zunächst rein phänotypisch (Zellmorphologie) kein Unterschied zwischen den Kohorten erkennbar. Dieser zeichnete sich jedoch im nächsten Schritt bei der Auszählung der Kolonien ab: Während in jeder Knochenmarkprobe eine Vielzahl an Kolonien zu finden war, konnte dies in der Patientenkohorte, eine Probe ausgenommen, nicht festgestellt werden. Somit konnten die zuvor erhobenen Erkenntnisse einer eingeschränkten Differenzierung bestätigt und ein Unterschied des klonogenen Potentials zwischen gesunden und Patientenzellen nachgewiesen werden (s. Abb. 29, $p=0,03$).

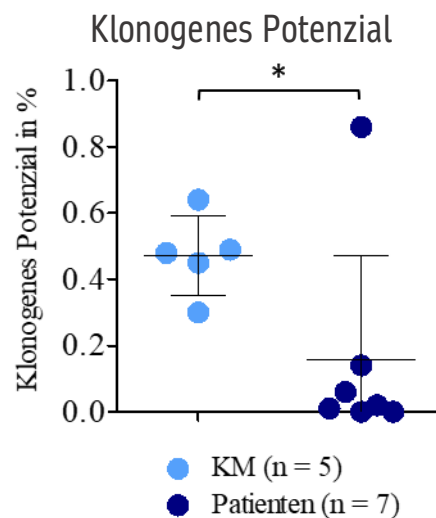


Abbildung 29: CFU-Assay: Vergleich des klonogenen Potentials von Knochenmark- und Patientenzellen in %.

6 Diskussion

Bisherige Arbeiten auf dem Gebiet der Osteoskleroseforschung in MPN konnten die Klonalität dieser Erkrankungsgruppe bei gleichzeitiger Verdeutlichung der Therapie-limitationen aufzeigen.

Auch sieben Jahre nach Beginn der vorliegenden Promotionsarbeit bleibt die einzige kurative Therapie für betroffene Patienten die hämatopoetische Stammzelltransplantation (Baumeister et al., 2021, Bacigalupo et al., 2021, Sobas et al., 2024, Ali and Bacigalupo, 2024).

Wie bereits vorab angemerkt wurde, basiert die überschaubare Anzahl an Arbeiten zu Osteoklasten in MPN auf Zellkulturstudien ab dem Differenzierungsstadium der Monozyten. Es ist also festzuhalten, dass in Hinblick auf Klonalität sowie Ursprung dieser Erkrankungen jene Arbeiten damit nur die Endphase der Osteoklastogenese berücksichtigen und den Entwicklungsweg der hämatopoetischen Stammzelle nicht beleuchten.

Demnach stellte das erste Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit zunächst die Etablierung einer humanen Osteoklastenkultur ausgehend von der in Vorarbeiten der Forschungsgruppe gezeigten neoplastischen Stammzellfraktion dar, um nicht nur eine Beurteilung der Zellen am Ende der Differenzierung, sondern auch über verschiedene Entwicklungsstadien hinweg zu gewährleisten. Dieses Experiment diene ebenso der Beantwortung der erst genannten Hypothesen – Ist die Fusion beziehungsweise Differenzierung der Stammzellfraktion von Patienten zu Osteoklasten beeinträchtigt, sodass ein Missverhältnis der an der Knochenhomöostase beteiligten Zellen anzunehmen ist? Und des Weiteren gibt es einen Unterschied in der Kernanzahl im Vergleich zu Osteoklasten von Gesunden?

Tatsächlich zeichnete sich bereits im Versuchsaufbau, nämlich in der Kultivierungszeit der Patientenproben, ein Unterschied ab und lieferte damit den ersten Hinweis für eine eingeschränkte Differenzierung von hämatopoetischen Patienten-Stammzellen zu multinukleären Osteoklasten. Durch die Etablierung des zuvor beschriebenen aufwendigen FACS-Panels konnte dieser Verdacht bestätigt werden. Nicht nur die Population der Präosteoklasten (1-4 Nuclei, TRAP+), sondern auch die der als reif angenommenen Osteoklasten (>6 Nuclei, TRAP+) war im Vergleich zu der gesunden Vergleichskohorte deutlich vermindert. Als interne Kontrolle der richtigen Sortierung und Zuordnung der Zellen wurden einerseits Zytospins, welche mit steigender DAPI-Intensität eine Zunahme der Kernanzahl bestätigten, angefertigt, und andererseits eine Mutationskontrolle der sortierten Zellfraktionen von Patienten durchgeführt, welche mit steigender Nuklearität eine Abnahme der Mutationslast zeigten.

Dieses Experiment ermöglichte gleichzeitig die Verifizierung der zweiten Hypothese, denn es zeigte eine Verminderung der Anzahl von Osteoklasten von Patienten im Vergleich zu denen von Gesunden, was ein Ungleichgewicht in der normalen Knochenhämöostase bedingen kann.

Auch das ergänzende Experiment des Phagozytose-Assays konnte die bisherigen Vermutungen einer eingeschränkten Differenzierung untermauern, indem es ein Ungleichgewicht von phagozytierenden Zellen der Monopoese nachwies und gleichzeitig ein signifikant geringeres klonogenes Potential der Patientenfraktion aufzeigte.

Einer ersten Funktionsuntersuchung der multinuklären Zellen wurde sich mit Hilfe eines weiteren FACS-Experiments genähert, welches die Expression osteoklastenspezifischer Marker, die für eine Knochenresorption essentiell sind, überprüfte. Dabei konnte in Zellen, welche mehr als acht Nuclei trugen, kein Unterschied zwischen Patienten- und gesunden Proben festgestellt werden. Daraus kann geschlossen werden, dass Zellen, welche eine erfolgreiche Differenzierung zu Osteoklasten durchlaufen haben, auch die entsprechenden Marker für eine Knochenresorption exprimieren.

Bei Betrachtung der Zellpopulation mit geringerer Kernanzahl von 1-4 Nuclei konnte hingegen eine verminderte Expression von RANK und $\alpha_v\beta_3$ nachgewiesen werden. Eine reduzierte Expression des Rezeptors RANK in Zellen mit geringer Kernanzahl, welche wahrscheinlich vorrangig Präosteoklasten darstellen, könnte Hinweise für eine eingeschränkte Differenzierung sowie Knochenresorption liefern, denn RANK spielt nicht nur eine wichtige Rolle in der Differenzierung, sondern bewirkt zudem auf reifen Osteoklasten eine Aktivierung durch eine Polarisierung des Zellkörpers. Für eine suffiziente Migration zu Knochenarealen, in denen Knochen resorbiert werden soll, ist das Integrin $\alpha_v\beta_3$ obligat. Die verminderte Expression könnte erklären, warum sich wesentlich weniger Resorptionslakunen auf den Dentinechips von Patientenproben im Vergleich zu denen von gesunden Knochenmarkspendern fanden.

