

Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Pathophysiologie der Blutbildung bei Patienten mit  
*Thrombocytopenia absent radii* (TAR)-Syndrom

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Martin Wannack

aus Görlitz

Gutachter: 1. PD Dr. rer. nat. Harald Schulze  
2. Prof. Dr. med. Karl Welte  
3. Prof. Dr. med. Holger Lode

Datum der Promotion: 09.09.2011

# INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	III
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	V
1. EINLEITUNG .....	7
1.1. Hämatopoese .....	7
1.1.1. Megakaryopoese und Thrombopoese.....	9
1.1.2. Thrombopoietin und sein Rezeptor c-Mpl .....	10
1.1.2.1. Der hämatopoetische Wachstumsfaktor TPO .....	10
1.1.2.2. Der Thrombopoietinrezeptor c-Mpl .....	11
1.1.2.3. TPO-abhängige Signaltransduktion in MK und Thrombozyten .....	12
1.2. Bone marrow failure Syndrome (BMFS).....	15
1.3. TAR – Syndrom .....	16
1.3.1. Symptome.....	17
1.3.2. Defekte Megakaryopoese und Thrombopoese .....	19
1.3.3. Genetische Ursachen .....	20
1.4. Zielsetzung der Arbeit .....	23
2. MATERIAL UND METHODEN .....	24
2.1. Material .....	24
2.1.1. Chemikalien .....	24
2.1.2. Antikörper .....	25
2.2. Häufig verwendete Lösungen.....	26
2.3. Verwendete Oligonukleotide und Zelllinien .....	26
2.3.1. Oligonukleotide.....	26
2.3.1.1. JAK2-Sequenzierungsprimer .....	26
2.3.1.2. Primer für Gene des Mikrodeletionsbereiches .....	27
2.3.2. Zelllinien .....	28
2.4. Biochemische Untersuchungen zur Signaltransduktion.....	29
2.4.1. Isolation und Stimulation von Thrombozyten.....	29
2.4.2. SDS - Gelelektrophorese .....	30
2.4.3. Immunoblotting.....	32
2.4.3.1. Immunologische Färbung.....	32
2.4.3.2. Mehrfaches Detektieren mit Antikörpern .....	33
2.5. Durchflusszytometrische Untersuchungen.....	33
2.5.1. Analyse der Oberflächenantigene auf Thrombozyten.....	33
2.6. Molekularbiologische Methoden.....	35
2.6.1. Isolation von RNA aus Blutzellen und Zelllinien .....	35
2.6.2. Amplifikation von cDNA mittels <i>Polymerase chain reaction</i> (PCR).....	35

2.6.2.1. Reverse Transkriptase Ansatz .....	35
2.6.2.2. PCR Ansatz .....	36
2.6.2.3. Detektion der amplifizierten DNA .....	36
2.7. Sequenzierung der amplifizierten JAK2-DNA .....	37
3. ERGEBNISSE .....	38
3.1. Charakterisierung der Patienten unserer Kohorte .....	38
3.2. Entwicklung der Thrombozytenwerte bei Patienten mit TAR-Syndrom.....	42
3.3. TPO-abhängiger Signalweg in Thrombozyten.....	46
3.4. JAK2 in Thrombozyten von Patienten mit TAR-S .....	49
3.4.1. Defektive JAK2-Phosphorylierung bei einer Patientin mit TAR-Syndrom.....	49
3.4.2. Keine Mutation im JAK2-Gen bei zwei Patientinnen mit TAR-Syndrom .....	50
3.5. JAK-STAT-Signalweg in Thrombozyten von zehn Patienten mit TAR-Syndrom.....	52
3.5.1. Patienten ohne induzierbares phospho-JAK2 .....	52
3.5.2. Patienten mit induzierbarem phospho-JAK2 .....	54
3.6. Korrelation zwischen Signaltransduktion, Alter und Thrombozytenwerte der Patienten..	57
3.7. Thrombozytenaktivierung ist bei Patienten mit TAR-Syndrom nicht beeinflusst.....	58
3.8. TPO-abhängiger Signalweg in Thrombozyten von Mikrodeletionsträgern.....	60
3.9. Keine verminderte RNA Expression der Gene des Mikrodeletionsbereiches .....	61
3.10. Blutwerte der roten Zellreihe sind bei Patienten mit TAR-Syndrom unauffällig.....	63
4. DISKUSSION .....	69
4.1. Defektive JAK2-Phosphorylierung bei pädiatrischen Patienten mit TAR-Syndrom.....	69
4.2. Potentielle Kandidatengene innerhalb des Mikrodeletionsbereiches 1q21.1 für das klinische Bild des TAR-Syndroms.....	73
4.3. Die Mikrodeletion 1q21.1 reicht nicht aus, um am TAR-S zu erkranken, ein „modifier“ oder „second hit“ wird benötigt .....	77
4.4. Zuordnung des TAR-Syndroms zu den BMFS .....	83
4.5. Ausblick .....	85
5. ZUSAMMENFASSUNG .....	87
LITERATUR.....	88
DANKSAGUNG.....	102
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	103
LEBENS LAUF .....	104

---

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADP	Adenosindiphosphat
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
ATP	Adenosintriphosphat
ATRUS	Amegakaryozytäre Thrombozytopenie mit radioulnärer Synostose
BSA	Bovines Serumalbumin
BMFS	<i>Bone marrow failure syndrome</i>
CAMT	Congenitale amegakaryozytäre Thrombozytopenie
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CMP	Gemeinsame myeloische Vorläuferzelle
EPO	Erythropoietin
FA	Fanconi Anämie
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FITC	Flouresceinisothiocyanat
FOG	<i>Friend of GATA</i>
g	Sedimentationskonstante
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GDP	Guanosindiphosphat
GMP	Granulozyten-Monozyten-Vorläuferzelle
HOS	Holt-Oram Syndrom
HOX	Homöobox-Gen
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
HTB	HEPES-Tyrodes Puffer
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
JAK	Januskinase
JH	JAK-Homologiedomäne
JHC	Juvenile Hämochromatose
LCL	Lymphoblastoide Zelllinie
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase

MCHC	Mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration
MCV	Mittleres korpuskuläres Volumen
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MEP	Megakaryozyten-Erythrozyten-Vorläuferzelle
MITF	<i>Microphthalmia associated transcription factor</i>
MK	Megakaryozyten
MPD	<i>Myeloproliferative Disorders</i>
NF-E2	<i>Nuclear factor-erythroid derived 2</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PIAS3	<i>Protein inhibitor of activated STAT3</i>
pJAK2	Phosphoryliertes JAK2
PRP	Plättchenreiches Plasma
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RS	Roberts Syndrom
RUNX	<i>Runt-related transcription factor</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SOCS	<i>Suppressor of cytokine signalling</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
SUMO	<i>small ubiquitin-like modifier</i>
TAL	<i>T-cell acute lymphocytic leukemia</i>
TAR	<i>Thrombocytopenia-absent radii</i>
TBS-T	<i>Tris buffered saline - Tween 20</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TPO	Thrombopoietin
TRAP	Thrombinrezeptor-Agonist-Peptid
v/v	<i>Volume / Volume</i>
w/v	<i>Weight / Volume</i>

# 1. EINLEITUNG

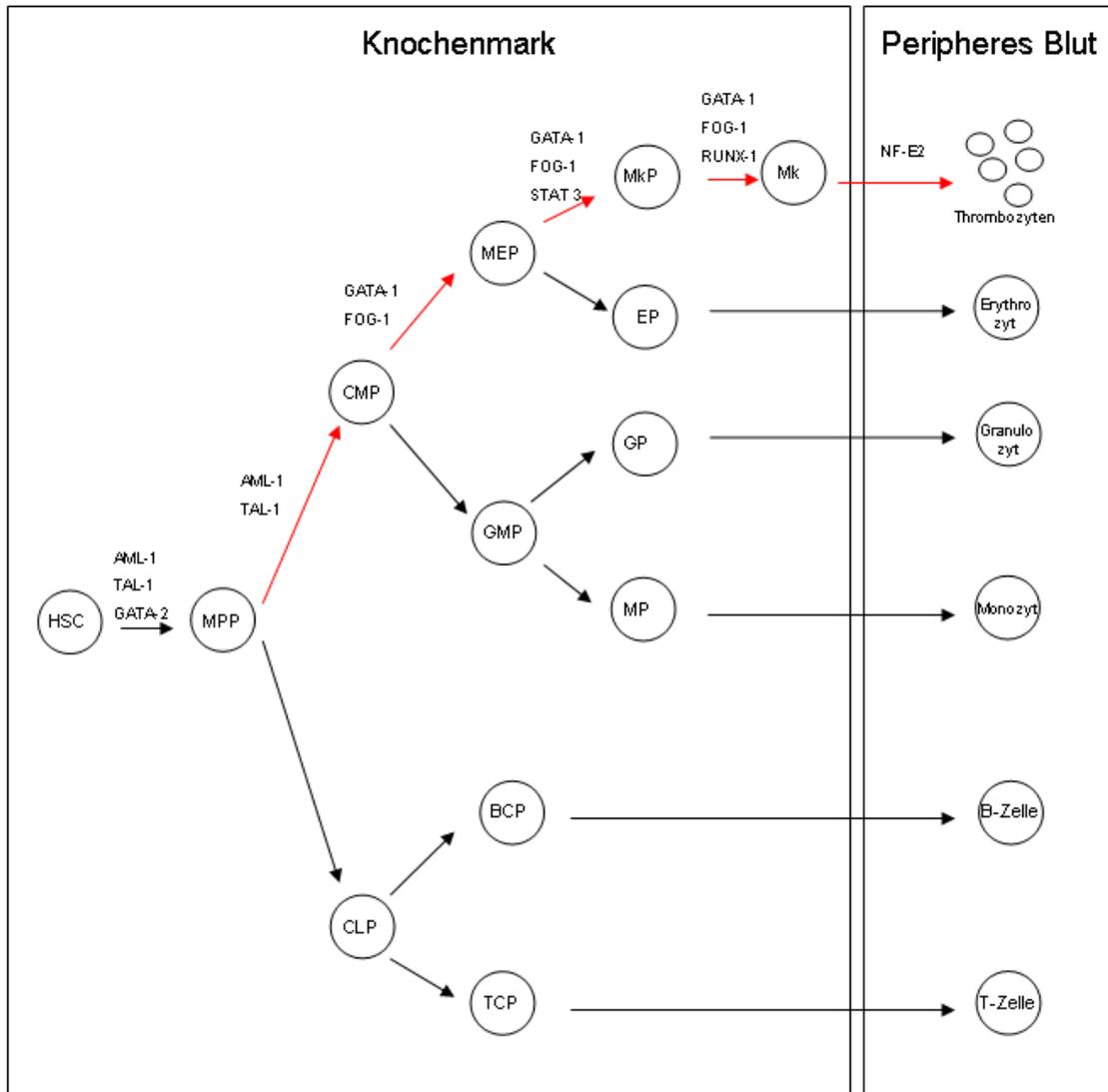
## 1.1. Hämatopoese

Hämatopoese bezeichnet die Bildung der Blutzellen. Während der Kindheit findet sie im Knochenmark des gesamten Skelettsystems statt. Im Erwachsenenalter ist die Blutbildung überwiegend auf flache Knochen wie z.B. Schädel, Becken und Wirbelkörper begrenzt.

Akashi und Weissman<sup>1</sup> gehen davon aus, dass alle Blutzellen aus pluripotenten Zellen des Knochenmarks, den sogenannten hämatopoetischen Stammzellen (HSC), entstehen und zu verschiedenen Blutzellen ausreifen (Abbildung 1). Grundlegend werden in der Hämatopoese die lymphoide und die myeloide Reihe unterschieden. Die Vorläufer der lymphoiden Reihe differenzieren unter anderem zu B- und T-Lymphozyten. Die gemeinsamen Vorläufer der myeloiden Reihe, *common myeloid progenitors (CMP)*, können weiter zu *granulocyte-monocyte progenitors (GMP)*, aus denen Monozyten oder Granulozyten differenzieren, oder zu *megakaryocyte-erythrocyte progenitors (MEP)* ausreifen, aus denen Erythrozyten oder Megakaryozyten (MK) differenzieren.

Die Ausreifung der Blutzellen erfordert eine Vielzahl von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren und Zytokinen. Diese regulieren die Bildung aller Blutzellen, können aber bei Bedarf z.B. bei Infektionen oder Blutungen Lymphozyten bzw. Erythrozyten verstärkt ausreifen. Zytokine werden hauptsächlich von T-Lymphozyten, Monozyten und Stromazellen gebildet und unterscheiden sich stark in ihrer Spezifität<sup>2-4</sup>: z.B. ist Interleukin (IL) IL-3 ein pleiotroper Faktor, der die Differenzierung von unreifen hämatopoetischen Vorläufern zu verschiedenen myeloiden Vorläufern (MEP, GMP) bewirken kann<sup>5</sup>. Thrombopoietin (TPO) hingegen ist der spezifische Regulator für die Ausreifung von MK und Thrombozyten (siehe Abschnitt 1.1.2.). Weitere Faktoren, die die Megakaryopoese induzieren, sind IL-3, IL-6, IL-11 und *leukemia inhibitory factor (LIF)*<sup>6</sup>. Einige Wachstumsfaktoren bewirken nicht nur die Reifung von Stammzellen und Vorläuferzellen, sondern aktivieren auch reife Blutzellen im peripheren Blut, so z.B. TPO<sup>7,8</sup>. Zytokine induzieren Hämatopoese durch z.B. Aktivierung und Expression diverser Transkriptionsfaktoren (TF). Abbildung 1 zeigt die für die Differenzierung hämatopoetischer Vorläufer zu MK und Thrombozyten benötigten TF. Diese sind unter anderem *acute myeloid leukemia (AML)-1* und *T-cell acute lymphocytic leukemia (TAL)-1*. GATA-1 und *friend of GATA (FOG)-1* sind TF, welche u.a. die Differenzierung von CMP zu MEP induzieren<sup>9-11</sup>. Ein weiterer TF, der die Megakaryopoese fördert, ist der *signal transducer and activator of transcription (STAT)3*<sup>12</sup>. *Runt-related transcription factor (RUNX)-1*, FOG-1 und GATA-1

induzieren die Differenzierung von megakaryozytären Vorläufern zu reifen MK, sind aber nicht ausreichend, um terminale MK zu Thrombozyten auszureifen, dazu wird *nuclear factor - erythroid derived 2* (NF-E2) benötigt<sup>10</sup>.

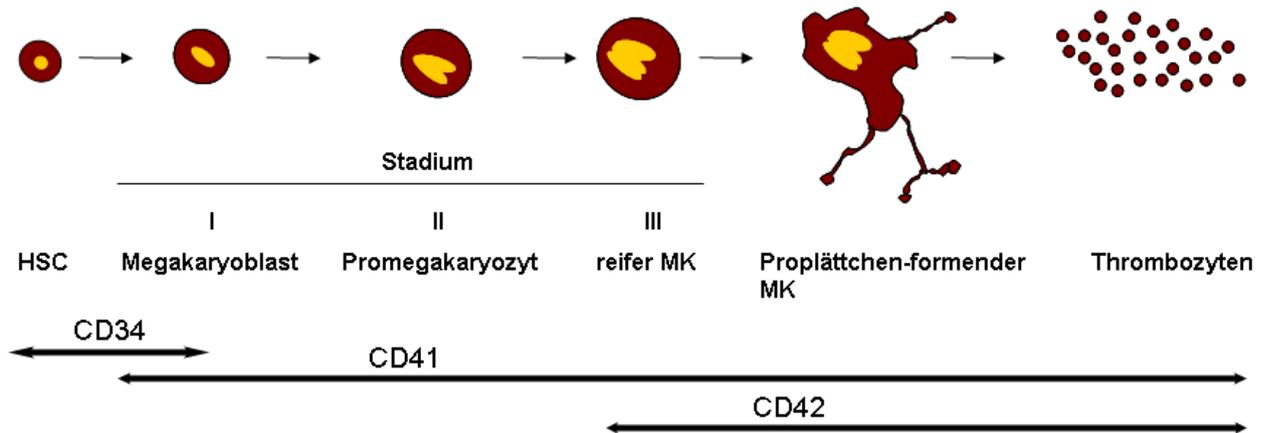


**Abbildung 1:** Modell der Hämatopoese nach Akashi und Weissman<sup>1</sup>. Alle Blutzellen entwickeln sich aus hämatopoetischen Stammzellen (**HSC**). **MPP** multipotenter Vorläufer, **CMP** gemeinsamer myeloider Vorläufer, **CLP** gemeinsamer lymphoider Vorläufer, **MEP** Megakaryozyten-Erythrozyten Vorläufer, **GMP** Granulozyten-Monozyten Vorläufer, **MkP** Megakaryozytenvorläufer, **EP** Erythrozytenvorläufer, **Mk** Megakaryozyt, **GP** Granulozytenvorläufer, **MP** Monozytenvorläufer, **BCP** B-Zellvorläufer, **TCP** T-Zellvorläufer. Die Kreise kennzeichnen experimentell identifizierte Differenzierungsstufen hämatopoetischer Vorläuferzellen. Die roten Pfeile stellen die Megakaryopoese bzw. Thrombopoese dar. Schwarze Pfeile stehen für die Differenzierung zu anderen reifen Blutzellen. Es wurden nur TF (AML-1, TAL-1, GATA-1, FOG-1, STAT3, RUNX-1 und NF-E2) der Megakaryopoese aufgeführt.

### 1.1.1. Megakaryopoese und Thrombopoese

Bei der Megakaryopoese reifen MEP zu MK aus. Dabei werden drei Stadien der Zellreifung unterschieden (Abbildung 2): Im ersten Stadium entstehen die unreifen Megakaryoblasten. Sie exprimieren bereits *cluster of differentiation* (CD) 41, die GP-IIb Untereinheit des für die megakaryozytäre Reihe spezifischen Fibrinogenrezeptors, auf ihrer Zelloberfläche. Megakaryoblasten proliferieren weniger und teilen sich hauptsächlich endomitotisch, sodass sie Ploiditätsgrade von bis zu 16N erreichen können<sup>13,14</sup>. Im zweiten Stadium der Megakaryopoese reifen die Megakaryoblasten zu Promegakaryozyten. Sie enthalten granuläre Strukturen, die im Golgi-Apparat entstehen<sup>15</sup>. Die Zellen des dritten Stadiums sind die reifen MK. Sie enthalten viele Granula und nur noch wenige Ribosomen. Reife MK exprimieren auf ihrer Zelloberfläche u.a. CD42b, die GP-Ib $\alpha$  Untereinheit des von-Willebrand-Rezeptors. Sie sind die Vorläuferzellen der Thrombozyten und im Knochenmark lokalisiert. Jeder MK setzt bis zu 1000 Thrombozyten ins periphere Blut frei. Diese kernlosen, diskoiden Zellfragmente mit einer Lebensdauer von 8-11 Tagen sind mit einer durchschnittlichen Größe von 2-3  $\mu\text{m}$  die kleinsten zellulären Bestandteile des Blutes.