In diesem FACS-Experiment wurde außerdem die Expression von RANKL überprüft. RANKL ist ein Ligand, welcher vorrangig von Osteoblasten exprimiert wird und maßgeblich an der Interaktion der Knochenzellen beteiligt ist. Die Majorität der Osteoklastenstudien setzt für eine erfolgreiche Differenzierung in ihren Zellkulturmedium RANKL ein. Da in der vorliegenden Promotionsarbeit die Hinzugabe des Liganden nicht erfolgte, aber dennoch funktionsfähige multinukleäre Zellen differenziert wurden, sollte überprüft werden, ob die Zellen in der Lage sind, sich gegenseitig oder gar autokrin zu

aktivieren. Diese Vermutung konnte bestätigt werden und lässt auf eine gegenseitige Aktivierung innerhalb der Zellpopulation schließen.

Um die wichtigste Funktion von Osteoklasten, die Knochenresorption, zu überprüfen und noch viel mehr die Ursache für eine Osteoskleroseentstehung zu finden, erfolgte die Kultivierung auf Dentinchips, welche aufgrund ihrer Hydroxylapatitstruktur als Knochenäquivalent dienen.

Die Ergebnisse waren eindeutig: Dentinchips, welche mit Patientenzellen kultiviert wurden, wiesen signifikant weniger oder gar keine Resorptionslakunen auf, sodass dies einen Funktionsverlust der Zellen belegte. Diese Erkenntnisse gehen darüber hinaus auch mit Erkenntnissen der FACS-Untersuchung auf funktionelle Osteoklastenmarker einher.– Auch wenn eine Resorption in der Patientenkohorte deutlich vermindert war, scheinen dennoch vereinzelte funktionstüchtige Zellen vorzukommen, sodass dieses Resultat sogar die heterogene Klinik und Variabilität der Krankheitsverläufe von Patienten widerspiegelt.

Die in der vorliegenden Arbeit aufgezeigte gestörte oder gar fehlende Knochenresorption in vitro kann eine Veranschaulichung der Osteoskleroseentstehung in vivo darstellen, denn die hämatopoetische Stammzellfraktion von Patienten lässt sich in geringem Maße durchaus zu “gesunden” und resorptionsfähigen Osteoklasten differenzieren, jedoch ist ein großer Teil der Zellen nicht resorptionsfähig und sucht auch keine “Knochennähe”.

Diese Erkenntnisse konnten durch die sich anschließende Mutationsanalyse unterstrichen werden. Nicht nur bei sortierten multinukleären Zellen in der Durchflusszytometrie, sondern auch in jenen Zellen, welche von Dentinchips abgelöst wurden, konnten in der genotypischen Untersuchung keine Mutationen nachgewiesen werden. Dieser Sachverhalt steht Zellen, welche in früheren Entwicklungsstadien mit weniger Zellkernen oder im Well neben den Dentinchips verharrten, kontrastierend gegenüber.

So konnte sich auch der letzten Hypothese genähert werden und eine Relation zwischen den genotypischen Veränderungen und der angenommenen Einschränkung der Osteoklastenfunktion aufgezeigt werden.

Auch wenn die geschilderten Ergebnisse deutliche Unterschiede zwischen Proben von Gesunden und Proben von Patienten präsentieren, stellen die kleinen Fallzahlen dennoch die größte Schwäche dieser Promotionsarbeit dar. Dies begründet sich in der Seltenheit der verschiedenen MPN-Entitäten bei gleichzeitig unterschiedlichen (Driver-)Mutationen.

Die genannten Limitationen erschwerten somit eine Gruppierung und gleichzeitige Kategorisierung anhand der Ergebnisse, weshalb aus den einzelnen Analysen der Subgruppen keine sichere Aussage getroffen werden konnte und sie lediglich als Tendenz

für die verschiedenen Schweregrade der Drivermutationen, wie zum Beispiel MPL, dienen. Die statistische Signifikanz der Arbeit sollte daher mit einer gewissen Vorsicht betrachtet werden und müsste mit größeren Fallzahlen überprüft werden.

Nichtsdestotrotz liefert diese Arbeit eine Möglichkeit, die hämatopoetische Stammzellpopulation zu reifen und funktionsfähigen Osteoklasten zu differenzieren und somit in Hinblick auf die Klonalität von MPN, auf verschiedenen Ebenen der Entwicklung die Zellen der Monopoese bzw. Osteoklastogenese zu untersuchen. Bisher sind keine Publikationen, in denen Osteoklasten beginnend von dem Zellstadium der Stammzelle in MPN kultiviert und überprüft wurden, erschienen, was als Stärke dieser Arbeit zu werten ist. Darüber hinaus stellt die Etablierung des FACS-Panels mit osteoklastenspezifischen Markern ebenso eine Einzigartigkeit der Osteoskleroseforschung in MPN dar und kann nicht nur in dieser Erkrankungsgruppe eine Möglichkeit zur Untersuchung multinukleärer Zellen bieten.

Die vorliegende Promotionsarbeit sollte einen Beitrag für ein besseres Verständnis dieser seltenen sowie bis heute nur unzureichend verstandenen Erkrankungsgruppe leisten und verfolgte dabei das übergeordnete Ziel, mögliche Ursachen einer Osteoskleroseentstehung zu erforschen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse dieser Arbeit tatsächlich Hinweise für die Ursache einer Osteosklerose in MPN liefern, gleichzeitig jedoch nur ein kleines Puzzleteil im Verständnis der Erkrankung repräsentieren, für die leider nach wie vor eine Stammzelltransplantation die einzige kurative Therapie darstellt.

7 Zusammenfassung

Die genauen zugrundeliegenden Mechanismen einer aberranten Osteoklastogenese auf Basis klonaler Malignität einer hämatopoetischen Stammzelle in MPN sind bisher nur unzureichend verstanden.

Da Osteoklasten aus der Fusion monozytischer Progenitoren entstehen und eine allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation zu einer raschen Regression der Osteosklerose führt, wurde eine aufwendige Osteoklastenkultur aus humanen CD34+CD133+ Stammzellen von gesunden KM-Spendern (n=14) sowie Patientenblut (n=21) zur Untersuchung der Osteoskleroseentstehung entwickelt. Die bereits in der Kultivierungszeit auffallende längere Differenzierungszeit in den Patientenkulturen wurde durch spätere FACS-Analysen bestätigt: Stammzellen von Patienten ließen sich in deutlich reduziertem Maße zu TRAP+ Prä- (1-4 Nuclei) und Osteoklasten (>6 Nuclei) differenzieren ($p < 0,0001$ und $p = 0,0276$) und exprimierten darüber hinaus weniger RANK ($p = 0,02$) und $\alpha_v\beta_3$ ($p = 0,0128$), was erste Hinweise für eine kompromittierte Knochenresorption repräsentierte. Ein gestörte Knochenhomöostase zu Ungunsten einer Resorption konnte durch die Zellkultivierung auf dem Knochenäquivalent Dentin nachgewiesen werden ($p = 0,0003$) werden. Interessanterweise zeigten genau jene Zellen, welche in Kultur „Knochennähe“ suchten, keine Mutationen auf und ließen sich damit deutlich von den mutationstragenden und funktionslosen Zellen unterscheiden ($p = 0,0156$). Ebenso differenzierte sich im Rahmen eines Phagozytose-Assays zur Beleuchtung der Monopoese die Stammzellfraktion von Patienten in erheblich geringerem Maße zu HLA-DR+ Zellen, welche Phagozytose betrieben und damit funktionstüchtig waren ($p = 0,0023$) sowie nur eine Minderheit exprimierte die Monozyten-/Makrophagen-spezifischen Oberflächenmarker CD14 und CD16 (0,0047). Diese Erkenntnisse wurden in Colony-Assays durch ein vermindertes klonogenes Potential der Patientenzellen nach sieben Tagen Zellkultur bestätigt ($p = 0,03$). Auch wenn die geschilderten Ergebnisse deutliche Unterschiede zwischen der gesunden und Patientenkohorte hinsichtlich einer gestörten Mono-/ Osteoklastogenese präsentieren, stellen die kleinen Fallzahlen (auf Basis der Erkrankungsgruppenrarity) jedoch die größte Limitation dieser Arbeit dar. Dennoch konnte durch die Etablierung einer stabilen Osteoklastenkultur aus humanen Stammzellen über mehrere Wochen ein Beitrag für ein besseres Verständnis dieser seltenen sowie bis heute nur unzureichend verstandenen Erkrankungsgruppe geleistet und das übergeordnete Ziel, die Pathologie der Osteoklastogenese aufzuzeigen und mögliche Erklärungsansätze der Osteoskleroseentstehung darzulegen, erreicht werden. Darüber hinaus stellt nicht nur das Kultursystem eine Neuheit dar,

sondern auch die Entwicklung verschiedener Funktionsassays zur Analyse dieser multinukleären Zellen, welche auch in anderen Forschungsgebieten zum Tragen kommen kann.

Summary

The exact underlying mechanisms contributing to an aberrant osteoclastogenesis in Myeloproliferative neoplasms (MPN), based on the clonal malignancy of a hematopoietic stem cell, are still deficiently understood.

Since osteoclasts arise from the fusion of monocytic progenitors and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation leads to a rapid regression of osteosclerosis, an elaborate osteoclast culture from human CD34⁺CD133⁺ stem cells of healthy bone marrow donors (n=14) and patient blood (n=21) was carried out to investigate osteosclerosis development.

Already during the cultivation period of the two cohorts, a longer differentiation time until multinucleated cells developed, was observed in the patient cultures and confirmed by later flow cytometric findings: Stem cells from patients differentiated to a significantly reduced extent into TRAP⁺ pre- (1-4 nuclei) and osteoclasts (>6 nuclei) ($p < 0.0001$ and $p = 0.0276$) and also expressed less RANK ($p = 0.02$) and $\alpha_v\beta_3$ ($p = 0.0128$), representing initial evidence of compromised bone resorption. A disturbed bone homeostasis to the detriment of resorption could be demonstrated by cell cultivation on the bone equivalent dentin ($p = 0.0003$). Interestingly, precisely those cells that sought “bone proximity” in culture showed no mutations and could thus be clearly distinguished from the mutation-bearing and functionless cells ($p = 0.0156$).

Similarly, in a phagocytosis assay for monopoietic cells, the hematopoietic stem cell fraction of patients differentiated significantly less into HLA-DR positive cells that underwent phagocytosis and were thus functional ($p = 0.0023$) and only a minority expressed the monocyte/macrophage-specific surface markers CD14 and CD16 (0.0047). These findings were confirmed in colony assays by a reduced clonogenic potential of the patient cells after seven days of cell culture ($p = 0.03$).

Even though the results described show clear differences between healthy bone marrow and patient cohorts with regard to impaired mono-/ osteoclastogenesis, the small number of cases (given the rarity of the various MPN entities) represents the greatest limitation of this work. Nevertheless, the establishment of a stable OSC culture from fresh human stem cells over a period of several weeks has contributed to a better understanding of this rare and still insufficiently understood group of diseases and has achieved the overarching goal of elucidating the pathology of osteoclastogenesis and providing possible explanations for the

development of osteosclerosis. Furthermore, not only the culture system, but also the development of various functional assays for the analysis of these multinucleated cells represents a novelty, which can also be used in other research areas.