Thrombozyten sind unerlässliche Bestandteile der primären Blutstillung, sie verhindern durch Aggregation den Austritt größerer Blutmengen aus dem Gefäßlumen. Thrombozyten besitzen drei Arten von Granula:  $\alpha$ -Granula,  $\delta$ -Granula (auch dichte Granula genannt) und Lysosomen. Die  $\alpha$ -Granula enthalten plättchenspezifische Proteine wie Plättchenfaktor-4, von-Willebrand-Faktor und Fibronectin, aber auch Gerinnungsfaktoren wie Fibrinogen. Außerdem beinhalten  $\alpha$ -Granula Proteine wie P-Selektin (CD62P), welches häufig zur Bestimmung der Aktivierbarkeit von Thrombozyten im peripheren Blut verwendet wird (Abschnitt 3.7. dieser Arbeit). Dichte Granula beinhalten neben Nukleotiden wie Adenosindiphosphat (ADP), Adenosintriphosphat (ATP) und Guanosin-Diphosphat (GDP) weiterhin Amine (Serotonin und Histamin) und divalente Kationen (Calcium und Magnesium). In den Lysosomen befinden sich Proteasen wie Cathepsine und Kollagenasen sowie Glykohydrolasen<sup>15,16</sup>.



**Abbildung 2:** Modell der Megakaryopoese und Thrombopoese. Aus einer hämatopoetischen Stammzelle (**HSC**) entsteht über verschiedene Zellreifungsstadien der proplättchenformende MK, welcher bis zu 1000 Thrombozyten freisetzt. CD34 wird nur auf HSC und sehr unreifen Vorläuferzellen exprimiert. CD41 wird bereits auf Megakaryoblasten, CD42 erst auf reifen MK exprimiert. CD41 und CD42 werden sowohl auf proplättchenformende MK als auch auf Thrombozyten exprimiert.

## 1.1.2. Thrombopoietin und sein Rezeptor c-Mpl

### 1.1.2.1. Der hämatopoetische Wachstumsfaktor TPO

TPO ist der spezifische Wachstumsfaktor für die Ausreifung hämatopoetischer Vorläufer zu MK und Thrombozyten. Es wirkt außerdem auf reife Thrombozyten des peripheren Blutes: TPO trägt synergistisch mit Agonisten wie ADP und Thrombinrezeptor-Agonist-Peptid (TRAP)-6 zur Aktivierung und Degranulierung von Thrombozyten bei<sup>17</sup>. Weiterhin induziert TPO mindestens drei intrazelluläre Signalkaskaden in MK und Thrombozyten (siehe Abschnitt 1.1.2.3.).

Vor der Identifizierung des für MK und Thrombozyten spezifischen Wachstumsfaktors TPO wurden als putative Wachstumsfaktoren die Interleukine IL-3 und IL-11, LIF und der Stammzellfaktor *c-Kit-Ligand* diskutiert. Jedoch führte im Mausmodell selbst die Gabe subtoxischer Mengen dieser Zytokine nicht zur Erhöhung der Thrombozytenzahl im peripheren Blut<sup>18</sup>. Für andere Blutzellreihen konnten zu dieser Zeit bereits kennzeichnende Zytokine nachgewiesen werden: z.B. Erythropoietin (EPO) für die erythroide Reihe und Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (G-CSF) für die Ausreifung von neutrophilen Granulozyten<sup>19,20</sup>.

Das TPO-Gen ist auf Chromosom 3q26-3q27 lokalisiert und besitzt 5 kodierende Exons, welche Sequenzhomologien zur genomischen Struktur von EPO aufweisen. Die TPO-DNA kodiert für ein 35 kDa großes Protein. TPO ist mit 300 Aminosäuren verhältnismäßig groß im Vergleich zu

anderen Zytokinen. Es induziert bei HSC und unreifen megakaryozytären Vorläufern die Differenzierung zu Thrombozyten<sup>21</sup>. TPO induziert ebenfalls die Endomitose und die Expression verschiedener Oberflächenantigene wie das Glykoprotein CD 41. TPO wird hauptsächlich konstitutiv in der Leber gebildet. Weitere Bildungsorgane sind Niere, glatte Gefäßmuskelzellen, Stromazellen und Milz, welche aber für den Gesamtspiegel von TPO eine untergeordnete Rolle spielen<sup>22,23</sup>. Die Regulation des TPO-Serumspiegels erfolgt hauptsächlich durch rezeptorvermittelte Endozytose und über die Anzahl der Thrombozyten im peripheren Blut<sup>24-26</sup>. Dabei haben Thrombozytenzahlen und TPO-Spiegel ein reziprokes Verhältnis: Sind wenige Thrombozyten im peripheren Blut, findet weniger rezeptorvermittelte Endozytose statt, sodass der TPO-Spiegel erhöht bleibt<sup>27</sup>.

#### 1.1.2.2. Der Thrombopoietinrezeptor c-Mpl

Der TPO-Rezeptor c-Mpl, das zelluläre Protoonkogen des myeloproliferativen Leukämie-Virus, kodiert für ein membranständiges Protein, das Homologien zu Proteinen der Zytokinrezeptor-Superfamilie aufweist, insbesondere zum G-CSF- und EPO-Rezeptor. Zytokinrezeptoren werden nach ihrer Struktur in 5 Gruppen eingeteilt: Interferon (IFN)-Familie, gp130-Familie, *Common  $\gamma$ -chain*-Familie, IL-3-Familie und *Single chain*-Familie. Mitglieder dieser Gruppen sind mit ihren Liganden in der Tabelle 1 zusammengefasst<sup>28</sup>.

Der c-Mpl Rezeptor wird auf hämatopoetischen Stammzellen, Megakaryozyten, Thrombozyten und Endothelzellen exprimiert. Das transmembrane Protein besteht aus insgesamt 635 Aminosäuren. Der extrazelluläre Bereich des Rezeptors umfasst 463 Aminosäuren und weist, wie sehr viele Zytokinrezeptoren, ein WSXWS-Motiv auf. Dieses Motiv wird als *cytokine-receptor homology* Domäne bezeichnet und ist an der Interaktion mit dem Liganden beteiligt<sup>29,30</sup>. Der intrazelluläre Bereich des Rezeptors besitzt zwei homologe Motive, box-1- und box-2-Motiv, die bei der intrazellulären Signaltransduktion und Interaktion mit Protein-Tyrosinkinasen wie die Januskinase (JAK) 2 und Src von Bedeutung sind<sup>31-33</sup>.

**Tabelle 1:** Zytokinrezeptorfamilien, dazugehörige Zytokine und die intrazellulär aktivierten Januskinasen

FAMILIE	ZYTOKINE	JANUSKINASEN	CHARAKTERISTIKA
IFN	IFN- $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ IL-10, IL-19, IL-20	JAK1, JAK2, TYK2	Beide Untereinheiten sind an Signaltransduktion beteiligt
gp130	IL-6, IL-11, IL-12 LIF, G-CSF Leptin	JAK1, JAK2, TYK2	Gemeinsame $\beta$ -Kette (gp130) und jeweils verschiedene $\alpha$ -Kette
<i>Common <math>\gamma</math>-chain</i>	IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15	JAK1, JAK3	Gemeinsame $\gamma$ -Kette, $\gamma$ - und $\beta$ - Untereinheiten sind an Signaltransduktion beteiligt
IL-3	IL-3, IL-5 GM-CSF	JAK2	Gemeinsame $\beta$ -Kette (gp140) und jeweils verschiedene $\alpha$ -Ketten
<i>Single chain</i>	EPO, <b>TPO</b> GH, Prolaktin	JAK2 TYK2	Einzelne Rezeptorketten bilden Homodimere nach Bindung an Liganden

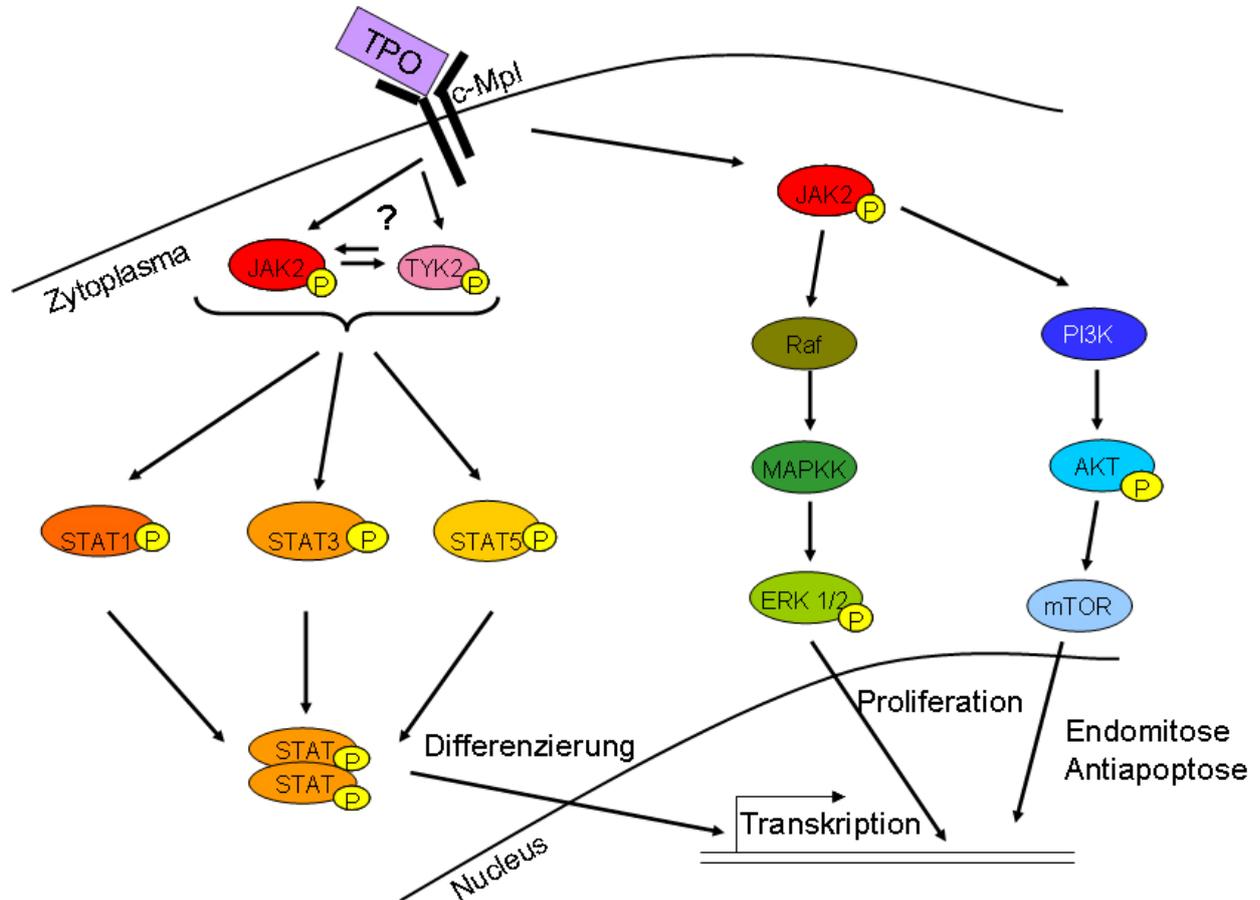
c-Mpl gehört zur *Single chain*-Rezeptorfamilie und weist starke strukturelle Homologien zum EPO-Rezeptor auf. Die Rezeptoren dieser Familie besitzen keine intrinsische Kinaseaktivität: Sie homodimerisieren nach Interaktion mit ihrem Liganden und induzieren mit Hilfe von Januskinasen intrazelluläre Signalkaskaden<sup>34,35</sup>. TPO aktiviert mindestens drei Signalwege in MK und Thrombozyten.

### 1.1.2.3. TPO-abhängige Signaltransduktion in MK und Thrombozyten

Nach Interaktion von TPO und seinem Rezeptor c-Mpl, werden der JAK-STAT-Signalweg, der *Mitogen-activated protein-kinase* (MAPK)-Signalweg und der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K)- Signalweg aktiviert (Abbildung 3)<sup>36-38</sup>. Der JAK-STAT-Signalweg induziert die Differenzierung zu MK. Guerriero *et al.*<sup>39</sup> konnten zeigen, dass der MAPK-Signalweg die Proliferation von MK fördert und der PI3K-Signalweg Endomitose induziert und Apoptose verhindert.

Nachdem TPO an seinen Rezeptor c-Mpl gebunden hat, bildet dieser mit einem weiteren c-Mpl Rezeptormolekül ein Homodimer. Dadurch kommt es zu Konformationsänderungen der c-Mpl Rezeptoren, sodass die an der zytoplasmatischen Seite gebundene Januskinase JAK2 trans- bzw. autophosphoryliert werden kann<sup>40,41</sup>. Das nun phosphorylierte JAK2 (pJAK2) phosphoryliert den Rezeptor und die Januskinase TYK2. JAK2 und TYK2 sind die einzigen der aus vier Mitgliedern

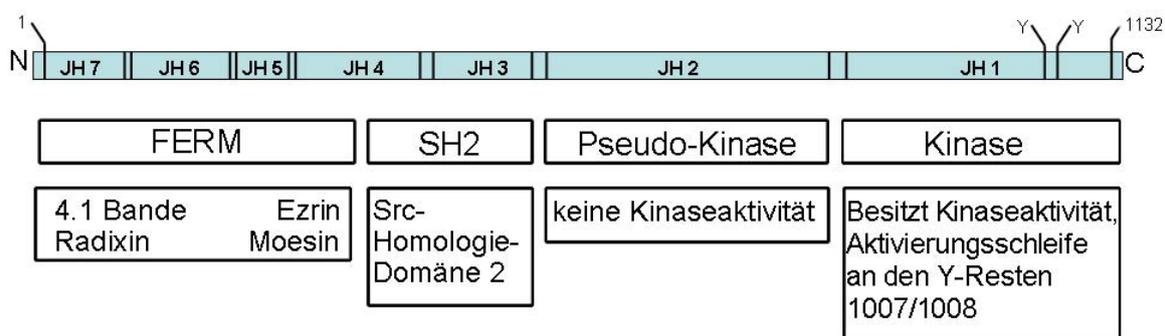
(JAK1-3 und TYK2) bestehenden Familie der Januskinasen, die in Thrombozyten phosphoryliert werden<sup>42</sup>. Lediglich die Phosphorylierung von JAK2 ist essentiell, um die Reifung in MK zu induzieren, phosphoryliertes TYK2 ist nicht notwendig<sup>43</sup>.



**Abbildung 3:** TPO-abhängige Signaltransduktion modifiziert nach Akkermann<sup>44</sup>. Die Januskinasen JAK2 und TYK2 werden TPO-abhängig phosphoryliert. Beim JAK-STAT-Signalweg wird die Transkription differenzierungsspezifischer Gene induziert. Phosphoryliertes JAK2 aktiviert zwei weitere TPO-abhängige Wege: Den MAPK-Signalweg und den PI3K-Signalweg. Beim MAPK-Signalweg werden proliferationspezifische Gene induziert. Beim PI3K-Signalweg wird die Transkription endomitosespezifischer bzw. antiapoptotischer Gene induziert. In Thrombozyten werden ebenfalls diese drei Signalwege TPO-abhängig aktiviert. Da Thrombozyten kernlose Zellen sind, findet keine Translokation aktivierter Substrate in den Nucleus statt.

Die Proteinstruktur der Januskinasen weist Homologien zu sieben bekannten Protein-Domänen auf (Abbildung 4)<sup>45,46</sup>: Die Janus Homologie-Domäne (JH)-1 ist die Kinasedomäne mit der für die Kinaseaktivität wichtigen „Aktivierungsschleife“ an den Tyrosinresten Y1007 / Y1008 bei JAK2 und Y1054/Y1055 bei TYK2<sup>40</sup>. Die JH2-Domäne ist die sogenannte Pseudokinasedomäne, welche Strukturhomologien zur JH1-Domäne besitzt, aber selbst keine Kinaseaktivität aufweist. JH2 wird als negativer Regulator der Kinasedomäne diskutiert<sup>47,48</sup>. Die JH3-Domäne und das C-terminale Ende der JH4-Domäne weisen gemeinsam Homologien zu

SH2-Domänen auf. Diese wurden ursprünglich im Src-Protein einer Rattensarkom-Zelllinie gefunden und dienen der Protein-Protein-Interaktion an Tyrosinphosphaten von aktivierten Signalmolekülen<sup>49,50</sup>. Das N-terminale Ende der JH4-Domäne und die Domänen JH5-JH7 haben Strukturhomologien mit der FERM-Domäne. Diese wurde ursprünglich in den Proteinen Four-point-one, Ezrin, Radixin und Moesin gefunden und nach ihnen benannt. Diese Proteine stabilisieren das Zytoskelett durch Verknüpfung der Zellmembran mit Aktinfilamenten über die FERM-Domäne<sup>51</sup>. Ihre Funktion bei Januskinasen ist die Interaktion mit Rezeptoren und negative Regulation auf deren Kinaseaktivität<sup>52,53</sup>.