8 Literaturverzeichnis

- ALCHALBY, H., BADBARAN, A., BOCK, O., FEHSE, B., BACHER, U., ZANDER, A. R. & KRÖGER, N. 2010. Screening and monitoring of MPL W515L mutation with real-time PCR in patients with myelofibrosis undergoing allogeneic-SCT. *Bone Marrow Transplant*, 45, 1404-7.
- ALI, H. & BACIGALUPO, A. 2024. 2024 update on allogeneic hematopoietic stem cell transplant for myelofibrosis: A review of current data and applications on risk stratification and management. *American Journal of Hematology*, 99, 938-945.
- ARAI, F., MIYAMOTO, T., OHNEDA, O., INADA, T., SUDO, T., BRASEL, K., MIYATA, T., ANDERSON, D. M. & SUDA, T. 1999. Commitment and Differentiation of Osteoclast Precursor Cells by the Sequential Expression of C-Fms and Receptor Activator of Nuclear Factor κ B (RANK) Receptors. *Journal of Experimental Medicine*, 190, 1741-1754.
- ARBER, D. A., ORAZI, A., HASSERJIAN, R. P., BOROWITZ, M. J., CALVO, K. R., KVASNICKA, H.-M., WANG, S. A., BAGG, A., BARBUI, T., BRANFORD, S., BUESO-RAMOS, C. E., CORTES, J. E., DAL CIN, P., DINARDO, C. D., DOMBRET, H., DUNCAVAGE, E. J., EBERT, B. L., ESTEY, E. H., FACCHETTI, F., FOUCAR, K., GANGAT, N., GIANELLI, U., GODLEY, L. A., GÖKBUGET, N., GOTLIB, J., HELLSTRÖM-LINDBERG, E., HOBBS, G. S., HOFFMAN, R., JABBOUR, E. J., KILADJIAN, J.-J., LARSON, R. A., LE BEAU, M. M., LOH, M. L.-C., LÖWENBERG, B., MACINTYRE, E., MALCOVATI, L., MULLIGHAN, C. G., NIEMEYER, C., ODENIKE, O. M., OGAWA, S., ORFAO, A., PAPAEMMANUIL, E., PASSAMONTI, F., PORKKA, K., PUI, C.-H., RADICH, J. P., REITER, A., ROZMAN, M., RUDELIUS, M., SAVONA, M. R., SCHIFFER, C. A., SCHMITT-GRAEFF, A., SHIMAMURA, A., SIERRA, J., STOCK, W. A., STONE, R. M., TALLMAN, M. S., THIELE, J., TIEN, H.-F., TZANKOV, A., VANNUCCHI, A. M., VYAS, P., WEI, A. H., WEINBERG, O. K., WIERZBOWSKA, A., CAZZOLA, M., DÖHNER, H. & TEFFERI, A. 2022. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood*, 140, 1200-1228.
- BACIGALUPO, A., INNOCENTI, I., ROSSI, E., SORA, F., GALLI, E., AUTORE, F., METAFUNI, E., CHIUSOLO, P., GIAMMARCO, S., LAURENTI, L., BENINTENDE, G., SICA, S. & DE STEFANO, V. 2021. Allogeneic Hemopoietic Stem Cell Transplantation for Myelofibrosis: 2021. *Frontiers in Immunology*, 12.
- BADBARAN, A., FEHSE, B., CHRISTOPEIT, M., ARANYOSSY, T., AYUK, F. A., WOLSCHKE, C. & KRÖGER, N. 2016. Digital-PCR assay for screening and quantitative monitoring of calreticulin (CALR) type-2 positive patients with myelofibrosis following allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 51, 872-3.
- BARBUI, T., THIELE, J., GISSLINGER, H., KVASNICKA, H. M., VANNUCCHI, A. M., GUGLIELMELLI, P., ORAZI, A. & TEFFERI, A. 2018. The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and in-depth discussion. *Blood Cancer J*, 8, 15.
- BAUMEISTER, J., CHATAIN, N., SOFIAS, A. M., LAMMERS, T. & KOSCHMIEDER, S. 2021. Progression of Myeloproliferative Neoplasms (MPN): Diagnostic and Therapeutic Perspectives. *Cells*, 10, 3551.
- BHATIA, M. 2001. AC133 expression in human stem cells. *Leukemia*, 15, 1685-8.
- BOCK, O., LOCH, G., SCHADE, U., BÜSCHE, G., WASIELEWSKI, R., WIESE, B. & KREIPE, H. 2005. Osteosclerosis in advanced chronic idiopathic myelofibrosis is associated with endothelial overexpression of osteoprotegerin. *Br J Haematol*, 130, 76-82.
- BOYLE, W. J., SIMONET, W. S. & LACEY, D. L. 2003. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423, 337-342.
- BRUZZANITI, A. & BARON, R. 2006. Molecular regulation of osteoclast activity. *Rev Endocr Metab Disord*, 7, 123-39.
- CHANDRABALAN, S., DANG, L., HANSEN, U., TIMMEN, M., WEHMEYER, C., STANGE, R., BEIßBARTH, T., BINDER, C., BLECKMANN, A. & MENCK, K. 2024. A novel

- method to efficiently differentiate human osteoclasts from blood-derived monocytes. *Biological Procedures Online*, 26, 7.
- DELHOMMEAU, F., DUPONT, S., TONETTI, C., MASSÉ, A., GODIN, I., LE COUEDIC, J. P., DEBILI, N., SAULNIER, P., CASADEVALL, N., VAINCHENKER, W. & GIRAUDIER, S. 2007. Evidence that the JAK2 G1849T (V617F) mutation occurs in a lymphomyeloid progenitor in polycythemia vera and idiopathic myelofibrosis. *Blood*, 109, 71-7.
- GALLACHER, L., MURDOCH, B., WU, D. M., KARANU, F. N., KEENEY, M. & BHATIA, M. 2000. Isolation and characterization of human CD34(-)Lin(-) and CD34(+)Lin(-) hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7. *Blood*, 95, 2813-20.
- GANGAT, N. & TEFFERI, A. 2020. Myelofibrosis biology and contemporary management. *British Journal of Haematology*, 191, 152-170.
- GIANELLI, U., THIELE, J., ORAZI, A., GANGAT, N., VANNUCCHI, A. M., TEFFERI, A. & KVASNICKA, H. M. 2023. International Consensus Classification of myeloid and lymphoid neoplasms: myeloproliferative neoplasms. *Virchows Arch*, 482, 53-68.
- GREENFIELD, G., MCMULLIN, M. F. & MILLS, K. 2021. Molecular pathogenesis of the myeloproliferative neoplasms. *Journal of Hematology & Oncology*, 14, 103.
- HANSEN, M. S., MADSEN, K., PRICE, M., SØE, K., OMATA, Y., ZAISS, M. M., GORVIN, C. M., FROST, M. & RAUCH, A. 2024. Transcriptional reprogramming during human osteoclast differentiation identifies regulators of osteoclast activity. *Bone Research*, 12, 5.
- IBÁÑEZ, L., ABOU-EZZI, G., CIUCCI, T., AMIOT, V., BELAÏD, N., OBINO, D., MANSOUR, A., ROULEAU, M., WAKKACH, A. & BLIN-WAKKACH, C. 2016. Inflammatory Osteoclasts Prime TNF α -Producing CD4(+) T Cells and Express CX(3) CR1. *J Bone Miner Res*, 31, 1899-1908.
- IBÁÑEZ, L., NÁCHER-JUAN, J., TERCENIO, M. C., FERRÁNDIZ, M. L. & ALCARAZ, M. J. 2022. Osteostatin Inhibits M-CSF+RANKL-Induced Human Osteoclast Differentiation by Modulating NFATc1. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 8551.
- JACOBSON, R. J., SALO, A. & FIALKOW, P. J. 1978. Agnogenic myeloid metaplasia: a clonal proliferation of hematopoietic stem cells with secondary myelofibrosis. *Blood*, 51, 189-94.
- JAMIESON, C. H. M., GOTLIB, J., DUROCHER, J. A., CHAO, M. P., MARIAPPAN, M. R., LAY, M., JONES, C., ZEHNDER, J. L., LILLEBERG, S. L. & WEISSMAN, I. L. 2006. The JAK2 V617F mutation occurs in hematopoietic stem cells in polycythemia vera and predisposes toward erythroid differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 6224-6229.
- KRÖGER, N., BADBARAN, A., HOLLER, E., HAHN, J., KOBBE, G., BORNHÄUSER, M., REITER, A., ZABELINA, T., ZANDER, A. R. & FEHSE, B. 2007. Monitoring of the JAK2-V617F mutation by highly sensitive quantitative real-time PCR after allogeneic stem cell transplantation in patients with myelofibrosis. *Blood*, 109, 1316-21.
- KRÖGER, N., HOLLER, E., KOBBE, G., BORNHÄUSER, M., SCHWERDTFEGER, R., BAURMANN, H., NAGLER, A., BETHGE, W., STELLJES, M., UHAREK, L., WANDT, H., BURCHERT, A., CORRADINI, P., SCHUBERT, J., KAUFMANN, M., DREGER, P., WULF, G. G., EINSELE, H., ZABELINA, T., KVASNICKA, H. M., THIELE, J., BRAND, R., ZANDER, A. R., NIEDERWIESER, D. & DE WITTE, T. M. 2009. Allogeneic stem cell transplantation after reduced-intensity conditioning in patients with myelofibrosis: a prospective, multicenter study of the Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood*, 114, 5264-70.
- KRÖGER, N., WOLSCHKE, C. & GAGELMANN, N. 2023. How I treat transplant-eligible patients with myelofibrosis. *Blood*, 142, 1683-1696.
- LEVINE, R. L., BELISLE, C., WADLEIGH, M., ZAHRIEH, D., LEE, S., CHAGNON, P., GILLILAND, D. G. & BUSQUE, L. 2006. X-inactivation-based clonality analysis and quantitative JAK2V617F assessment reveal a strong association between clonality and JAK2V617F in PV but not ET/MMM, and identifies a subset of JAK2V617F-negative ET and MMM patients with clonal hematopoiesis. *Blood*, 107, 4139-4141.
- LIU, Y.-C., ILLAR, G. M. & BAILEY, N. G. 2020. Clinicopathologic characterisation of myeloid neoplasms with concurrent spliceosome mutations and myeloproliferative-neoplasm-associated mutations. *Journal of Clinical Pathology*, 73, 728-736.

- MAGGIANI, F., FORSYTH, R., HOGENDOORN, P. C., KRENACS, T. & ATHANASOU, N. A. 2011. The immunophenotype of osteoclasts and macrophage polykaryons. *J Clin Pathol*, 64, 701-5.
- MARINO, S., LOGAN, J. G., MELLIS, D. & CAPULLI, M. 2014. Generation and culture of osteoclasts. *Bonekey Rep*, 3, 570.
- MARTY, C., PECQUET, C., NIVARTHI, H., EL-KHOURY, M., CHACHOUA, I., TULLIEZ, M., VILLEVAL, J. L., RASLOVA, H., KRALOVICS, R., CONSTANTINESCU, S. N., PLO, I. & VAINCHENKER, W. 2016. Calreticulin mutants in mice induce an MPL-dependent thrombocytosis with frequent progression to myelofibrosis. *Blood*, 127, 1317-24.
- MATAYOSHI, A., BROWN, C., DIPERSIO, J. F., HAUG, J., ABU-AMER, Y., LIAPIS, H., KUESTNER, R. & PACIFICI, R. 1996. Human blood-mobilized hematopoietic precursors differentiate into osteoclasts in the absence of stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 10785-90.
- MCMULLIN, M. F. & ANDERSON, L. A. 2020. Aetiology of Myeloproliferative Neoplasms. *Cancers (Basel)*, 12.
- MEAD, A. J. & MULLALLY, A. 2017. Myeloproliferative neoplasm stem cells. *Blood*, 129, 1607-1616.
- MENAA, C., KURIHARA, N. & ROODMAN, G. D. 2000. CFU-GM-derived cells form osteoclasts at a very high efficiency. *Biochem Biophys Res Commun*, 267, 943-6.
- MIZRAK, D., BRITTAN, M. & ALISON, M. 2008. CD133: molecule of the moment. *The Journal of Pathology*, 214, 3-9.
- NANGALIA, J. & GREEN, A. R. 2017. Myeloproliferative neoplasms: from origins to outcomes. *Blood*, 130, 2475-2483.
- PASSAMONTI, F. & MAFFIOLI, M. 2016. Update from the latest WHO classification of MPNs: a user's manual. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2016, 534-542.
- PIZZI, M., CROCI, G. A., RUGGERI, M., TABANO, S., DEI TOS, A. P., SABATTINI, E. & GIANELLI, U. 2021. The Classification of Myeloproliferative Neoplasms: Rationale, Historical Background and Future Perspectives with Focus on Unclassifiable Cases. *Cancers*, 13, 5666.
- RAGGATT, L. J. & PARTRIDGE, N. C. 2010. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem*, 285, 25103-8.
- SALE, G. E., DEEG, H. J. & PORTER, B. A. 2006. Regression of Myelofibrosis and Osteosclerosis following Hematopoietic Cell Transplantation Assessed by Magnetic Resonance Imaging and Histologic Grading. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 12, 1285-1294.
- SHALLIS, R. M., WANG, R., DAVIDOFF, A., MA, X., PODOLTSEV, N. A. & ZEIDAN, A. M. 2020. Epidemiology of the classical myeloproliferative neoplasms: The four corners of an expansive and complex map. *Blood Reviews*, 42, 100706.
- SOBAS, M., IANOTTO, J.-C., KILADJIAN, J.-J. & HARRISON, C. 2024. Myeloproliferative neoplasms: young patients, current data and future considerations. *Annals of Hematology*, 103, 3287-3291.
- SOYSA, N. S. & ALLES, N. 2016. Osteoclast function and bone-resorbing activity: An overview. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 476, 115-120.
- SPAMPINATO, M., GIALONGO, C., ROMANO, A., LONGHITANO, L., LA SPINA, E., AVOLA, R., SCANDURA, G., DULCAMARE, I., BRAMANTI, V. & DI ROSA, M. 2021. Focus on Osteosclerotic Progression in Primary Myelofibrosis. *Biomolecules*. 2021; 11: 122. s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published
- SUSA, M., LUONG-NGUYEN, N.-H., CAPPELLEN, D., ZAMUROVIC, N. & GAMSE, R. 2004. Human primary osteoclasts: in vitro generation and applications as pharmacological and clinical assay. *Journal of Translational Medicine*, 2, 6.
- TEFFERI, A. 2021. Primary myelofibrosis: 2021 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol*, 96, 145-162.
- TEFFERI, A. & BARBUI, T. 2023. Polycythemia vera: 2024 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*, 98, 1465-1487.