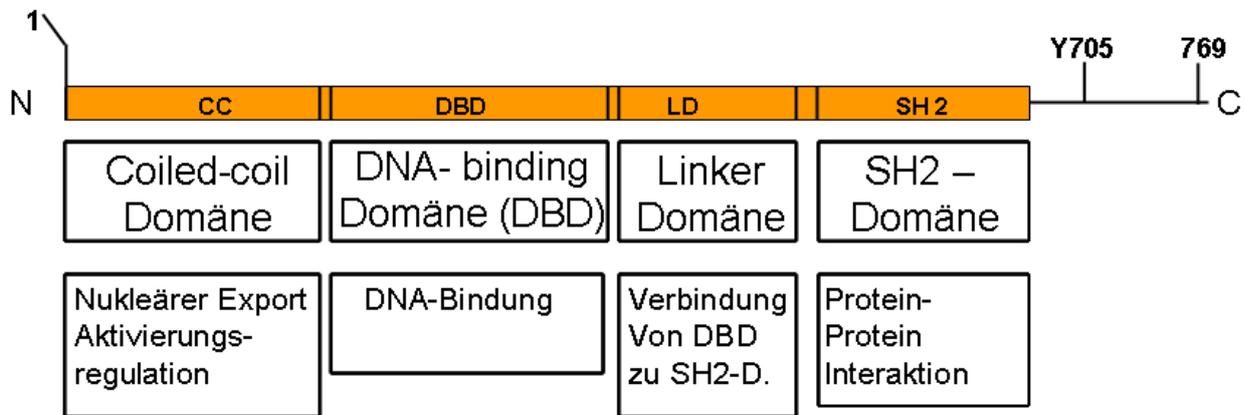


**Abbildung 4:** Darstellung der Domänenstruktur der Januskinase JAK2. Sie besteht aus einer Kinasedomäne (JH1), einer Pseudokinasedomäne ohne Kinaseaktivität (JH2), einer SH2-ähnlichen Domäne für Protein-Protein Interaktionen und einer FERM-Domäne für Rezeptorinteraktionen. C: Carboxy-Ende des JAK2-Proteins, N: Amino-Rest des JAK2-Proteins

Die Substrate der Januskinasen sind u.a. die STAT-Proteine. Deren Struktur ist in Abbildung 5 dargestellt. Die STAT-Familie besteht aus sieben Mitgliedern: STAT1, 2, 3, 4, 5a, 5b und 6<sup>54</sup>. Die Phosphorylierung von Tyrosinresten am C-Terminus der STAT-Proteine führt zu deren Bindung an SH2-Domänen von anderen STAT-Proteinen. Dadurch entstehen in Abhängigkeit von der Proteinexpression STAT-Homo- und Heterodimere. Durch Konformationsänderung der STAT-Proteine wird ein *nuclear localization signal* freigelegt. Die Dimere translozieren in den Nukleus und regulieren die Transkription durch Bindung an Promoterregionen von Zielgenen in der DNA. Obwohl Thrombozyten keinen Zellkern besitzen, konnte nachgewiesen werden, dass die drei oben genannten Signalwege auch in Thrombozyten aktiviert werden<sup>55,56</sup>.

Um eine fortwährende Aktivität dieser TF zu verhindern, unterliegen die Signalwege mehreren negativen Regulierungsmechanismen. In MK wird z.B. in einer negativen „Feedbackschleife“ durch aktivierte STAT-Dimere die Transkription von *suppressors of cytokine signalling* (SOCS)-Inhibitoren induziert, welches die Phosphorylierung weiterer JAK2 Proteine verhindern<sup>57</sup>. Ein

weiterer negativer Regulator ist der *protein inhibitor of activated STAT3* (PIAS3). Er verhindert die Bindung von aktivierten STAT3-Dimeren an DNA<sup>58</sup>. Negative Regulation des JAK-STAT-Signalweges wird im Abschnitt 4.3. dieser Arbeit diskutiert.



**Abbildung 5:** Darstellung der Proteindomänen von STAT3. Die STAT-Moleküle besitzen eine SH2-Domäne (**SH2-D.**), eine DNA-Bindende Domäne (**DBD**), eine Linker-Domäne, welche die SH2- und DNA-Bindende Domäne verbindet und eine Coiled-Coil-Domäne. Die Funktion der Domänen ist in den unteren Boxen angegeben. C: Carboxy-Ende des STAT3-Proteins, N: Amino-Rest des STAT3-Proteins

Differenzierung, Proliferation und Endomitose sind komplexe und hochsensitive biochemische Vorgänge in Zellen. Daher ist es leicht möglich, dass es durch fehlerhafte Regulation oder durch Mutationen zum Ausfall einer oder mehrerer dieser Vorgänge kommen kann. So führen bestimmte Mutationen im Thrombopoietinrezeptor c-Mpl zum Krankheitsbild der congenitalen amegakaryozytären Thrombozytopenie (CAMT)<sup>59,60</sup>. Die CAMT gehört zu den *bone marrow failure syndromes* (BMFS), welche im folgenden Abschnitt beschrieben werden.

## 1.2. Bone marrow failure Syndrome (BMFS)

*Bone marrow failure* Syndrome (BMFS) sind seltene angeborene Erkrankungen, die durch ein zunehmendes Knochenmarkversagen gekennzeichnet sind. BMFS werden in Panzytopenien, bei denen alle 3 Zellreihen der Blutbildung betroffen sind, und Zytopenien, bei denen nur eine Zellreihe (*single cytopenias*) betroffen ist, eingeteilt (Tabelle 2)<sup>61</sup>. Die Panzytopenien, zu denen die Fanconi Anämie (FA), die Dyskeratosis congenita, das Shwachman-Diamond-Syndrom und die CAMT gehören, kann es über eine aplastische Anämie zu einem myelodysplastischen Syndrom (MDS) kommen<sup>62</sup>. Die *single cytopenias*, zu denen das Diamond-Blackfan-Syndrom, die schwere congenitale Neutropenie und das TAR-Syndrom gehören, entwickeln seltener eine

aplastische Anämie<sup>62,63</sup>. Die genetischen Grundlagen für BMFS sind noch nicht vollständig verstanden, in den letzten Jahren konnten aber beteiligte Gene für die meisten der BMFS gefunden werden (Tabelle 2)<sup>64</sup>. Häufig sind die BMFS mit skeletalen Malformationen assoziiert, einzige Ausnahmen sind Patienten mit CAMT oder schwerer congenitaler Neutropenie.

**Tabelle 2:** Bone marrow failure syndromes

	HÄUF.	GENE	Ver.	Diagnostik	AA	SM
<b>PANZYTOPENIEN</b>						
Fanconi Anämie	> 1850	FANC A-J	AR	Chromosomenbrüche	x	x
Dyskeratosis congenita	425	Dyskerin	XLR	Telomerlänge	x	x
Shwachman-Diamond Syndrom	500	SBDS	AR	Pankreasinsuffizienz	x	x
CAMT	100	MPL	AR	Fehlende MK im KM	x	-
<b>SINGLE CYTOPENIAS</b>						
Diamond-Blackfan-Syndrom	825	RPS 5/8	AD	Adenosindeaminase in Erythrozyten	* <sup>2</sup>	x
Schwere congenitale Neutropenie	374	diverse * <sup>1</sup>	AD	Promyelozytenarrest im Knochenmark	-	-
TAR-Syndrom	280	1q21.1	dig.	Fehlende MK im KM und bilat. Radiusaplasie	-	x

**HÄUF.:** Anzahl der in der Literatur beschriebenen Patienten<sup>63</sup>, **Gene:** beteiligte Gene, **Ver.:** Vererbungsmechanismus, **AA:** Entwicklung einer aplastischen Anämie bzw. einer myelodysplastischen Veränderung, **SM:** skeletale Malformationen, **x:** vorhanden, **-:** nicht vorhanden \*<sup>1</sup> u.a. ELA 2, G-CSF-Rezeptor, HAX-1 \*<sup>2</sup>: Aplastische Anämie entsteht beim Diamond-Blackfan-Syndrom sehr selten; **AR:** autosomal rezessiv, **XLR:** *X-chromosomal liked rezessive*, **AD:** autosomal dominant, **dig.:** digenetisch

### 1.3. TAR – Syndrom

Das *Thrombocytopenia Absent Radii* (TAR)-Syndroms ist gekennzeichnet durch Thrombozytopenie und Aplasie der Radiusknochen. Bei Geburt kann die Thrombozytopenie sehr ausgeprägt sein mit Thrombozytenwerten von 5 - 100 / nL<sup>65,66</sup>. In den ersten Lebensjahren kann die Blutungstendenz deutlich erhöht sein<sup>65-67</sup>. Das TAR-Syndrom ist mit einer Inzidenz von 1-2:1000000 Lebendgeburten eine seltene angeborene Erkrankung. Mädchen erkranken mehr als doppelt so häufig am TAR-Syndrom wie Jungen<sup>65,66,68,69</sup>. Konsanguinität kommt bei den Eltern von Patienten mit TAR-Syndrom nur sehr selten vor<sup>68,70</sup>. Ward *et al.*<sup>71</sup> und Schnur *et al.*<sup>72</sup> haben vertikale Transmission des TAR-Syndroms bei einer Mutter und ihrem Kind sowie bei einem Onkel und seinem Neffen beschrieben.



**Abbildung 6:** Foto der Patientin 32-TAR. Die Patientin ist zum Zeitpunkt der Aufnahme fünf Monate alt. Sie hat verkürzte Unterarme aufgrund der fehlenden Radien auf beiden Seiten. Zusätzlich weist sie eine Hüftdysplasie auf, sodass beide Beine übermäßig stark außenrotiert und flektiert sind.

### 1.3.1. Symptome

Die Hauptmerkmale des TAR-Syndroms, Thrombozytopenie und beidseitige Radiusaplasie, wurden erstmals 1929 von Greenwald *et al.* beschrieben<sup>73</sup>. Judith Hall fasste diese Symptome als *Thrombocytopenia-Absent Radii* (TAR)-Syndrom zusammen<sup>65</sup>. Inzwischen sind in der Literatur über 300 Fälle beschrieben, es ist jedoch von deutlich mehr Patienten auszugehen. Zu den wichtigen Differentialdiagnosen (Tabelle 3) gehört die FA (siehe 1.2.), bei der einige Betroffene ebenfalls eine Radiusaplasie haben können. Ein wichtiger Unterschied zum TAR-Syndrom besteht darin, dass Patienten mit FA meist bei Geburt nur geringe Blutbildungsänderungen haben und neben der Radiusaplasie die Daumen betroffen sind<sup>74,75</sup>. Eine andere Differentialdiagnose ist das *Amegakaryocytic Thrombocytopenia With Radioulnar Synostosis* (ATRUS)-Syndrom: Patienten mit dieser Erkrankung haben eine radioulnäre Synostose mit bei Geburt bereits bestehender amegakaryozytärer Thrombozytopenie. Thompson und Nguyen<sup>76</sup> haben gezeigt, dass die Ursache dieses Syndroms auf eine Mutation im HOXA11-Gen zurückzuführen ist. Das Roberts-Syndrom (RS) sollte ebenfalls vom TAR-Syndrom abgegrenzt werden. Patienten mit RS haben Verkürzungen aller vier Extremitäten (Tetraphocomelie) und häufig kraniofaziale Deformitäten, wie Lippe-Kiefer-Gaumen-Spalte<sup>77,78</sup>. Eine weitere Differentialdiagnose des TAR-Syndroms ist das Holt-Oram-Syndrom (HOS), bei dem ursächlich

eine Mutation im Tbx5-Gen zugrunde liegt (siehe auch 4.3.)<sup>79</sup>. Patienten mit HOS haben häufig radiale Defekte und angeborene Herzfehler<sup>80</sup>.

**Tabelle 3:** Differentialdiagnosen des TAR-Syndroms

DD	HÄUFIGKEIT	HÄMATOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN	SKELETALE MALFORMATIONEN
FA	> 1850 <sup>63</sup>	Panzytopenie, MDS, Leukämie	gelegentl. Radiusaplasie mit Daumenhypoplasie, Hüftdislokation
ATRUS	11 <sup>76,81-83</sup>	amegakaryozytäre Thrombozytopenie, aplastische Anämie	Synostose von Radius und Ulna
RS	150 <sup>84</sup>	keine	Tetraphocomelie, kraniofaziale Deformitäten
HOS	1:100000 Lebendgeburten <sup>85</sup>	keine	radiale Defekte
CAMT	100 <sup>63</sup>	amegakaryozytäre Thrombozytopenie, aplastische Anämie	keine

**DD:** Differentialdiagnosen des TAR-Syndroms, **FA:** Fanconi Anämie, **ATRUS:** amegakaryozytäre Thrombozytopenie mit radioulnärer Synostose, **RS:** Roberts-Syndrom, **HOS:** Holt-Oram-Syndrom, **CAMT:** congenitale amegakaryozytäre Thrombozytopenie, **MDS:** myelodysplastisches Syndrom

In der Literatur wird beschrieben, dass das Ausmaß der Thrombozytopenie bei Patienten mit TAR-Syndrom nach den ersten beiden Lebensjahren abnimmt<sup>65,67</sup>. Neben der Thrombozytopenie sind bei einigen Patienten mit TAR-Syndrom weitere hämatologische Veränderungen beschrieben, wie z.B. eine bei Geburt bestehende Leukozytose und Eosinophilie<sup>65,67</sup>. Auch Anämien wurden bei einigen Patienten beschrieben, jedoch konnte bislang nicht sicher geklärt werden, ob die Anämien primärer Genese sind oder infolge von Blutungen auftreten. Beim TAR-Syndrom gibt es vier Fallberichte, bei denen Patienten akute Leukämie entwickelt haben: ein Patient mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) und drei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML)<sup>86-89</sup>.

Neben der Radiusaplasie werden bei Patienten mit TAR-Syndrom weitere skeletale Fehlbildungen und Anomalien beschrieben. Dazu gehören die sehr häufig auftretende Ulnahypoplasie, Humerushypoplasie und bei einigen Patienten auch eine Phocomelie<sup>90</sup>. In wenigen Fällen ist sogar eine Tetraphocomelie beschrieben worden, bei diesen Patienten sind die

unteren Extremitäten ebenfalls betroffen<sup>91-93</sup>. Als Differentialdiagnose kommt bei diesen Patienten auch das RS in Frage (Tabelle 3).

In manchen Fällen haben Patienten mit TAR-Syndrom Coxa vara und Klumpfüße<sup>94</sup>. Beim TAR-Syndrom können zudem angeborene Herzfehler wie Septumdefekte auftreten, die jedoch in unserer Patientenkohorte nur sehr selten gefunden worden sind (siehe 3.1., Tabelle 2)<sup>67,95</sup>. Bei mehr als der Hälfte der Patienten wurde zusätzlich Laktoseintoleranz diagnostiziert<sup>66,96</sup>.

Pränataldiagnostik für das TAR-Syndrom ist mittels Sonographie und Nabelschnurpunktion möglich<sup>97,98</sup>. Nachteil der Ultraschalldiagnostik ist die geringe Sensitivität. Häufig wurden falsch positive Diagnosen gestellt, weil die Unterarme und Hände der Feten nicht ausreichend darstellbar waren<sup>99</sup>. Die Nabelschnurpunktion dient der Feststellung einer Thrombozytopenie des Fetus. Ein Vorteil der Pränataldiagnostik ist, dass bei festgestellter schwerer Thrombozytopenie bereits intrauterin Thrombozytenkonzentrate gegeben werden können<sup>98</sup>. Durch Nachweis der in Kapitel 1.5.3. beschriebenen Mikrodeletion auf Chromosom 1q21.1 bei Patienten mit TAR-Syndrom, könnte eine pränatale Mutationsanalyse des fetalen Genoms weiteren Aufschluss über das mögliche Vorhandensein der Erkrankung geben, und somit weitere Schritte wie z.B. genetische Beratung durchgeführt werden<sup>94</sup>.

Bislang waren die therapeutischen Interventionen der Thrombozytopenie beim TAR-Syndrom nur für kurze Zeit erfolgreich: Die Therapie mit rekombinantem humanem Erythropoietin zeigte in Studien nur einen kurzzeitigen Anstieg der Thrombozytenzahlen und war somit für eine Langzeittherapie ungeeignet<sup>100</sup>. Studien zur Therapie mit Thrombozytenkonzentraten und begleitender IL-6 Therapie, einem proinflammatorischen Zytokin, welches Megakaryozyten und Thrombozyten ebenfalls aktivieren kann, zeigten zwar einen TK unabhängigen Anstieg der Thrombozyten, aber auch erhebliche Nebenwirkungen wie Fieber und Anämie<sup>101</sup>.

### 1.3.2. Defekte Megakaryopoese und Thrombopoese

Die wenigen Untersuchungen von Knochenmark an Patienten mit TAR-Syndrom zeigten in der Vergangenheit uneinheitliche Ergebnisse: Einige Forschungsgruppen gehen davon aus, dass der Thrombozytopenie beim TAR-Syndrom eine reduzierte Zahl an MK zugrunde liegt<sup>102,103</sup>. Homans *et al.*<sup>104</sup> fanden heraus, dass die MK-Kolonien in klonogenen Stammzellassays von Patienten mit TAR-Syndrom eine erhöhte Zellzahl, aber eine verminderte Größe aufweisen. Letestu *et al.*<sup>105</sup> konnten nachweisen, dass bei Patienten mit TAR-Syndrom ein

Differenzierungsstopp in der Megakaryopoese auf Ebene der CD41+/CD42- Zellen vorliegt (Vergleiche dazu Abbildung 2).

Die Plasmaspiegel von TPO und IL-11 sind bei Patienten mit TAR-Syndrom erhöht, jedoch weniger stark als bei Patienten mit CAMT<sup>7,103,104,106</sup>. Mit Hilfe von biologischen Assays konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit TAR-Syndrom der hämatologische Wachstumsfaktor TPO nicht funktionell beeinträchtigt ist<sup>7,59</sup>. Bekannt ist jedoch, dass TPO in Thrombozyten von Patienten mit TAR-Syndrom die Tyrosinphosphorylierung verschiedener Proteine intrazellulärer Signalkaskaden nur sehr wenig bis gar nicht induziert<sup>7,107</sup>. Ballmaier *et al.*<sup>108</sup> konnten zeigen, dass die Phosphorylierung der Januskinase JAK2, die die wichtigste Kinase der beschriebenen Signalwege in Thrombozyten ist, bei einem Patienten mit TAR-Syndrom ausbleibt. Es ist jedoch noch nicht geklärt, ob diese Kinase bei Patienten mit TAR-Syndrom mutiert ist und ob die Substrate der Januskinasen phosphoryliert und aktiviert werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass die ADP-Stimulation von Thrombozyten bei Patienten keinen Synergismus mit einer TPO-abhängigen Aktivierung aufweist<sup>7</sup>.