- TEFFERI, A., LASHO, T. L., GUGLIELMELLI, P., FINKE, C. M., ROTUNNO, G., ELALA, Y., PACILLI, A., HANSON, C. A., PANCRAZZI, A., KETTERLING, R. P., MANNARELLI, C., BARRACO, D., FANELLI, T., PARDANANI, A., GANGAT, N. & VANNUCCHI, A. M. 2016. Targeted deep sequencing in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood Advances*, 1, 21-30.
- TEFFERI, A., VANNUCCHI, A. M. & BARBUI, T. 2018a. Essential thrombocythemia treatment algorithm 2018. *Blood Cancer Journal*, 8, 2.
- TEFFERI, A., VANNUCCHI, A. M. & BARBUI, T. 2018b. Polycythemia vera treatment algorithm 2018. *Blood Cancer Journal*, 8, 3.
- THIELE, J., KVASNICKA, H. M., DIETRICH, H., STEIN, G., HANN, M., KAMINSKI, A., RATHJEN, N., METZ, K. A., BEELEN, D. W., DITSCHKOWSKI, M., ZANDER, A. & KROEGER, N. 2005. Dynamics of bone marrow changes in patients with chronic idiopathic myelofibrosis following allogeneic stem cell transplantation. *Histol Histopathol*, 20, 879-89.
- TRIVIALI, I., STÜBIG, T., NIEBUHR, B., HUSSEIN, K., TSIFTSOGLOU, A., FEHSE, B., STOCKING, C. & KRÖGER, N. 2015. CD133 marks a stem cell population that drives human primary myelofibrosis. *haematologica*, 100, 768.
- TRIVIALI, I., ZESCHKE, S., RENTEL, J., SPANAKIS, M., SCHERER, T., GABDOULLINE, R., PANAGIOTA, V., THOL, F., HEUSER, M., STOCKING, C. & KRÖGER, N. 2019. ASXL1/EZH2 mutations promote clonal expansion of neoplastic HSC and impair erythropoiesis in PMF. *Leukemia*, 33, 99-109.
- VAINCHENKER, W., DELHOMMEAU, F., CONSTANTINESCU, S. N. & BERNARD, O. A. 2011. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 118, 1723-1735.
- VAINCHENKER, W. & KRALOVICS, R. 2017. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 129, 667-679.
- VELETIC, I., MANSOURI, T., MULTANI, A. S., YIN, C. C., CHEN, L., VERSTOVSEK, S. & ESTROV, Z. 2019. Myelofibrosis osteoclasts are clonal and functionally impaired. *Blood*, 133, 2320-2324.
- VELETIC, I., MANSOURI, T., YIN, C. C., NEWBERRY, K. J., VERSTOVSEK, S. & ESTROV, Z. 2017. Neoplastic Monocyte-Derived Osteoclasts Are Highly Proliferative, but Sub-Functional in MPN-Associated Myelofibrosis. *Blood*, 130, 1664-1664.
- VERSTOVSEK, S., YU, J., SCHERBER, R. M., VERMA, S., DIEYI, C., CHEN, C. C. & PARASURAMAN, S. 2022. Changes in the incidence and overall survival of patients with myeloproliferative neoplasms between 2002 and 2016 in the United States. *Leuk Lymphoma*, 63, 694-702.
- WANG, J. C., HEMAVATHY, K., CHARLES, W., ZHANG, H., DUA, P. K., NOVETSKY, A. D., CHANG, T., WONG, C. & JABARA, M. 2004. Osteosclerosis in idiopathic myelofibrosis is related to the overproduction of osteoprotegerin (OPG). *Experimental Hematology*, 32, 905-910.
- WANG, L., YOU, X., ZHANG, L., ZHANG, C. & ZOU, W. 2022. Mechanical regulation of bone remodeling. *Bone Research*, 10, 16.
- WEBER, K., MOCK, U., PETROWITZ, B., BARTSCH, U. & FEHSE, B. 2010. Lentiviral gene ontology (LeGO) vectors equipped with novel drug-selectable fluorescent proteins: new building blocks for cell marking and multi-gene analysis. *Gene Therapy*, 17, 511-520.
- WEBER, K., THOMASCHEWSKI, M., BENTEN, D. & FEHSE, B. 2012. RGB marking with lentiviral vectors for multicolor clonal cell tracking. *Nature Protocols*, 7, 839-849.
- YAN, X.-Q., LACEY, D., HILL, D., CHEN, Y., FLETCHER, F., HAWLEY, R. G. & MCNIECE, I. K. 1996. A Model of Myelofibrosis and Osteosclerosis in Mice Induced by Overexpressing Thrombopoietin (mpl Ligand): Reversal of Disease by Bone Marrow Transplantation. *Blood*, 88, 402-409.
- ZOI, K. & CROSS, N. C. P. 2017. Genomics of Myeloproliferative Neoplasms. *Journal of Clinical Oncology*, 35, 947-954.

9 Patientenverzeichnis

Bisherige Patienten	Erkrankung	Driver-Mutation	Weitere Mutationen
P 1	PMF	MPL	-
P 2	post-ET	MPL	ASXL1
P	PMF	MPL	SF3B1
P 4	PMF	JAK2	p53
P 5	post-PV	JAK2	-
P 6	PMF	JAK2	ASXL1, RUNX1
P 7	post-ET	CALR	-
P 8	PMF	JAK2	ASXL1
P 9	post-ET	CALR	-
P 10	PMF	JAK2	SRSF1
P 11	PMF	CALR	-
P 12	PMF	PMF	p53
P 13	PMF	CALR	-
P 14	PMF	JAK2	-
P 15	post-ET	Triple negativ	-
P 16	post-PV	JAK2	ASXL1, EZH2, IDH2, SH2B3, ETNK1
P 17	post-PV	JAK2	-
P 18	PMF	JAK2	ASXL1, CBL
P 19	PMF	JAK2	ASXL1, RUNX1
P 20	post-PV	JAK2	ASXL1
P 21	post-ET	JAK2	ASXL1