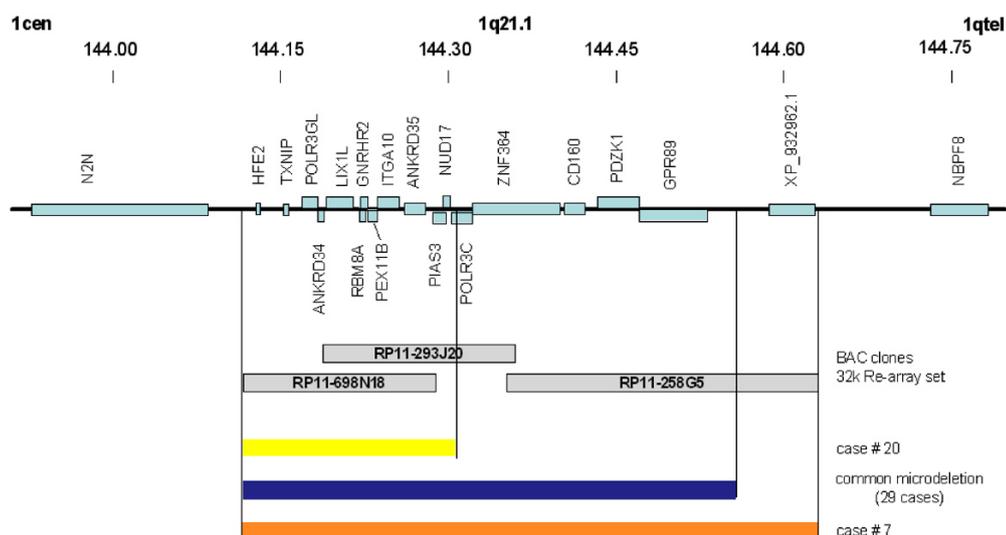
### 1.3.3. Genetische Ursachen

Beim TAR-Syndrom liegt eine Störung in der Hämatopoese und der Osteogenese vor. In beiden Reifungsprozessen werden Gene der Homöobox Familie (HOX) exprimiert<sup>109</sup>. Die Hauptaufgabe der HOX-Gene ist die gerichtete Ausreifung der Extremitäten während der Embryogenese bzw. Ontogenese. In Tiermodellen wurden Veränderungen der Blutzellcharakteristika und leukämoide Transformationen bei HOX-Defizienz oder -Dysregulierung beschrieben, welche im Abschnitt 4.3. als mögliche Ursache des TAR-Syndroms ausführlich diskutiert werden<sup>110</sup>. Fleischmann *et al.*<sup>111</sup> konnten nachweisen, dass bei Patienten mit TAR-Syndrom in den HOX-Genen HOXA10, welches vermehrt in HSC exprimiert ist, HOXA11, welches bei Patienten mit Thrombozytopenie und assoziierter radioulnärer Synostose (ATRUS-Syndrom) mutiert ist, und HOXD11 keine Mutation in den Protein-kodierenden Sequenzen vorliegt. Es wurde aber bislang nicht untersucht, ob intronische Mutationen der HOX-Gene oder Mutationen der HOX-Zielgene vorliegen<sup>111</sup>.

Bei funktionalem und im Plasma erhöhtem TPO-Spiegel, verminderter Megakaryozytenzahl im Knochenmark und verminderter Thrombozytenzahl im peripheren Blut lag der Verdacht eines Defektes im TPO-Rezeptor nahe: Mutationen im c-Mpl-Gen wurden bei Patienten mit CAMT gefunden, bei Patienten mit TAR-Syndrom ist der Rezeptor jedoch nicht mutiert<sup>59,112</sup>.

Unsere Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass bei Patienten mit TAR-Syndrom eine Mikrodeletion auf Chromosom 1q21.1 vorliegt<sup>94</sup>. Diese Deletion umfasst einen zentromer-nahen Bereich von ca. 200 kb auf Chromosom 1, in der bei der minimalen Form 12 annotierte Gene deletiert sind (Abbildung 7). Die Mutation wurde bei allen 30 untersuchten Patienten nachgewiesen. In 75% der Fälle wurde die Mikrodeletion auch bei einem Elternteil gefunden. Da auch die Eltern, die Träger der Mikrodeletion sind, nicht am TAR-Syndrom erkrankt sind, ist davon auszugehen, dass die Mikrodeletion zwar notwendig, aber nicht hinreichend für die Entstehung des TAR-Syndroms ist. Dies bedeutet, dass es einen zweiten Faktor, einen so genannten *TAR-modifier* geben muss, der entweder *de novo* entsteht oder vom anderen Elternteil vererbt wird, damit es zur Ausprägung des TAR-Syndroms kommt<sup>94</sup> (siehe 4.3.).

Abbildung 7 zeigt die genomische Region des Mikrodeletionsbereiches auf Chromosom 1q21.1. Dieser Bereich umfasst 12 annotierte Gene. Unter diesen Genen befindet sich auch das im Abschnitt 1.3.3. bereits vorgestellte PIAS3, ein negativer Regulator des JAK-STAT-Signalweges<sup>58</sup>. Ein weiteres Gen innerhalb des Deletionsbereiches, welches für das klinische Bild des TAR-Syndroms von Bedeutung sein könnte, ist HFE2. Es kodiert für das Protein Hämajuvelin, welches ein positiver Regulator des Eisensensors Hepcidin ist. So könnte sich die bei Patienten mit TAR-Syndrom häufig beschriebene Anämie (siehe 1.3.1.) durch die Haploinsuffizienz des HFE2-Gens erklären lassen. Der mögliche Einfluss der Mikrodeletion auf das klinische Bild des TAR-Syndroms wird im Abschnitt 4.2. ausführlich diskutiert.



**Abbildung 7:** Schematische Darstellung der genomischen Region auf Chromosom 1q21.1, die bei Patienten mit TAR-Syndrom deletiert ist. Diese Abbildung ist der Publikation von Klopocki *et al.*<sup>94</sup> entnommen. Der Mikrodeletionsbereich umfasst in der minimal deletierten Region (MDR) bei *case#20* 12 Gene.

Trotz der intensiven Forschung einiger Gruppen in den vergangenen Jahren ist nach wie vor nur sehr wenig über die molekulare Ursache des TAR-Syndroms bekannt: Es ist zwar bei allen untersuchten Patienten mit TAR-Syndrom eine Mikrodeletion gefunden worden, aber es ist nicht geklärt, ob, und wenn ja, welchen Einfluss die Mikrodeletion, insbesondere die Gene PIAS3 und HFE2, auf das klinische Bild des TAR-Syndroms hat<sup>94</sup>. Weiterhin ist unklar, warum bei Patienten mit TAR-Syndrom trotz intaktem und biologisch aktivem TPO die Januskinase JAK2 und damit viele Effektorproteine im Signalweg nicht phosphoryliert werden<sup>108</sup>.

#### 1.4. Zielsetzung der Arbeit

Patienten mit TAR-Syndrom sind durch beidseitige Radiusaplasie und Thrombozytopenie mit verstärkter Blutungsneigung charakterisiert. Langzeitbeobachtungen, die eine Besserung der Thrombozytenwerte nach den ersten Lebensjahren beschreiben, wurden nur für kurze Zeiträume durchgeführt<sup>65,67</sup>. Ballmaier *et al.*<sup>108</sup> konnten zeigen, dass die Kinase JAK2 in Thrombozyten von einem Patienten mit TAR-Syndrom nach TPO-Stimulation nicht phosphoryliert wird. Mittels hochauflösender DNA-Mikroaberrationstechnologie konnte bei 30 Patienten eine ca. 200 kb umfassende Mikrodeletion auf Chromosom 1q21.1 nachgewiesen werden. Bei 75% dieser Patienten wurde sie von einem nicht betroffenen Elternteil vererbt<sup>94</sup>.

In der vorliegenden Arbeit sollen folgende fünf Punkte zur weiteren Charakterisierung von Ursache und Ausprägung der Thrombozytopenie bei Patienten mit TAR-Syndrom bearbeitet werden:

1. Es soll gezeigt werden, inwieweit sich das Ausmaß der Thrombozytopenie in Abhängigkeit vom Lebensalter verändert und ob es prognostische Faktoren (z.B. Geschlecht, Vererbung der Mikrodeletion oder die Ausprägung skeletaler Malformationen) für den Schweregrad der Thrombozytopenie bei Patienten mit TAR-Syndrom gibt.
2. JAK2 ist die wichtigste bekannte Kinase im TPO-abhängigen Signalweg, die die Transkriptionsfaktoren STAT 1, 3, 5a und 5b aktiviert<sup>55</sup>. Daher soll die TPO-induzierte JAK2-Phosphorylierung in Thrombozyten von Kindern und Erwachsenen mit TAR-Syndrom altersabhängig miteinander verglichen werden.
3. Es soll untersucht werden, ob, und wenn ja, welche STAT-Proteine (sowie deren Kinetik und Ausmaß) in Thrombozyten phosphoryliert werden.
4. Der Mikrodeletionsbereich umfasst 12 annotierte Gene, darunter PIAS3, ein negativer Regulator des JAK-STAT-Signalweges. Um den Einfluss der Mikrodeletion auf die TPO-Signalkaskade zu untersuchen, sollen daher auch Thrombozyten von Mikrodeletionsträgern untersucht werden.
5. Patienten mit TAR-Syndrom zeigen in den ersten Lebensjahren neben der Thrombozytopenie häufig weitere Blutbildveränderungen, wie z.B. Anämie. Es soll gezeigt werden, inwieweit Hemizygotie des HFE2-Genes zu Veränderungen der Parameter der Erythrozyten (MCV, MCHC etc.) führt.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, von der Firma Sigma Aldrich, Carl Roth oder Merck im höchsten Reinheitsgrad bezogen.

ADP

Agarose Biozym

Aprotinin

Acetylsalicylsäure

Benzamidin

Bromphenolblau

BSA (Fraktion V)

*Enhanced chemoluminescence*-Detektionskit GE Healthcare

Ethanol absolut

Ethidiumbromid

HEPES

Leupeptin

Molekulargewichtsstandard (Page Ruler) Fermentas

Natriumchlorid (physiologische Lösung)

Natrium-EDTA

Natrium-EGTA

Natriumorthovanadat

Natriumstibogluconat Calbiochem

Pepstatin A

Phenylmethylsulfonylfluorid

Prostaglandin E1

Proteinbestimmungskit Biorad

rekombinant humanes TPO R & D Systems

Trizol Invitrogen

TEMED

TRAP-6	Bachem
Tris-Base	
Triton X-100	
Tween-20	Calbiochem
Zinkchlorid	

### 2.1.2. Antikörper

Alle Antikörper sind gegen humane Antigene gerichtet oder kreuzreagieren mit humanen Antigenen.

#### Immunoblot-Antikörper:

Kaninchen – $\alpha$ phosphoSTAT1	New England Biolabs
Kaninchen – $\alpha$ -JAK2 (Klon D2E12)	New England Biolabs
Kaninchen – $\alpha$ -phosphoJAK2	New England Biolabs
Kaninchen – $\alpha$ -phosphoSTAT3	New England Biolabs
Kaninchen – $\alpha$ -phosphoTYK2	New England Biolabs
Kaninchen – $\alpha$ -PIAS3	Abgent
Kaninchen – $\alpha$ -STAT1	Santa Cruz
Kaninchen – $\alpha$ -STAT3	New England Biolabs
Kaninchen – $\alpha$ -TYK2	New England Biolabs
Kaninchen– $\alpha$ -STAT5	Santa Cruz
Maus – $\alpha$ -GAPDH	Abcam
Maus – $\alpha$ -phosphoSTAT5	New England Biolabs
Maus – $\alpha$ -Tyrosinphosphat (Klon 4G10)	Millipore
Maus – $\alpha$ -Tyrosinphosphat (Klon PY99)	Santa Cruz
Ziege – $\alpha$ -PDZK1 (Klon L12)	Santa Cruz
Ziege – $\alpha$ -TXNIP (Klon D15)	Santa Cruz
Esel – $\alpha$ -Ziege Ig, HRP-konjugiert	Santa Cruz
Ziege – $\alpha$ -Kaninchen Ig, HRP-konjugiert	Santa Cruz
Ziege – $\alpha$ -Maus Ig, HRP-konjugiert	Santa Cruz

Durchflußzytometrie-Antikörper

Maus – $\alpha$ -CD36 FITC-konjugiert	BD Pharmigen
Maus – $\alpha$ -CD41a PE-konjugiert	BD Pharmigen
Maus – $\alpha$ -CD41b FITC-konjugiert	BD Pharmigen
Maus – $\alpha$ -CD42b FITC-konjugiert	BD Pharmigen
Maus – $\alpha$ -CD61 FITC-konjugiert	BD Pharmigen
Maus – $\alpha$ -CD62P FITC-konjugiert	BD Pharmigen
Maus – $\alpha$ -CD63 PE-konjugiert	BD Pharmigen
Maus – $\alpha$ -GP IIb / IIIa FITC-konjugiert	BD Pharmigen
Ratte – $\alpha$ Maus IgG1 $\kappa$ Isotyp FITC-konjugiert	BD Pharmigen
Ratte – $\alpha$ IgM Isotyp FITC-konjugiert	BD Pharmigen

**2.2. Häufig verwendete Lösungen**Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS)

15 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
85 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
100 mmol	NaCl

TBS-T

1 mM	Tris, pH 8,0
0,15 M	NaCl
0,1% (v/v)	Tween 20

**2.3. Verwendete Oligonukleotide und Zelllinien**

## 2.3.1. Oligonukleotide

## 2.3.1.1. JAK2-Sequenzierungsprimer

JAK2-1-sense	5'- GCG ACG GCA AAT GTT CTG AA -3'
JAK2-1-antisense	5'- GCC ACT GAG CAA AGA GGT AA -3'
JAK2-2-sense	5'- GTG CTG AAG CTC CTC TTC TT -3'

JAK2-2-antisense	5'- CCC TCT TGG TTT GCT TGC TT -3'
JAK2-3-sense	5'- CAG TGG TCA AGA GGG AAA CA- 3'
JAK2-3-antisense	5'- TGT CTG AGC GAA CAG TTTT CC- 3'
JAK2-4-sense	5'- CAA CCT CAG TGG GAC AAA GA- 3'
JAK2-4-antisense	5'- TTC TCG TCT CCA CAG ACA CA- 3'
JAK2-5-sense	5'- GAG CAA GCT TTC TCA CAA GC- 3'
JAK2-5-antisense	5'- AAT TCT GCC CAC TTT GGT GC- 3'
JAK2-6-sense	5'- TGC AGT GGA GGA GAT AAA CC- 3'
JAK2-6-antisense	5'- TTT AGA TTA CGC CGA CCA GC- 3'
JAK2-7-sense	5'- CCT GAA ATC CCT ACA GCA TG-3'
JAK2-7-antisense	5'- TCA TCC AGC CAT GTT ATC CC- 3'

#### 2.3.1.2. Primer für Gene des Mikrodeletionsbereiches

HFE2-sense	5'- GGA ATC ATG GCT GGA GAA TTG- 3'
HFE2-antisense	5'- ATG CCA TGT ACC GCC GAA TG- 3'
TXNIP-sense	5'- GGA GTG GCT AAA GTG CTT TG- 3'
TXNIP-antisense	5'- CTC ATC ACC TTC ACA GAA TC- 3'
POLR3GL-sense	5'- AGT TCC GCC CAG TAC CTT TG- 3'
POLR3GL-antisense	5'- ATG ACA TGA TGT AAT CAG TTT C- 3'
ANKRD34-sense	5'- AGA GGG CCT ACG GAG AAA TG- 3'
ANKRD34-antisense	5'- CTC CGC ACT TGG TGT GTT TG- 3'
LIX1L-sense	5'- AAG CAC ACG CAG GGC TAT G- 3'
LIX1L-antisense	5'- CTG GAA CTC CAA CAT TGA TTT G- 3'
GNRHR2-sense	5'- GGA CAC TGA TGT TCC TGA AAC- 3'
GNRHR2-antisense	5'- GAC GAA CAC GGG GAC AAT TG- 3'
RBM8A-sense	5'- CGG ATG CGT GAG GAT TAT G- 3'
RBM8A-antisense	5'- GAA GAG AAC ACC TGG ACA AC- 3'
PEX11B-sense	5'- CCA GTC CTG AGT TAC AGA AAC- 3'
PEX11B-antisense	5'- CTC CTC CTC CAG AAC CTT TC- 3'
ITGA10-sense	5'- AGC TTC CTG CAG CAC TAA AG- 3'
ITGA10-antisense	5'- GGC TGC ATG GTT CTG CAA TG- 3'
ANKRD35-sense	5'- GCT GAC ATG AAC AGC AAG AAT G- 3'
ANKRD35-antisense	5'- CTT GTG TGT GCA GAG CAT AG- 3'
PIAS3-sense	5'- TGT CAA GGT CAA TGG GAA AC- 3'

PIAS3-antisense	5'- CAT GTA GGC TTC TTC TCA TTC- 3'
NUDT17-sense	5'- CGA CAA GAC TGT CTT GCT AAC- 3'
NUDT17-antisense	5'- AGT GCT GAC TGT CTC TTT GTC- 3'
POLR3C-sense	5'- TGT CAG CTG TTG TGA AGA AAG- 3'
POLR3C-antisense	5'- TAG CAA CTG CGC TCA CAA TG- 3'
ZNF364-sense	5'- GAC CTC CAC GGT TGC CAT TG- 3'
ZNF364-antisense	5'- TTC TAG CCA CGG CAC AAT AC- 3'
Q9P145-sense	5'- CCA GTT CCA AAG CCC TTA AC- 3'
Q9P145-antisense	5'- CAT GTG GTT GTG GTC AGA TAG- 3'
CD160-sense	5'- CTG TAC TGT ATG GCA TAA GAA AG- 3'
CD160-antisense	5'- GAA CTC AAG GTG TTG TCT TTG- 3'
PDZK1-sense	5'- AAC ACG GGT GGA CTT GAA AG- 3'
PDZK1-antisense	5'- GCT GGT GGG GTA ACA GTT TC- 3'

### 2.3.2. Zelllinien

#### K562

Die K562 Zelllinie wurde im Jahr 1970 von pleuralen Auswürfen einer Patientin mit chronischer myeloischer Leukämie in einer akuten Blastenkrise generiert. Diese Erythroleukämiezellen (Leukämieklassifikation M6) sind Philadelphia-Chromosom positiv mit einem BCR-ABL b3-a2 Fusionsgen.

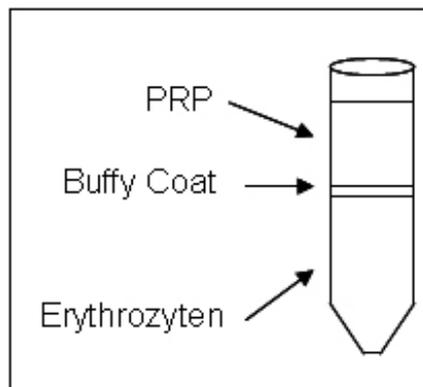
#### LCL

Lymphoblastoide Zelllinien (LCL) sind durch Epstein-Barr-Virus-Transformation generierte immortalisierte B-Lymphozyten. Sie können grundsätzlich von jedem Menschen mit B-Lymphozyten angelegt werden und repräsentieren dessen vorliegenden genetischen Status. In der vorliegenden Arbeit wurden die Zelllinien von drei Patienten mit TAR-Syndrom und deren Familien sowie von zwei Gesundspendern verwendet.

## 2.4. Biochemische Untersuchungen zur Signaltransduktion

### 2.4.1. Isolation und Stimulation von Thrombozyten

Die Isolation von Thrombozyten aus Vollblut und die Stimulation mit rekombinantem humanem TPO wurde weitgehend wie beschrieben durchgeführt<sup>107</sup>. Dem Probanden wird mit einer 21G-Kanüle Blut einer peripheren Vene in Citratmonovetten entnommen und diese werden für 20 Minuten bei 80 g ohne Bremse zentrifugiert. Das plättchenreiche Plasma (PRP) wird vorsichtig abgenommen, um Kontaminationen mit Erythrozyten und Leukozyten zu vermeiden.



**Abbildung 7:** Schematische Darstellung der Blutbestandteile nach Zentrifugation von Vollblut bei 80g für 20 min. Es sind drei Bestandteile zu unterscheiden: Plättchenreiches Plasma (PRP), Buffy Coat (angereicherte mononukleäre Zellen) und Erythrozyten.

Anschließend wird jeweils 1 ml PRP mit 161  $\mu\text{L}$  Acetylsalicylsäure maximaler Löslichkeit (2,5 g/l = final 2  $\mu\text{M}$ ) zur Verhinderung der Aggregation und Degranulation der Plättchen für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Unmittelbar nach Zugabe von 1  $\mu\text{L}$  Prostaglandin  $\text{E}_1$  (final 1  $\mu\text{M}$ ) pro mL PRP, werden die Thrombozyten für 10 min bei 200 g zu einem weichen Pellet zentrifugiert. Dieses wird in 1 Volumen HEPES-Tyrodes-Puffer (HTB) gewaschen und anschließend in 0,5 Volumen rekalkifiziertem (final 1mM  $\text{CaCl}_2$ ) HTB resuspendiert. In der finalen Suspension beträgt die Plättchenkonzentration  $1 \cdot 10^8$  bis  $1 \cdot 10^9$  / mL.

HEPES-Tyrodes-Puffer (MIYAKAWA, 1995)

10 mM	HEPES
129 mM	NaCl
8,9 mM	NaHCO <sub>3</sub>
0,8 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,8 mM	MgCl <sub>2</sub>
5,6 mM	Glucose
(1mM	CaCl <sub>2</sub> )

Die Stimulationsexperimente von Thrombozyten mit TPO werden unmittelbar nach der Resuspension durchgeführt. Dazu werden 100 µL Plättchensuspension mit TPO (30-50 ng/µL) für verschiedene Zeiten (0'-60') stimuliert. Die Stimulation wird durch Zugabe von einem Volumen 2x-Probenpuffer abgestoppt und die Probe anschließend für 5 min bei 95°C erhitzt.

2x-Probenpuffer (MIYAKAWA, 1996)

100 mM	Tris-HCl, pH 6,8
20% (v/v)	Glycerol
2 % (w/v)	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (SDS)
10% (v/v)	2-Mercaptoethanol
20 mM	EGTA
2 mM	Natriumvanadat
0,002% (w/v)	Bromphenolblau

## 2.4.2. SDS - Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der Proteine nach deren Molekulargewicht wird ein diskontinuierliches SDS-Polyacrylamid-Gelsystem (modifiziert nach Laemmli 1970) verwendet. Um Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 30 und 180 kDa aufzutrennen, werden 8 - 10 %ige Trenngele verwendet. Diese werden 9 cm breit und 1 mm dick gegossen, wobei die Trennphase 6 - 7 cm und die Sammelphase 1,5 - 2 cm lang ist.

Nach Entfernung des Kamms werden die Proben mit langen, gefilterten Spitzen in die Probenaschen pipettiert. Bis die Proben das Trenngel erreicht haben, wird eine konstante Stromstärke von 17 mA bei einer maximalen Spannung von 200 V angelegt. Zur Auftrennung der Proteine im Trenngel wird die Stromstärke auf 26 mA erhöht. Die Elektrophorese wird beendet, wenn die Bande des Frontmarkers Bromphenolblau den unteren Rand des Gels erreicht hat. Die Zuordnung der Molekulargewichte erfolgt durch die Verwendung von farbmarkierten Molekulargewichtsstandards (Fermentas PageRuler).

Die Proteine werden im Western Blot auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)- Membran transferiert und immobilisiert.

#### Trenngel (8%) – 5 mL

2,3 mL	H <sub>2</sub> O
1,3 mL	Acrylamid - Bisacrylamid - Gemisch (37,5:1)
1,3 mL	Tris-HCl, pH 8,8
0,1 mL	10 % SDS
0,05 mL	Ammoniumpersulfat
0,003 mL	Tetramethylethylendiamin (TEMED)

#### Sammelgel – 2 mL

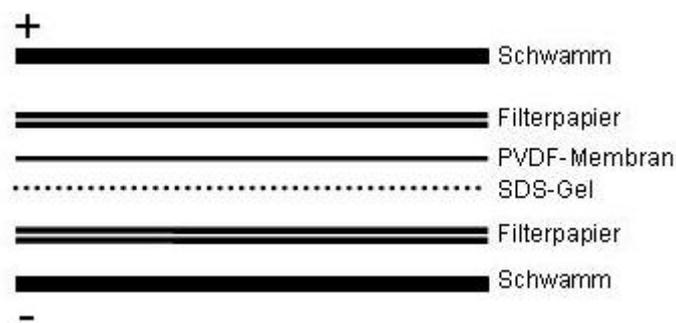
1,4 mL	H <sub>2</sub> O
0,33 mL	30% Acrylamid Mix
0,25 mL	Tris-HCl, pH 6,8
0,02 mL	SDS
0,02 mL	Ammoniumpersulfat
0,002 mL	TEMED

#### Elektrodenpuffer

25 mM	Tris-Base; pH 8,3 - 8,5
250 mM	Glycin
0,1 % (w/v)	SDS

### 2.4.3. Immunoblotting

Der Immunoblot erfolgt in einem *Tank-Blotting*-System der Firma BioRad. Whatman-Filterpapiere und PVDF-Membran werden auf die Größe des Polyacrylamidgels zugeschnitten und für jeweils eine Minute in Transferpuffer äquilibriert. Die Anordnung der einzelnen Komponenten ist in Abbildung 8 schematisch dargestellt. Es ist wichtig, Luftblasen zwischen den Komponenten des *Tank-Blotting*-Systems zu vermeiden, um eine gleichmäßige Übertragung der Proteine zu ermöglichen. Für das Western Blotting wird eine konstante Spannung von 100 V bei einer maximalen Stromstärke von 300 mA für 60 min angelegt.



**Abbildung 8:** Anordnung der Komponenten zum Immunoblotting in einem *Tank-Blotting*-System. Zwischen den Schwämmen befinden sich jeweils zwei Lagen Filterpapier, eine PVDF-Membran und das Acrylamid/Bisacrylamid-Gel, in dem die Proteine anhand ihres Molekulargewichtes aufgetrennt sind.

#### Transfer-Puffer

48 mM	Tris-Base; pH 8,9-9,3
39 mM	Glycin
20 % (v/v)	Methanol

#### 2.4.3.1. Immunologische Färbung

Nach der Übertragung der Proteine auf die PVDF-Membran wird diese für ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur in Blocking-Puffer (5% BSA oder 5% Milch in TBST) inkubiert, um unspezifische Bindungen zwischen Antikörper, unblockter Membran und Proteinen zu vermeiden. Die Membran wird im entsprechend verdünnten (1:100 bis 1:1000) primären Antikörper in einem Schwenkinkubator über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach mehrfachem, intensivem Waschen der Membran in TBS-T am nächsten Tag wird diese für ca. eine Stunde bei

Raumtemperatur im Meerrettichperoxidase-konjugierten sekundären Antikörper inkubiert und erneut mehrfach in TBS-T gewaschen.

Nach einminütiger Inkubation mit der Chemolumineszenzlösung *enhanced chemoluminescence* erfolgt die Detektion der Proteinbanden auf Röntgenfilmen der Firma Kodak für verschiedene Expositionszeiten zwischen 30 sec und 20 min.

#### 2.4.3.2. Mehrfaches Detektieren mit Antikörpern

Zur Detektion verschiedener Antikörper mit gleichem oder ähnlichem Molekulargewicht auf einer Membran müssen zunächst alle gebundenen Antikörper von dieser abgewaschen werden. Dazu wird die Membran für 15 min bei 45°C in Stripping-Puffer gewaschen und anschließend mehrfach mit TBS-T gewaschen. Um unspezifische Bindungen zwischen Antikörpern und Proteinen zu vermeiden, wird die Membran nach dem Strippen erneut in Blocking-Puffer inkubiert.

#### Stripping-Puffer:

100 mM	2-Mercaptoethanol
2% (w/v)	SDS
62,5 mM	Tris-HCl, pH 6,7

Nun kann eine erneute Detektion mit primären und sekundären Antikörpern erfolgen.

Ist die Detektion nicht unmittelbar nach dem Strippen möglich, wird die Membran mit PBS in Folie eingeschweißt und bei 4°C gelagert.

## **2.5. Durchflusszytometrische Untersuchungen**

### 2.5.1. Analyse der Oberflächenantigene auf Thrombozyten

Zur Bestimmung der exprimierten Oberflächenmoleküle auf der Thrombozytenmembran wird Vollblut verwendet, welches aus einer peripheren Hautvene entnommen wird. Thrombozyten sind mit ca. 2 - 3 µm die kleinsten zellulären Bestandteile des Blutes und damit auf Grund ihrer Lichtstreuungseigenschaften im Durchflußzytometer gut von den anderen Blutzellen abgrenzbar (Abbildung 9).



Antikörper für 20 - 25 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Schließlich wird dieser Vorgang mit 1 mL FACS-Puffer abgestoppt, bevor die Messung am FACScan erfolgt.

## 2.6. Molekularbiologische Methoden

### 2.6.1. Isolation von RNA aus Blutzellen und Zelllinien

Die RNA-Isolation aus lymphoblastoiden Zellen erfolgt mit Trizol nach einem modifizierten Protokoll von Chomczynski und Sacchi<sup>113</sup>. Ca.  $5 - 10 \cdot 10^6$  mononukleäre Zellen werden nach Zentrifugation mit 1 Volumen PBS gewaschen. Das Pellet wird in 1 mL Trizol aufgenommen und durch mehrmaliges Aufziehen in der Pipettenspitze homogen lysiert. Nach Zugabe von 200  $\mu$ L Chloroform wird das Lysat für ca. 5 min auf Eis inkubiert. Die Phasentrennung erfolgt durch Zentrifugation bei 4 °C und 12000 g für 20 min. Die obere, RNA-enhaltende, wässrige Phase wird in ein anderes Gefäß in 1 ml Isopropanol aufgenommen. Die RNA wird für 15 min auf Eis gefällt. Nach Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 12000 g wird das Pellet in 0,75 ml 70 %igen Ethanol aufgenommen und gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren für 10 min bei 4 °C und 12000 g wird das Pellet luftgetrocknet und anschließend je nach Pelletgröße in 10 - 15  $\mu$ l bidestilliertem Wasser aufgenommen. Die RNA-Konzentration wird photometrisch bei 260 nm bestimmt und auf 1  $\mu$ g/ $\mu$ L eingestellt. Anschließend wird die RNA direkt in cDNA umgeschrieben oder bei -20 °C gelagert.

### 2.6.2. Amplifikation von cDNA mittels *Polymerase chain reaction* (PCR)

Zur Bestimmung der Genexpression mittels semiquantitativer RT-PCR muss die aus den Zelllinien isolierte RNA zunächst in doppelsträngige cDNA umgeschrieben werden. Dies erfolgt mit Hilfe einer Reversen Transkriptase.

#### 2.6.2.1. Reverse Transkriptase Ansatz

1 $\mu$ L	RNA (Konzentration 1 $\mu$ g / $\mu$ L)
4 $\mu$ L	5X RT-PCR Puffer
1 $\mu$ L	Reverse Transkriptase Enzym (Firma iScript)
14 $\mu$ L	H <sub>2</sub> O

Der komplette Ansatz wird für kurze Zeit auf Eis gestellt und anschließend erfolgt die reverse Transkription nach Angaben des Herstellers iScript. Die entstandene cDNA wird entweder direkt in einer PCR eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

#### 2.6.2.2. PCR Ansatz

1µL	cDNA
0,5µL	Desoxyribonukleosidtriphosphat
2,5µL	10x PCR-Puffer – MgCl <sub>2</sub>
0,25µL	Taq Polymerase
1µL	Primer (jeweils 0,5 µL sense und antisense)
ad 25 µL	H <sub>2</sub> O

Der PCR-Ansatz wird zunächst für 5 min bei 95°C denaturiert. Anschließend folgen 30 – 36 Zyklen nach folgendem Protokoll:

30 sec	95°C
45 sec	56 – 60 °C
45 sec	72°C

Zum Abschluss wird der Ansatz für 5 min bei 72°C inkubiert, um eine vollständige Kettenverlängerung zu ermöglichen.

#### 2.6.2.3. Detektion der amplifizierten DNA

Der 25 µL PCR-Ansatz wird mit 2,77 µL eines 10x-PCR-Ladepuffers der Firma BioRad versetzt. 10µl dieses Ansatzes werden in eine Tasche eines bereits Ethidiumbromid enthaltenden 1,0 - 1,5 %igen Agarose-Gels pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung des PCR-Ansatzes erfolgt in Tris-EDTA-Puffer bei 130 V. Als Längenstandard dienen der 100 bzw. 1000 Basenpaar-Marker der Firma NEB. Die Detektion der PCR-Produkte erfolgt im UV-Licht durch Fluoreszenz nach Ethidiumbromid-Interkalation in DNA.

## 2.7. Sequenzierung der amplifizierten JAK2-DNA

Die cDNA der zu sequenzierenden JAK2-Exons wurde wie in 2.6.2. beschrieben amplifiziert. Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolge über das Qiagen Reinigungskit QIAquick<sup>®</sup>. Das PCR-Produkt wurde auf eine Entsalzungssäule gegeben und zweimal mit je 500 µL PBI Puffer gespült. Nach Zugabe von 30 µL Elutionspuffer wurde die Säule für 1 min bei 14000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Das in den Überstand abgegebene PCR-Produkt ist nun aufgereinigt und kann mittels TOPO-TA-Cloning<sup>®</sup>- Kit kloniert werden. Die Inserts der Plasmide wurden anschließend sequenziert. Ein Vergleich der Sequenzen unserer Patienten und Gesundspender mit der Referenzsequenz wurde mittels BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) | Referenzsequenz für JAK2 mRNA: NM\_004972) durchgeführt. Es wurden durchschnittlich zehn PCR-Produkte pro mRNA eines Primerpaares amplifiziert und jeweils 4-5 Klone sequenziert. Insgesamt wurden 58 Klone von zwei Patienten mit TAR-Syndrom (02-TAR und 03-TAR) und zwei nicht verwandten Gesundspendern sequenziert.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. Charakterisierung der Patienten unserer Kohorte

Unsere Kohorte umfasst 26 Patienten kaukasischer Ethnität im Alter von zwei bis 40 Jahren. Darunter befinden sich 13 männliche und 13 weibliche Patienten. Die in den folgenden Abschnitten dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse basieren auf klinischen Daten von 26 Patienten unserer Kohorte sowie auf Untersuchungen an Thrombozyten von zehn Patienten dieser Kohorte. Wichtige klinische Daten dieser Patienten, wie z.B. skeletale Malformationen, das Auftreten von Blutungen und andere hämatologische Erscheinungen sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Dazu wurden die Patientendaten aus zwei bereits veröffentlichten Arbeiten unserer Arbeitsgruppe<sup>7,94</sup>, Daten von Madlen Feierabend, einer ehemaligen Doktorandin der Medizinischen Hochschule Hannover, und die Daten von Patienten unserer Arbeitsgruppe zusammengetragen. Unsere Arbeitsgruppe hat 2007 bei den damals untersuchten Patienten mit TAR-Syndrom eine Mikrodeletion auf Chromosom 1q21.1 nachgewiesen. Sie wurde bei zehn der Patienten unserer Kohorte von der Mutter (maternal) und bei drei Patienten vom Vater (paternal) übertragen. Bei vier unserer Patienten ist die Mikrodeletion *de novo* entstanden. Zehn Patienten haben einen unbekanntem Vererbungsmodus. Neben der Thrombozytopenie und Radiusaplasie hatten 75 % eine Hypoplasie der anderen Unterarmknochen (Ulna) sowie 40% eine Hypoplasie der Oberarmknochen (Humerus) und der Daumen. Einige Patienten haben zusätzlich eine Hypoplasie des Schultergürtels. Bei zwölf der 26 Patienten wurde eine Hüftdysplasie festgestellt. Weitere acht Patienten unserer Kohorte hatten innerhalb der ersten Lebensjahre Blutungszeichen wie Petechien, Hämatome oder Nasenbluten. Mit acht von 26 Patienten (30%) ist das Vorkommen von Kniedeformitäten wie Genu vara, Genu valga oder Patellaaplasien, dem in der Literatur beschriebenen Vorkommen vergleichbar<sup>66,67</sup>. Epilepsieformen konnten bei zwei Patienten unserer Kohorte (02-TAR, 35-TAR) diagnostiziert werden. Patientin 01-TAR hat zusätzlich Deformitäten im Urogenitalbereich mit Hufeisennieren und einer Hypoplasie des Uterus. Bei fünf Patienten wurde eine Kuhmilchintoleranz diagnostiziert, die bei den in der Literatur beschriebenen Patienten weitaus häufiger vorkommt<sup>66,67</sup>.