10 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
α -MEM	Alpha-Minimum Essential Medium
$\alpha_v\beta_3$	Alpha-v-Beta-3-Integrin, CD51/61
ASXL1	Additional Sex Combs-Like 1
Bp	Basenpaare
CA2	Carbonic anhydrase 2
CALR	Calreticulin
CBL	Casitas B-Lineage Lymphoma Proto-Oncogene
CD	„Cluster of differentiation“
CEL-NOS	Eosinophilenleukämie not otherwise specified
CFU	Colony Forming Unit
CFU-GM	Granulocyte-Macrophage Colony-Forming Unit
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
CNL	Neutrophilenleukämie
CTK	Cathepsin K
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DIPSS	Dynamic Prognostic Scoring System
DNA	Desoxyribunuclein acid
DNMT3	DNA Methyltransferase 3
EDTA	Ehtylendiamintetraessigsäure
ELF97	Endogenous Phosphatase 97
EPO	Erythropoietin
EPOR	Erythropoietin Rezeptor
ET	Essentielle Thrombozythämie

ETNK1	Ethanolamine Kinase 1
EZH2	Enhancer of zeste homolog 2
FACS	Fluorescent Activated Cell Sorting
G-CSF	Granulozyten stimulierender Faktor
G-CSFR	Granulozyten-Koloniestimulierendem Faktor-Rezeptor
GFP	Green fluorescent protein
GIPSS	Genetically-Inspired Prognostic Scoring System
GM-CSF	Granulozyten-/ Makrophagen Koloniestimulierender Faktor
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen DR-Isotyp
HSC	Hämatopoetische Stammzellen
HSPCs	hämatopoetische Stamm-/ und Progenitorzellen
IDH2	Isocitratdehydrogenase 2
IgG	Immunglobulin G
IL-1/ -3/ -6	Interleukin 1/ 3/ 6
IMDM	Iscoe's modified Dulbecco's medium
IOBM	Institut für Osteologie und Biomechanik
IPSS	International Prognostic Scoring System
JAK2	Januskinase zwei
KM	Knochenmark
L	Leucin
Lin	Lineage
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MF	Myelofibrose
MIPSS70	Mutation-Enhanced International Prognostic Scoring System for Transplant-Age Patients

MIPSSv2	MIPSS70 mit Erweiterung um den Karyotyp
MNC	Mononukleäre Zellen
MPL	Myeloproliferative leukemia protein = Thrombopoietinrezeptor
MPN	Myeloproliferative Neoplasien
mRNA	messenger Ribonulcein acid
MSC	Mesenchymale Stromazellen
N	Nucleus
OSC	Osteosklasten
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PI	Propidium-Iodid
PMF	Primäre Myelofibrose
PV	Polycythaemia Vera
RANK	Receptor Activator of NF- κ B, CD265
RANKL	Receptor Activator of NF- κ B ligand, CD254
RNA	Ribonulcein acid
Rpm	Rounds per minute
RUNX1	Runt-Related Transcription Factor 1
s.u.	Siehe unten
SCF	Stammzellfaktor
SH2B3	SH2B adapter protein 3; Lymphocyte adapter protein
SRSF2	Serin/arginin-rich splicing factor 2
STAT	Signal transducer and activator of transcription
STX	Stammzelltransplantation
TET2	Tet-Methylcytosin-Dioxygenase 2

THPO	Thrombopoietin
THPOR	Thrombopoietinrezeptor
TP53	Tumorsuppressorgen 53
TRAP	Tartrate-Resistant-Acid-Phosphatase
U2AF1	U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
WHO	World Health Organization

11 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Etablierung einer humanen Osteoklastenkultur
Abbildung 2:	Darstellung der Fluoreszenzintensität von DAPI und PI für einen Zellkern (1n) sowie in Mitose befindliche Zellen (2n)
Abbildung 3:	Zunahme der Kernanzahl bei gleichzeitiger Steigerung der Farbstoffintensität. Stufenweise Veranschaulichung durch Zytospins in den Abschnitten A-E
Abbildung 4:	Papenheim Färbung von CD133+CD34+ Zellen nach einer Woche Zellkultur
Abbildung 5:	TRAP-positive multinukleäre Zellen nach Abschluss der Zellkultur in unterschiedlichen Vergrößerungen
Abbildung 6:	Toluidinblaufärbte Resorptionslakunen auf einem Dentinechip
Abbildung 7:	Mikroskopische Analyse von Resorptionslakunen
Abbildung 8:	Versuchsaufbau Phagozytose-Assay
Abbildung 9:	Versuchsaufbau CFU-Assay
Abbildung 10:	Gating-Strategie zur Isolierung der CD133+CD34+ Stammzellfraktion
Abbildung 11:	Lichtmikroskopische Aufnahmen reifer Osteoklasten in der Zellkultur
Abbildung 12:	Kultivierungszeit bis zur Entstehung reifer Osteoklasten
Abbildung 13:	TRAP-Positivität multinukleärer Osteoklasten
Abbildung 14:	Gating-Strategie FACS-Panel 1
Abbildung 15:	TRAP-Expression der Zellpopulation von gesunden Knochenmarkspendern und Patienten im Vergleich
Abbildung 16:	Vergleich der Populationsgröße von A: Prä-Osteoklasten (1-4 Nuclei) und B: Osteoklasten (> 6 Nuclei) zwischen Patienten und Gesunden
Abbildung 17:	Darstellung von Zytospins multinukleärer Zellen, welche zuvor mit osteoklastenspezifischen Marker gefärbt wurden

Abbildung 18:	Gating-Strategie FACS-Panel 2 (KM 10)
Abbildung 19:	Vergleich der Kernanzahl (>8 Nuclei) zwischen KM und Patienten
Abbildung 20:	RANK- und $\alpha_v\beta_3$ -Expression von Zellen mit 1-4 Nuclei
Abbildung 21:	Darstellung von zwei Dentinchips in der Auflichtmikroskopie nach Toluidinblaufärbung
Abbildung 22:	Gegenüberstellung der Resorptionsfläche pro analysierter Probe von Gesunden und Patienten
Abbildung 23:	Mutationslast von mutmaßlich resorbierenden (blau) versus nicht resorbierenden (grün) Patientenzellen
Abbildung 24:	Zellzahlen von gesunden und Patientenproben nach sieben Tagen Zellkultur
Abbildung 25:	Expressionsmuster und Gating-Strategie des Phagozytose-Assays sowie Vergleich der Phagozytoseaktivität HLA-DR positiver Zellen einer Knochenmarkprobe kontrastierend zu einer Patientenprobe
Abbildung 26:	CD14 und CD16 Expression HLA-DR+ phagozytischer Zellen
Abbildung 27:	Anteil der mutmaßlich dendritischen Zellfraktion an der Gesamtpopulation
Abbildung 28:	CFU-Assay nach 13 Tagen: Koloniebildung der initial CD133+ CD34+ Zellpopulation nach einer Woche Zellkultur im Vergleich
Abbildung 29:	CFU-Assay: Vergleich des klonogenen Potentials von Knochenmark- und Patientenzellen in %