Wie in Tabelle 4 zusammenfassend dargestellt wurde, ist die Ausprägung der häufig beschriebenen Begleiterscheinungen des TAR-Syndroms, wie Verkürzung von Ulna, Humerus und Femur, variabel: z.B. haben Patient 14-TAR und Patientin 17-TAR eine Phocomelie der oberen Extremität, sie haben sowohl hypoplastische Ulnae, als auch Humeri und Schultergürtel. Patientin 18-TAR hingegen hat keine weiteren skeletalen Veränderungen der oberen Extremität.

Diese Heterogenität der Begleiterscheinungen beim TAR-Syndrom wurde bereits in Übersichtsartikeln zum TAR-Syndrom beschrieben<sup>65-67</sup>. In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob bei dem Verlauf der Thrombozytenwerte der Patienten unserer Kohorte ebenfalls eine Heterogenität festzustellen ist.

**Tabelle 4:** Charakterisierung der klinischen Ausprägung des TAR-Syndroms in unserer Patientenkohorte

ID	GEB	GS	V	HH	DH	UH	PHO	HS	UE	HD	KA	AHF	UGT	KI	PH	Bemerkungen	Quelle
01	21.09.1979	W	mat	+	+	+	-	-	-	+	-	-	*1, *2	-		Hörverminderung	Klopocki
02	10.02.1989	W	mat	+	+	+	-	+	-	+		-	-	-		Rolandoepilepsie	Klopocki
03	21.12.1988	W	mat	-	+	+	-	+	-	-	Gvr	VSD	-	-	E	Hypothyreoidismus	Ballmaier
05	01.05.2005	M	mat													Klumpfüße,	neu
08	20.08.1999	M	mat	+	+	+	+	+	+	+	Pa	-	*3	-		im Alter von 3 Jahren verstorben	Klopocki
10	09.03.1993	W	pat	-	+	+	-	+	-	-	-	VSD	-	-		-	Ballmaier
11	15.11.1993	W	dn	+		+	-	-	-	-	-	-	-	+		-	Ballmaier
12	20.10.2002	M	dn	+	+	+	-	+	+	+		-	-	-		-	Klopocki
13	05.10.1980	M	dn	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+		-	Klopocki
14	01.10.1995	M	dn	+	+	+	+	+	-	+		-	*1	-	P,E	-	Ballmaier
17	22.12.1995	W	mat	+	+	+	+	+	+	+	Gvr	-	-	-	E	Sichelfußhaltung	Ballmaier
21	02.06.1979	W		+	+	+	-	+	-	+	Gvl	-	-	+	H		Klopocki
25	06.08.1983	M	mat	+		+	+				Gvr						neu
26	20.05.1986	M	mat			+				+	-	-	*5				neu
27	18.10.1973	W	mat														Klopocki
32	28.05.2008	W	pat	-	-	+	-	+		+			-				neu
33	11.06.1997	M															Ballmaier
34	20.05.1990	W	pat	+	+	+		+		+	Gvl			-		Skoliose BWS, LWS	neu
35	17.11.1969	M		+		+				+	Gvl					Epilepsie	neu
36	16.05.2007	M	mat	+	+	+	+				-	-	*4 re				neu
37	23.09.1973	W													H,E		neu

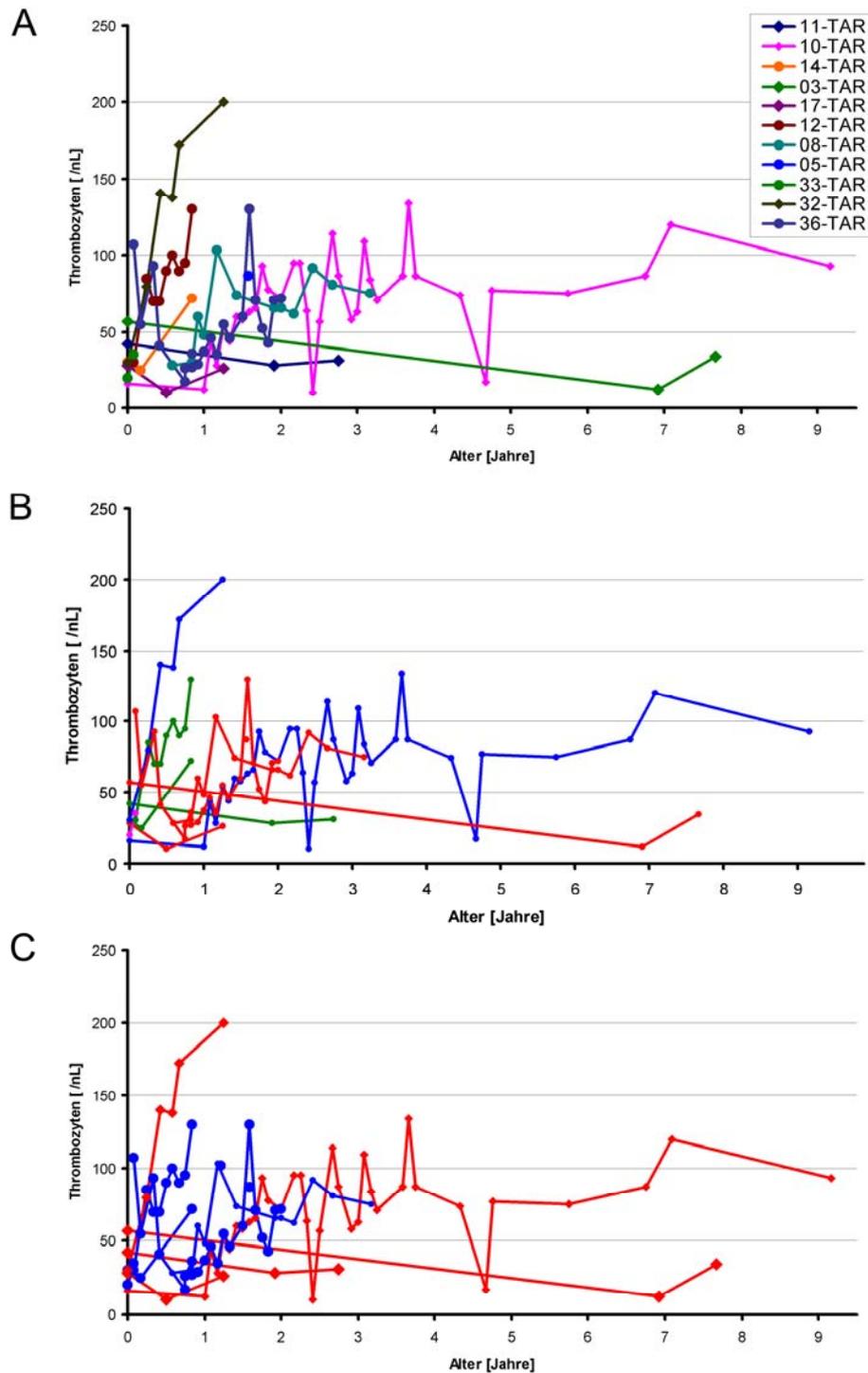
ID	GEB	GS	V	HH	DH	UH	PHO	HS	UE	HD	KA	AHF	UGT	KI	PH	Bemerkungen	Quelle
101	15.01.1991	M												+	E		MF
103	28.03.1990	W		-	-	+	-	-	-	-	-			-			MF
104	10.06.1992	W															MF
105	07.09.2001	M			+	+								+			neu
106	11.02.1980	M			+	+				+	Gvr			+	P,H		MF

**ID:** Patientenidentifikationsnummer, **GEB:** Geburtsdatum, **GS:** Geschlecht (**M:** männlich, **W:** weiblich), **V:** Vererbungsart (**mat:** maternal, **pat:** paternal, **dn:** *de novo*), **HH:** Humerushypoplasie, **DH:** Daumenhypoplasie, **UH:** Ulnahypoplasie, **PHO:** Phocomelie, **AHF:** angeborene Herzfehler, **HS:** Hypoplasie des Schultergürtels, **UE:** Verkürzte untere Extremität, **HD:** Hüftdysplasie, **KA:** Knieabnormalitäten, **UGT:** Anomalien des Urogenitaltraktes, **KI:** Kuhmilchintoleranz, **PH:** Petechien, Hämatome, +: vorhanden, -: nicht vorhanden, **\*1):** Hufeisenniere, **\*2):** Hypoplasie des Uterus / der Vagina, **\*3):** Nierenbeckendilatation, **\*4):** Nierenagenesie, **\*5):** Kryptorchismus, **Gvr:** Genu vara, **Gvl:** Genu valga, **Pa:** Patellaaplasien, **VSD:** Ventrikelseptumdefekt, **P:** Petechien, **H:** Hämatome, **E:** Epistaxis, **MF:** Daten erhoben von Madlen Feierabend (ehem. Doktorandin der MHH), **neu:** neue Patienten unserer Arbeitsgruppe, **leere Felder:** Keine Informationen über das Vorkommen dieser Erscheinung bekannt. **Klopocki:** Klopocki 2007<sup>94</sup>; **Ballmaier:** Ballmaier 1997<sup>7</sup>

### **3.2. Entwicklung der Thrombozytenwerte bei Patienten mit TAR-Syndrom**

Hall und Hedberg beschreiben eine Verbesserung der Thrombozytenwerte bei Patienten mit TAR-Syndrom innerhalb der ersten zwei Lebensjahre<sup>65,67</sup>. Jedoch wurde der Verlauf der Thrombozytenwerte in bisherigen Reviewartikeln und Verlaufsstudien entweder nur über kurze Zeiträume (ca. 2 Jahre - Hedberg 1988) oder bei einer geringen Anzahl Patienten (5 Patienten - Hall 1969) beobachtet. Die Patienten unserer Kohorte sind bereits seit mehreren Jahren in unserer Betreuung, sodass Thrombozytenwerte über einen längeren Zeitraum erhoben wurden. Zunächst sollte untersucht werden, ob sich die oben genannte Aussage bezüglich der Verbesserung der Thrombozytenwerte auch in unserer Patientenkohorte widerspiegelt. Die Thrombozytenwerte von elf pädiatrischen Patienten mit TAR-Syndrom wurden in Abbildung 10 gegen das Alter aufgetragen.

Thrombozytenwerte auf. Die Patienten 03-TAR, 08-TAR, 11-TAR und 17-TAR zeigen keinen Anstieg der Thrombozytenwerte auf  $>100$  / nL. Um festzustellen, ob es eine Korrelation dieser Beobachtung mit dem Alter der Patienten oder der Vererbung der Mikrodeletion gibt, wurden in Abbildung 10B und 10C die Verläufe der Thrombozytenwerte nach dem Geschlecht der Patienten bzw. nach der Vererbungsart der Mikrodeletion dargestellt.

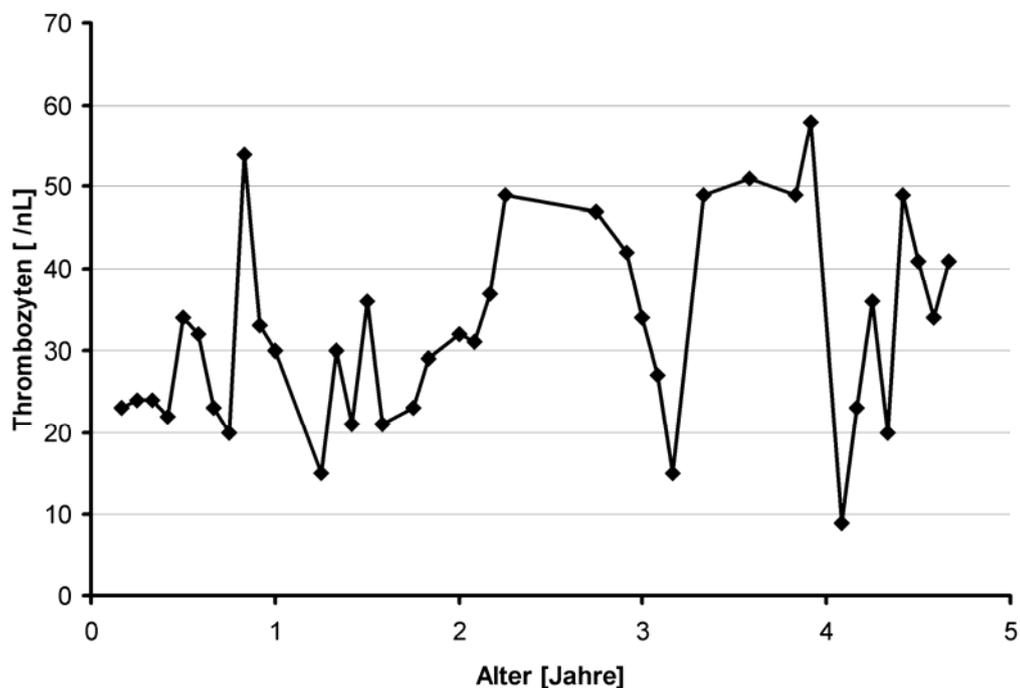


**Abbildung 10:** Thrombozytenwerte von elf pädiatrischen Patienten mit TAR-Syndrom. **A:** Thrombozytenwertverläufe elf pädiatrischer Patienten unserer Kohorte. **B:** Thrombozytenwertverläufe nach Vererbungsmodus aufgetragen, **rot:** maternal, **blau:** paternal, **grün:** *de novo*, **rosa:** unbekannt **C:** Thrombozytenwertverläufe nach Geschlecht der Patienten aufgetragen, **rot:** weiblich, **blau:** männlich

Abbildung 10A zeigt, dass es Unterschiede im Verlauf der Thrombozytenwerte gibt: Die Patienten 08-TAR, 10-TAR, 12-TAR, 14-TAR, 32-TAR und 36-TAR weisen einen Anstieg der

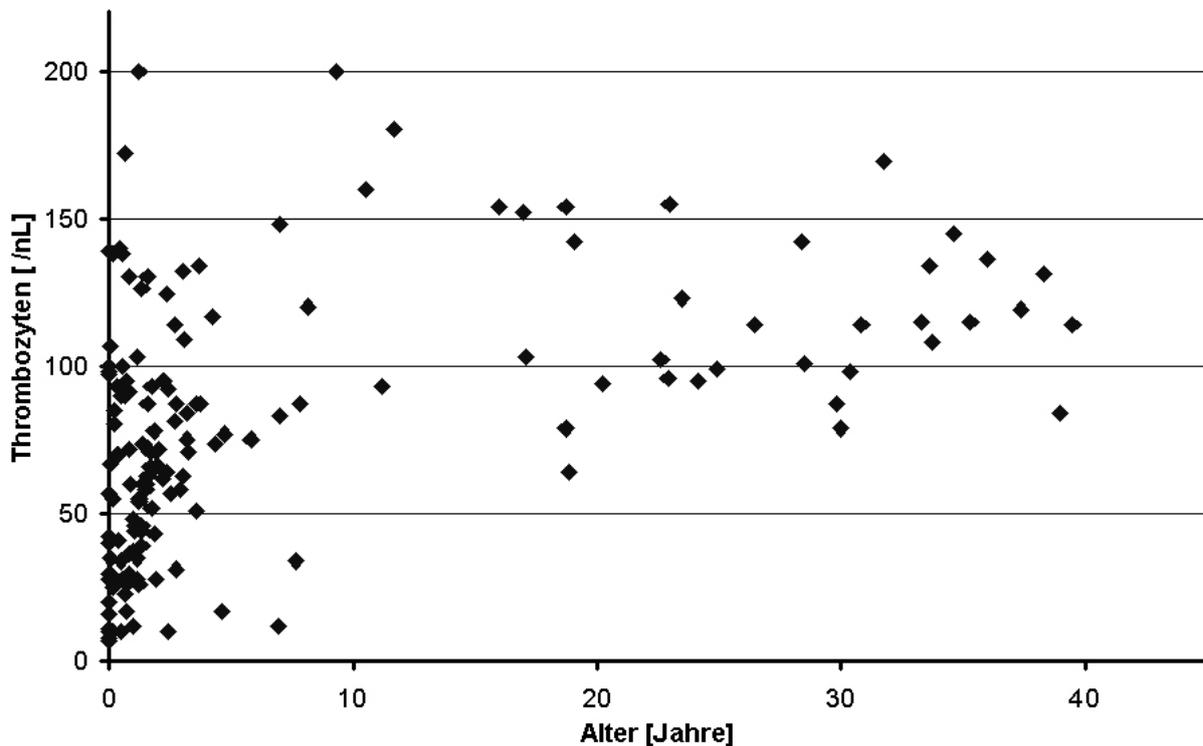
Abbildung 10B zeigt, dass die Thrombozytenwerte aller Patienten mit paternal vererbter Mikrodeletion ansteigen. Patienten mit maternal vererbter und *de novo* entstandener Mikrodeletion weisen entweder einen Anstieg der Thrombozytenwerte oder persistierende Werte im schwer thrombopenen Bereich auf. Abbildung 10C zeigt die Verläufe der Thrombozytenwerte weiblicher Patienten in rot und die der männlichen Patienten in blau. Mit Ausnahme der Patientinnen 10-TAR und 32-TAR zeigen nur männliche Patienten eine Tendenz zur Besserung der Thrombozytenwerte nach zwei Lebensjahren. Allerdings konnten Thrombozytenwertverläufe bei männlichen Patienten nur bis zum Alter von drei Jahren erhoben werden. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass schwere Verläufe der Thrombozytopenie eher bei weiblichen Patienten auftreten und dass anhand der Vererbung der Mikrodeletion keine prognostische Aussage getroffen werden kann.

Abbildung 11 zeigt einen schweren Verlauf der Thrombozytopenie einer Patientin mit TAR-Syndrom innerhalb der ersten 5 Lebensjahre dargestellt. Die Mikrodeletion lag bei dieser Patientin *de novo* vor. Patientin 11-TAR hat in dieser Zeit stark schwankende Thrombozytenwerte zwischen 9 und 58 / nL. Sie hat verkürzte Humeri und Ulnae sowie Kuhmilchintoleranz, ansonsten weist sie keine weiteren Begleiterscheinungen auf (Tabelle 4).



**Abbildung 11:** Thrombozytenverlauf einer Patientin mit TAR-Syndrom (11-TAR). Die Dokumentation ihrer Thrombozytenzahlen zeigt, dass keine Verbesserung der Thrombozytenwerte erzielt wurde. Sie verbleiben während der ersten fünf Lebensjahre im schwer thrombopenen Bereich unter 60 / nL.

In Abbildung 12 sind die insgesamt 157 Thrombozytenwerte aller pädiatrischen und erwachsenen Patienten mit TAR-Syndrom aus unserer Kohorte mit dem Alter korreliert. Bei sieben von elf pädiatrischen Patienten steigen die Thrombozytenwerte innerhalb der ersten beiden Lebensjahre an (siehe auch Abbildung 10). In unserer Kohorte gibt es zwei Geschwister mit TAR-Syndrom (25-TAR und 26-TAR), deren Thrombozytenwerte über lange Zeit dokumentiert wurden. Patient 25-TAR hatte bei Geburt eine schwere Thrombozytopenie mit 10 / nL. Seine Werte stabilisierten sich bereits nach einem Jahr auf über 100 / nL. Die Thrombozytopenie bei dem Bruder, 26-TAR, war nicht so stark ausgeprägt: Alle erhobenen Thrombozytenwerte dieses Patienten liegen zwischen 100 und 150 / nL. Trotz unterschiedlicher Thrombozytenwerte bei Geburt, zeigen beide Patienten, deren Mikrodeletion maternal vererbt wurde, eine Besserung der Thrombozytenwerte. Die Thrombozytenwerte und –verläufe der erwachsenen Patienten unserer Kohorte liegen meist über 100 / nL, sie erreichen jedoch nicht die untere Normgrenze von 150 / nL. Lediglich Patient 26-TAR hat im Alter von 23 Jahren Thrombozytenwerte im unteren Normbereich (156 / nL).



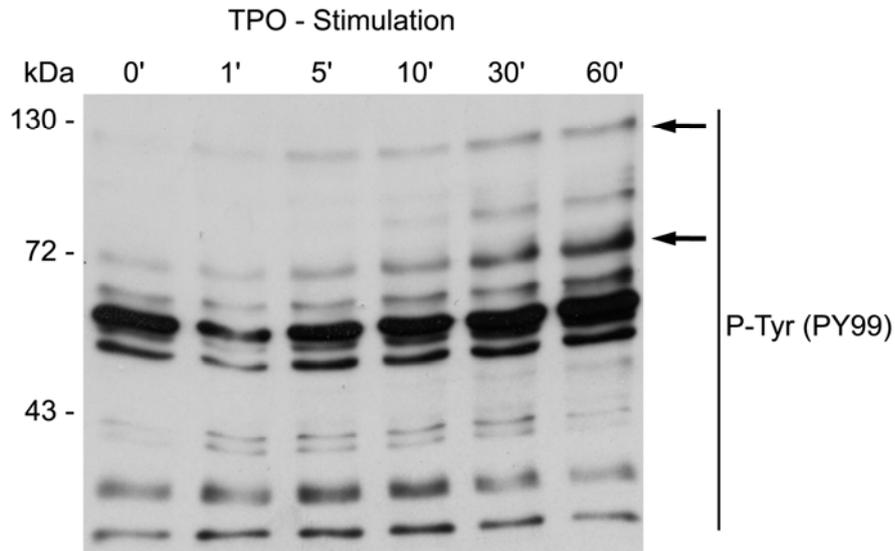
**Abbildung 12:** 157 Thrombozytenwerte aller 26 Patienten unserer Kohorte. Von Patient 10-TAR wurden 34 Werte dokumentiert. Bei elf der Patienten sind nur ein bzw. zwei Thrombozytenwerte bekannt. Die Patienten haben nach der Geburt überwiegend Thrombozytenwerte unter 75 / nL. Die erwachsenen Patienten haben Werte, die im Bereich von 100 – 150 / nL liegen. Sie erreichen aber nur sehr selten den unteren Normbereich.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die in der Literatur zum TAR-Syndrom verbreitete Aussage bezüglich der Verbesserung der Thrombozytenwerte in dieser Arbeit zum Teil bestätigt werden konnte: Obwohl die erwachsenen Patienten unserer Kohorte kaum Thrombozytenwerte im Normbereich (150 - 400 / nL) haben, ist eine deutlich Tendenz zur Verbesserung der Thrombozytenwerte bei mehr als der Hälfte unserer Patienten nach zwei Jahren erkennbar. Es wurde gezeigt, dass es eine Veränderung im Schweregrad der Thrombozytopenie gibt. Da es keine aktuellen Daten zu Knochenmarkuntersuchungen von Patienten mit TAR-Syndrom gibt, kann keine Aussage zur Anzahl der MK oder Veränderung dieser über die Zeit getroffen werden.

### **3.3. TPO-abhängiger Signalweg in Thrombozyten**

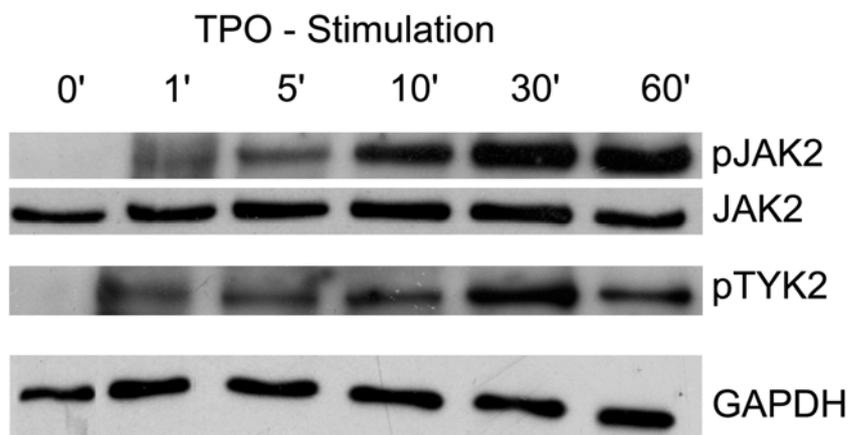
Eine mögliche Ursache für die Thrombozytopenie bei Patienten mit TAR-Syndrom ist die defektive Phosphorylierung des TPO-Signalweges in MK: Ballmaier *et al.*<sup>7</sup> konnten mit einem aufwendigen und Material verbrauchenden Immunopräzipitations-Verfahren zeigen, dass die TPO-Stimulation der Thrombozyten von Patienten mit TAR-Syndrom nur zu einer verminderten Phosphorylierung von JAK2 führt, einer Kinase im Signalweg von TPO, dem wichtigsten hämatopoetischen Wachstumsfaktor für die Thrombopoese.

In dieser Arbeit wurde eine Immunoblotting-Methode an Thrombozyten von Gesundspendern etabliert, bei der mit Antikörpern Epitope mit spezifischen aktivierungsabhängigen Tyrosinresten verschiedener Proteine der TPO-abhängigen Signalkaskade nachgewiesen werden können. Vorteil dieser Methode ist, dass aufgrund der phosphorylierungsspezifischen Antikörper zum Nachweis der Aktivierung weniger Material verbraucht wird. Abbildung 13 zeigt die zeitabhängige Tyrosin-Phosphorylierung von Proteinen in Thrombozyten von Gesundspendern nach TPO-Stimulation. Für das Immunoblotting-Verfahren wurde ein Antikörper gegen phosphorylierte Tyrosinreste (PY99) verwendet. Es werden mehrere Proteine in Thrombozyten mit unterschiedlichen Kinetiken tyrosinphosphoryliert. So erreichen einige Proteine ihre maximale Phosphorylierbarkeit bereits nach zehnminütiger TPO-Stimulation. Bei anderen Proteinen hingegen nimmt die Phosphorylierbarkeit nach 30 minütiger Stimulationsdauer noch zu (Pfeile in Abbildung 13). Es wird außerdem gezeigt, dass es in Thrombozyten konstitutiv tyrosinphosphorylierte Proteine gibt. Diese sind unabhängig von der TPO-Stimulationsdauer in gleicher Menge phosphoryliert.



**Abbildung 13:** Zeitabhängige TPO-Stimulation von Thrombozyten eines Gesundspenders (0' - 60'). TPO-Stimulation führt zur Tyrosinphosphorylierung diverser Proteine mit verschiedenem Molekulargewicht (siehe Pfeile). Die Phosphorylierung der Proteine erfolgt mit unterschiedlichen Kinetiken. Einige Proteine sind konstitutiv phosphoryliert (0') und werden durch TPO nicht zusätzlich phosphoryliert.

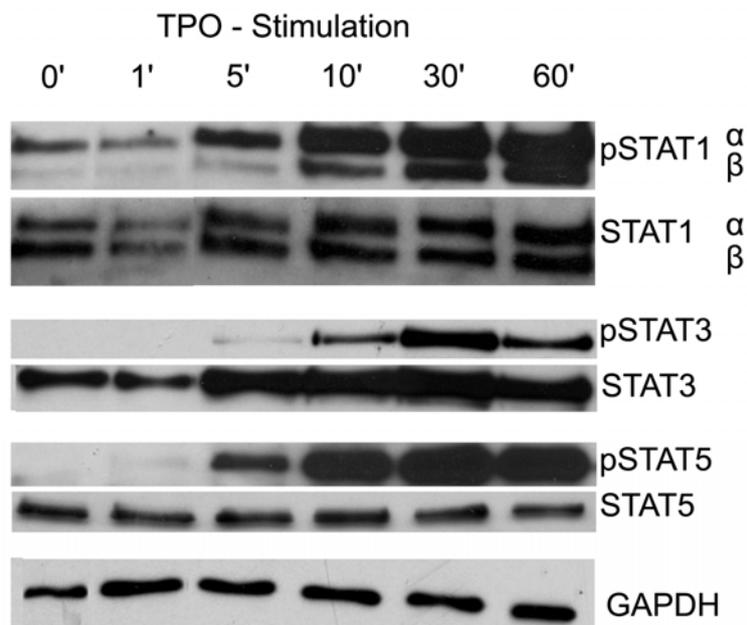
Die Stimulation mit TPO führt zur Phosphorylierung der Proteine des JAK-STAT-Signalweges in Thrombozyten (siehe auch 1.1.2.). Zunächst wurde mit spezifischen Antikörpern gegen die phosphorylierten Tyrosinreste, der so genannten „Aktivierungsschleife“ der Januskinasen JAK2 (Y1007/Y1008) und TYK2 (Y1054/1055), deren Phosphorylierung in Thrombozyten von Gesundspendern untersucht. In Abbildung 14 wurde nachgewiesen, dass die Kinasen JAK2 und TYK2 wie in der Literatur beschrieben, in Abhängigkeit von TPO phosphoryliert werden<sup>7,8,43</sup>.



**Abbildung 14:** Der Immunoblot zeigt die zeitabhängige Phosphorylierung der Januskinasen JAK2 und TYK2 in Thrombozyten eines Gesundspenders nach TPO-Stimulation. Die Ladekontrollen mit JAK2 und GAPDH bestätigen eine gleichmäßige Beladung der Spuren.

Die Januskinasen JAK2 und TYK2 werden in Thrombozyten von Gesundspendern bereits nach einminütiger Stimulation mit TPO tyrosinphosphoryliert. Bei beiden Proteinen ist die maximale Phosphorylierbarkeit nach 30-minütiger TPO-Stimulation erreicht. Die Detektion mit einem Antikörper gegen JAK2-Gesamtprotein und gegen Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) zeigt, dass alle Spuren gleichmäßig beladen sind (Abbildung 14).

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten bereits mit Hilfe des Immunopräzipitations-Verfahrens zeigen, dass phosphoryliertes JAK2 (pJAK2) und TYK2 (pTYK2) in Thrombozyten die TFs STAT1 $\alpha$ , STAT1 $\beta$ , STAT3 und STAT5 phosphorylieren<sup>42,55,107</sup>. In Abbildung 15 werden diese Ergebnisse methodisch mit phosphospezifischen Antikörpern etabliert. STAT1 $\alpha$  und STAT5 werden mit einer schnellen Kinetik phosphoryliert: Nach zehnminütiger TPO-Stimulation ist bereits mehr als die Hälfte der maximalen Signalstärke erreicht. Die STAT1 $\beta$ - und STAT3-Phosphorylierung haben eine langsamere Kinetik: Erst nach zehnminütiger TPO-Stimulation ist im Immunoblotting-Verfahren Phosphorylierung der Proteine detektierbar. Die STAT3-Phosphorylierung erreicht ihr Maximum bereits nach 30-minütiger TPO-Stimulation. Die Detektion mit Antikörpern gegen STAT1, STAT3 und STAT5 Gesamtprotein bestätigt, dass alle Spuren gleichmäßig beladen sind.



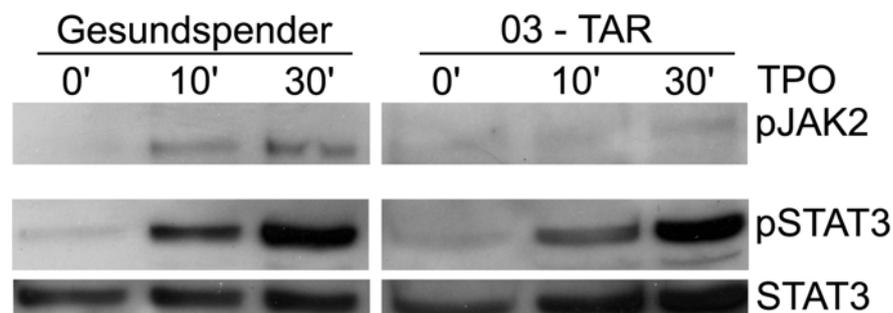
**Abbildung 15:** Die Stimulation von Thrombozyten mit TPO führt zur Tyrosinphosphorylierung der Transkriptionsfaktoren STAT1, STAT3 und STAT5. Bei STAT1 $\alpha$ , STAT3 und bei STAT5 ist eine Tyrosinphosphorylierung bereits nach fünfminütiger TPO-Stimulation detektierbar, STAT1 $\beta$  Phosphorylierung erst nach zehn Minuten. Detektion mit den Antikörpern gegen das jeweilige Protein (STAT1, STAT3, STAT5) und die Ladekontrolle mit GAPDH bestätigen, dass alle Spuren gleichmäßig beladen sind.

In dieser Arbeit wurde ein Immunoblotting-Verfahren mit phosphorylierungsspezifischen Antikörpern zum Nachweis der TPO-abhängigen Aktivierung des JAK-STAT-Signalweges in Thrombozyten etabliert. Diese Methode ist aufgrund des geringen Materialverbrauches von besonderem Interesse für die Untersuchung pädiatrischer Patienten (geringes Blutvolumen) mit Thrombozytopenie (verminderte Anzahl von Thrombozyten). Die Etablierung dieser Methode an Gesundspendern war Voraussetzung dafür, dass die Thrombozyten von Patienten mit TAR-Syndrom auf Expression und Phosphorylierbarkeit derselben Proteine untersucht werden konnten.

### 3.4. JAK2 in Thrombozyten von Patienten mit TAR-S

#### 3.4.1. Defektive JAK2-Phosphorylierung bei einer Patientin mit TAR-Syndrom

Nachdem die Immunoblotting-Methode zum Nachweis der TPO-abhängigen Phosphorylierung der Proteine des JAK-STAT-Signalweges an Gesundspendern etabliert war, sollte mit dieser Methode der bereits bekannte Defekt der JAK2-Phosphorylierung bei Patienten mit TAR-Syndrom bestätigt werden<sup>108</sup>. Abbildung 16 zeigt, dass in den Thrombozyten der 19 Jahre alten Patientin 03-TAR nach 30-minütiger TPO-Stimulation noch kein phosphoryliertes JAK2 Protein nachweisbar ist. In den Thrombozyten des Gesundspenders wird bereits nach zehnminütiger Stimulation mit TPO JAK2-Protein phosphoryliert. Die Ladekontrolle mit GAPDH bestätigt, dass alle Spuren gleichmäßig beladen sind.



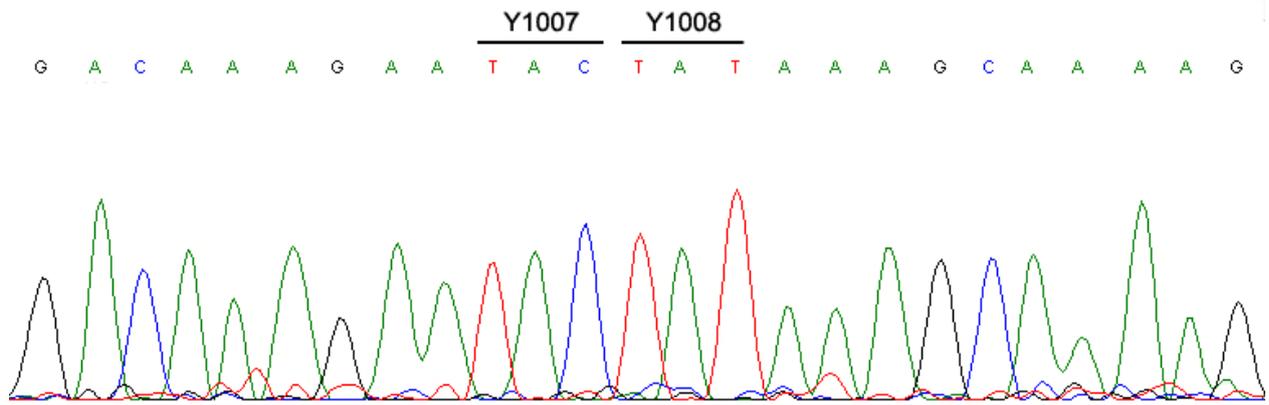
**Abbildung 16:** TPO-Stimulation von Thrombozyten eines Gesundspenders und einer Patientin mit TAR-Syndrom (03-TAR). Die Patientin mit TAR-Syndrom hat kein phosphorylierbares JAK2. Die Ladekontrolle mit GAPDH zeigt, dass die Spuren gleichmäßig beladen sind.