12 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Liste der verwendeten Geräte
Tabelle 2:	Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien
Tabelle 3:	Liste der verwendeten Medien und Reagenzien
Tabelle 4:	Liste der verwendeten Zytokine und Wachstumsfaktoren
Tabelle 5:	Liste der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und -konjugaten
Tabelle 6:	Antikörper zur Isolation einer CD133+CD34+ Stammzellfraktion
Tabelle 7:	Antikörper zur Detektion von Zellen der Osteoklastogenese
Tabelle 8:	Antikörper zur Charakterisierung phagozytierender Zellen
Tabelle 9:	PCR- und Sequenzierungsprimer
Tabelle 10:	Mutationsnachweise in verschiedenen Zellpopulationen von Patientenproben gruppiert nach Driver-Mutationen

13 Erklärung des Eigenanteils

Die Arbeit wurde innerhalb der Forschungsgruppe für Stammzellbiologie unter Leitung und Betreuung von Frau Dr. Ioanna Trivaii und des Direktors der interdisziplinären Klinik für Stammzelltransplantation des UKEs, Herrn Prof. Nikolaus Kröger, durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Frau Dr. Ioanna Trivaii und Victoria Fischer.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Teammitglieder der Forschungsgruppe, Silke Zeschke, Eleni Besiridou, Matthias Schäfersküpper und Vera Koehl, von mir eigenständig durchgeführt. Die Etablierung einer humanen Osteoklastenkultur und anschließende FACS-Analyse erfolgte selbstständig durch die Promovendin.

FACS-Analysen und -Sortierungen wurden durch Unterstützung der FACS-Core Unit des UKEs durchgeführt. Die Dentinechipchargen wurden durch das Institut für Osteologie und Biomechanik gespendet und die Zuschnitte des Elfenbeins erfolgte nach Einarbeitung durch Michael Hahn durch die Promovendin.

Die mikroskopische Analyse von Dentinechips erfolgte nach Einarbeitung und Unterstützung der Microscopy Core Unit, insbesondere durch Antonio Virgilio Failla.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig nach Beratung durch Frau Dr. Ioanna Trivaii und mit Unterstützung von Eleni Besiridou.

Regelmäßige Progress Reports in wöchentlichen Laborm meetings der Forschungsgruppe für Stammzellbiologie und daraus resultierende Kritik und Ermutigung von Frau Dr. Ioanna Trivaii, Frau Dr. Carol Stocking und Herrn Dr. rer. nat. Jean-Pierre David ermöglichten eine strukturierte Forschungsarbeit.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Hamburg, den 20.03.2025

14 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe, insbesondere ohne entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten, verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Das gilt insbesondere auch für alle Informationen aus Internetquellen.

Soweit beim Verfassen der Dissertation KI-basierte Tools („Chatbots“) verwendet wurden, versichere ich ausdrücklich, den daraus generierten Anteil deutlich kenntlich gemacht zu haben. Die „Stellungnahme des Präsidiums der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) zum Einfluss generativer Modelle für die Text- und Bilderstellung auf die Wissenschaften und das Förderhandeln der DFG“ aus September 2023 wurde dabei beachtet.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

20.03.2025

Datum



Unterschrift

15 Danksagung

Die vorliegende Promotionsarbeit, welche zugleich inspirierend und lehrreich war, stellt eine der herausforderndsten Tätigkeiten meiner bisherigen Karriere dar und wäre nicht ohne die Unterstützung sowie Beratung, welche ich in den letzten sieben Jahren erfahren habe, vollendet worden.

Ich möchte besonders Frau Dr. Ioanna Triviai für die animierende Idee dieser Arbeit inklusive damit verknüpfter Experimente, deren Interpretation sowie die Vermittlung ihres unglaublichen Wissens auf dem Gebiet der Hämatopoese danken. Sie war die treibende Kraft meiner praktischen Tätigkeit, die mich lehrte, meine Grenzen zu überwinden und den eigenen Horizont zu erweitern.

Darüber hinaus möchte ich Herrn Prof. Dr. Nicolaus Kröger für Möglichkeit der Aufnahme und vollständigen Durchführung des Projekts danken. Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. Heimo Ehmke danken, welcher am Ende dieser Arbeit die kommissarische Betreuung der Promotion übernahm.

Besonders möchte ich mich bei den wissenschaftlichen Supervisoren unseres wöchentlichen Labormeeetings der Forschungsgruppe Frau Dr. Ioanna Triviai, Frau Dr. Carol Stocking sowie Herrn Dr. rer. nat. Jean-Pierre David, die durch ihre konstruktive Kritik, Kreativität und stete Ermutigung das Projekt entschieden vorangetrieben haben, bedanken.

Die finanzielle Unterstützung während zwei Jahre meiner Forschungsarbeit, welche ich durch die Werner-Otto-Stiftung erlangte, stellte eine große Unterstützung für mich dar und habe ich sehr zu schätzen gewusst.

Ein großes Dankeschön möchte ich außerdem der Cytometry und Cell Sorting Core Facility sowie der UKE Microscopy Imaging Facility, und dabei besonders Herrn Antonio Virgilio Failla, für den technischen Support aussprechen.

Außerdem danke ich dem gesamten Laborteam der Forschungsgruppe für Stammzellbiologie, welche mir wertvolle Techniken und Fertigkeiten auf dem Gebiet der Grundlagenforschung lehrten und mir stets mit einem offenen Ohr zur Seite standen. Dabei möchte ich besonders Silke Zeschke, Matthias Schäfersküpper, Eleni Besiridou, Vera Köhl und Katharina Klüver erwähnen. Ebenso bedanke ich mich bei Michael Hahn von dem Institut für Osteologie und Biomechanik, welcher mir den Umgang mit einer Diamantensäge lehrte.

Nicht zuletzt möchte ich aber vor allem meiner Familie, meinen Freunden, insbesondere meiner besten Freundin, Luise Thiede, sowie meinem Freund, Thomas Wagner, danken, welche mich durch die Höhen und Tiefen dieser Arbeit begleitet haben. Ihre geduldige und moralische Unterstützung schenkte mir stets neue Motivation und Hoffnung zum Vollenden dieser Promotionsarbeit.