Der TPO-abhängige Signalweg in Thrombozyten ist bei Patienten mit TAR-Syndrom gestört: Die Januskinase JAK2 wird nach TPO-Stimulation nicht phosphoryliert. Da nachgewiesen werden konnte, dass JAK2-Gesamtprotein in Thrombozyten von Patientin 03-TAR vorhanden ist (Daten nicht gezeigt), galt es herauszufinden, was die Ursache dieser defekten Phosphorylierung ist. Bei der CAMT, eine andere Knochenmarkerkrankung, weisen die Patienten aufgrund von Mutationen im TPO-Rezeptor c-Mpl ebenfalls keine JAK2 Phosphorylierung auf<sup>12</sup>. Bei Patienten mit TAR-Syndrom wurden keine Mutationen dieses Rezeptors gefunden<sup>7</sup>. Eine mögliche Erklärung der fehlenden Phosphorylierung von JAK2-Protein in Thrombozyten von Patienten mit TAR-Syndrom ist, dass im JAK2-Gen eine Mutation vorliegt.

### 3.4.2. Keine Mutation im JAK2-Gen bei zwei Patientinnen mit TAR-Syndrom

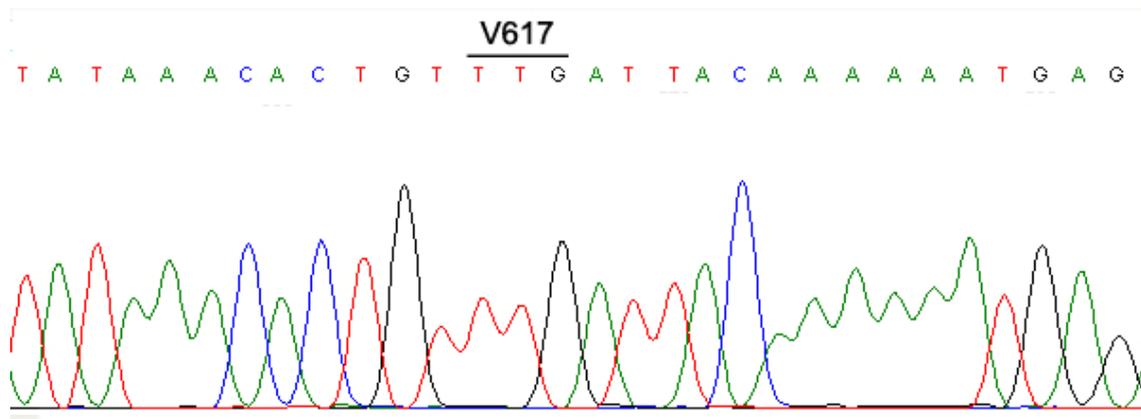
Bei myeloproliferativen Syndromen (*myeloproliferative disorders* - MPD) wie Polycythaemia Vera und Essentieller Thrombozythämie liegt in den meisten Fällen eine Mutation im JAK2-Gen vor. Die am häufigsten bei diesen Krankheiten vorkommende genetische Veränderung ist ein Aminosäureaustausch von Valin zu Phenylalanin (V617F) aufgrund einer erworbenen Punktmutation in Exon 14<sup>14</sup>. Die Folge dieser Mutation ist ein konstitutiv phosphoryliertes und aktiviertes JAK2-Protein, was zum Krankheitsbild eines MPD führen kann. Da bei Patienten mit TAR-Syndrom die Phosphorylierung der Kinase JAK2 ausbleibt, ist meine Vermutung, dass beim TAR-Syndrom anstelle einer *gain-of-function* Mutation, wie bei den MPD, eine *loss-of-function* Mutation vorliegen könnte, die verhindert, dass das JAK2 Protein nach TPO-Stimulation adäquat phosphoryliert wird.

Es wurde die 25 Exons umfassende cDNA des auf Chromosom 9p24 lokalisierten JAK2-Gens von zwei Patienten mit TAR-Syndrom (02-TAR und 03-TAR) sequenziert. Thrombozyten sind kernlose Zellen und enthalten keine DNA. Die zur Sequenzierung benötigte cDNA wurde daher, wie im Abschnitt 2.7. beschrieben, aus RNA der von Patienten angelegten LCL isoliert. Abbildung 17 zeigt die Basensequenz der JAK2-DNA, die für die Aktivierungsschleife innerhalb der Kinasedomäne JH1 kodiert. Es liegt bei beiden untersuchten Patienten in diesem funktionell wichtigen Bereich der DNA keine Mutation vor.



**Abbildung 17:** JAK2-Basensequenz im Bereich der für die Aktivierungsschleife Y1007 / Y1008 kodierenden DNA. Bei Patienten mit TAR-Syndrom liegt keine Mutation innerhalb der Aktivierungsschleife vor.

In Abbildung 18 ist ein Ausschnitt der Basensequenz der JAK2-cDNA aus Exon 14 dargestellt. Dies ist der Bereich, der bei Patienten mit MPD häufig mutiert ist, bei Patienten mit TAR-Syndrom jedoch keine Mutation aufweist.



**Abbildung 18:** JAK2-Sequenz im Bereich des Exons 14. Bei myeloproliferativen Erkrankungen, wie Polycythaemia Vera und essentieller Thrombozythaemie ist häufig die Mutation V617F zu finden. Patienten mit TAR-Syndrom weisen weder die V617F noch eine andere Mutation in diesem Bereich auf.

Die Sequenzierung der JAK2-cDNA von zwei Patienten mit TAR-Syndrom hat ergeben, dass im gesamten kodierenden Bereich der JAK2-DNA keine Mutation vorliegt. Es ist daher unwahrscheinlich, dass bei anderen Patienten eine Mutation im JAK2-Gen ursächlich für die Thrombozytopenie beim TAR-Syndrom vorliegt. Folglich muss es eine andere Ursache für die fehlende JAK2-Phosphorylierung in Thrombozyten von Patienten mit TAR-Syndrom geben. Um mehr Aufschluss über die Ursache der defektiven JAK2-Phosphorylierung zu erhalten, sollte im

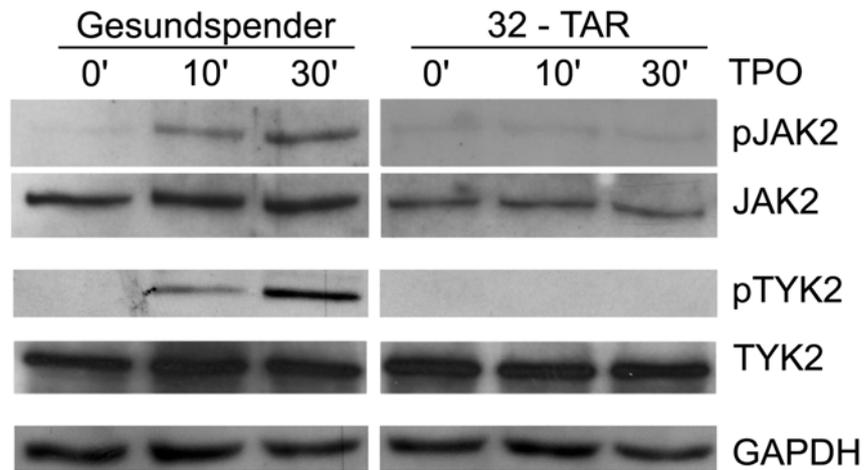
Folgendes die Phosphorylierung weiterer Proteine des JAK-STAT-Signalweges in Thrombozyten von Patienten mit TAR-Syndrom untersucht werden.

### **3.5. JAK-STAT-Signalweg in Thrombozyten von zehn Patienten mit TAR-Syndrom**

Die Phosphorylierung der Proteine des JAK-STAT-Signalweges in Thrombozyten wurde bei zehn Patienten mit TAR-Syndrom untersucht. Überraschenderweise konnte festgestellt werden, dass die Aktivierung des JAK-STAT-Signalweges bei Patienten mit TAR-Syndrom nicht einheitlich ist. Bei fünf der zehn Patienten ist die Aktivierung des JAK-STAT-Signalweges vermindert (im Abschnitt 3.5.1 sind exemplarisch die Ergebnisse der Patientin 32-TAR dargestellt), den anderen fünf der zehn untersuchten Patienten ist die TPO-abhängige Phosphorylierung dieses Signalweges intakt (im Abschnitt 3.5.2. sind exemplarisch die Ergebnisse der Patientin 27-TAR dargestellt)

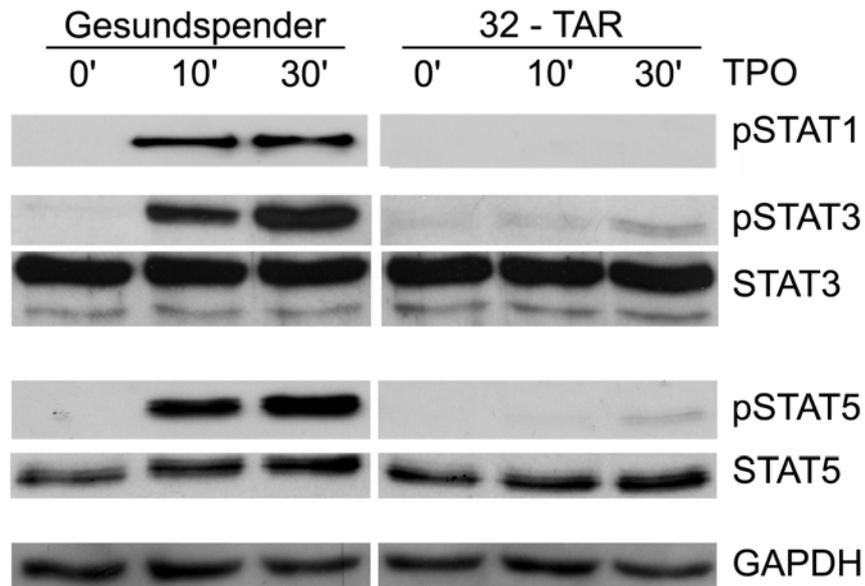
#### **3.5.1. Patienten ohne induzierbares phospho-JAK2**

Im Abschnitt 3.4.1. wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung der Kinase JAK2 in Thrombozyten der Patientin 03-TAR nach 30-minütiger TPO-Stimulation ausbleibt. Die ausbleibende JAK2-Phosphorylierung sollte an Untersuchungen von Thrombozyten weiterer Patienten mit TAR-Syndrom bestätigt werden. Abbildung 19 zeigt die TPO-abhängige Phosphorylierung von JAK2 bei einem Gesundspender und der Patientin 32-TAR, exemplarisch für insgesamt fünf Patienten. Ein Gesundspender zeigt bei zunehmender TPO-Stimulationsdauer eine zunehmende Menge an phosphoryliertem JAK2-Protein und TYK2-Protein. Nach 30-minütiger TPO-Stimulation weist die Patientin 32-TAR ebenfalls keine Phosphorylierung der Januskinase JAK2 auf. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass die zweite in Thrombozyten exprimierte Kinase TYK2 nach 30-minütiger TPO-Stimulation nicht phosphoryliert wird. Die Menge an JAK2 Gesamtprotein ist bei Patientin 32-TAR leicht vermindert. TYK2 Gesamtprotein ist in vergleichbarem Maße zum Gesundspender exprimiert.



**Abbildung 19:** TPO-Stimulation von Thrombozyten eines Gesundspenders und einer Patientin mit TAR-Syndrom. Bei Patientin 32-TAR kann nach 30-minütiger TPO-Stimulation kein phosphoryliertes JAK2 detektiert werden. TYK2 wird ebenfalls nicht nach TPO-Stimulation phosphoryliert. Die Ladekontrolle mit GAPDH bestätigt, dass alle Spuren gleichmäßig beladen sind.

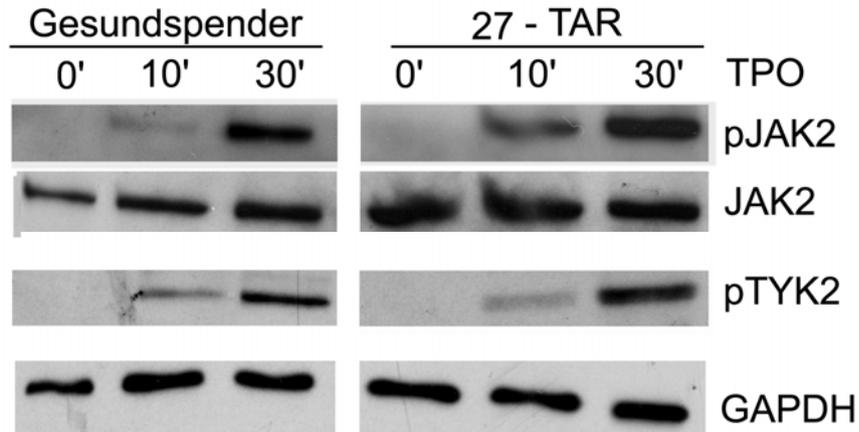
STAT-Moleküle werden in Thrombozyten überwiegend von den Kinasen JAK2 und TYK2 phosphoryliert und aktiviert. Daher sollte zunächst untersucht werden, ob die STAT-Moleküle in Thrombozyten dieser Patientin bei ausbleibender JAK2- und TYK2-Aktivierung dennoch phosphoryliert werden. In Abbildung 20 ist die TPO-abhängige Phosphorylierung der STAT-Moleküle 1, 3 und 5 bei einem Gesundspender und der Patientin 32-TAR dargestellt. Die TPO-Stimulation der Thrombozyten des Gesundspenders zeigt eine zeitabhängige Zunahme der Menge an phosphoryliertem STAT1, STAT3 und STAT5. Bei der Patientin 32-TAR ist nach 30-minütiger TPO-Stimulation viel weniger STAT3-Protein phosphoryliert als beim Gesundspender. Die Phosphorylierung der STAT-Moleküle STAT1 und STAT5 bleibt nahezu komplett aus. Die Detektion mit Antikörpern gegen STAT3 und STAT5 Gesamtprotein sowie GAPDH zeigt, dass die gleiche Proteinmenge in den Thrombozyten von Gesundspender und der Patientin enthalten ist. Der in den Abbildungen 19 und 20 dargestellte Phosphorylierungsdefekt des TPO-abhängigen JAK-STAT-Signalweges konnte bei insgesamt fünf Patienten mit TAR-Syndrom aus unserer Kohorte nachgewiesen werden.



**Abbildung 20:** TPO-Stimulation von Thrombozyten eines Gesundspenders und einer Patientin mit TAR-Syndrom (32-TAR). Die Transkriptionsfaktoren STAT1, STAT3 und STAT5 der Patientin werden in Abhängigkeit von TPO schwächer als die des Gesundspenders tyrosinphosphoryliert. Die Kontrollreaktion mit einem Antikörper gegen GAPDH bestätigt, dass alle Proben gleichmäßig beladen sind.

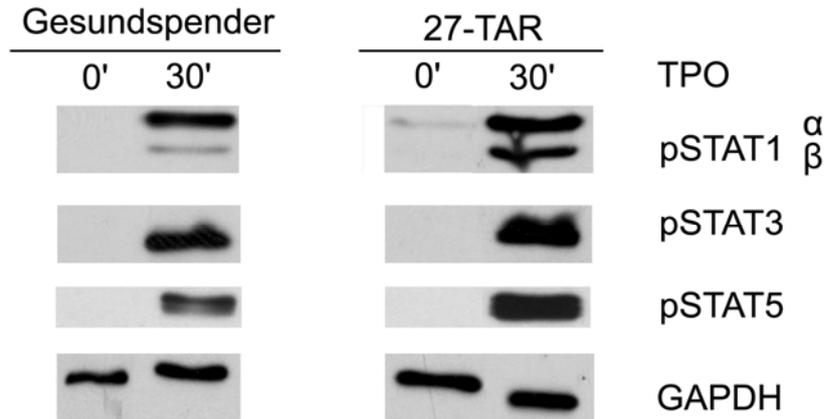
### 3.5.2. Patienten mit induzierbarem phospho-JAK2

Unerwarteterweise fanden wir bei den Untersuchungen des JAK-STAT-Signalweges in Thrombozyten, dass fünf Patienten mit TAR-Syndrom auch intakte Phosphorylierungsmuster mit ein dem Gesundspender vergleichbarem Aktivitätsniveau aufwiesen. In Abbildung 21 ist die TPO-abhängige Phosphorylierung der Kinasen JAK2 und TYK2 in Thrombozyten eines Gesundspenders und der Patientin 27-TAR dargestellt. Bei Patient und Gesundspender ist bei zunehmender TPO-Stimulationsdauer eine Zunahme der JAK2- und TYK2-Phosphorylierung nachweisbar. Die Menge an JAK2-Gesamtprotein ist bei der Patientin 27-TAR mit der des Gesundspenders vergleichbar.



**Abbildung 21:** TPO-Stimulation von Thrombozyten eines Gesundspenders und einer Patientin mit TAR-Syndrom (27-TAR). JAK2 und TYK2 werden bei Patientin und Gesundspender vergleichbar phosphoryliert. Die Menge an Gesamtprotein ist gleich. Die Ladekontrolle mit GAPDH zeigt, dass alle Spuren gleichmäßig beladen sind.

Im Abschnitt 3.5.1. wurde gezeigt, dass die STAT-Moleküle in Thrombozyten von Patienten mit TAR-Syndrom, deren Kinasen JAK2 und TYK2 nicht bzw. stark vermindert phosphoryliert werden, ebenfalls nicht bzw. stark vermindert phosphoryliert werden. Die in Abbildung 21 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass es jedoch auch Patienten mit intakter JAK2-Phosphorylierung gibt. Als nächstes sollte untersucht werden, ob bei diesen Patienten auch die Substrate von JAK2 eine intakte Aktivierung aufweisen. In Abbildung 22 ist die TPO-abhängige Phosphorylierung der STAT-Moleküle STAT1, STAT3 und STAT5 bei einem Gesundspender und der Patientin 27-TAR dargestellt. Die TPO-Stimulation der Thrombozyten des Gesundspenders zeigt eine zeitabhängige Zunahme der Menge an phosphoryliertem STAT1, STAT3 und STAT5. In den Thrombozyten der Patientin 27-TAR werden diese in vergleichbarem Maße in Abhängigkeit von TPO phosphoryliert.



**Abbildung 22:** TPO-Stimulation von Thrombozyten eines Gesundspenders und einer Patientin mit TAR-Syndrom (27-TAR). Die Transkriptionsfaktoren STAT1, STAT3 und STAT5 der Patientin werden in Abhängigkeit von TPO tyrosinphosphoryliert. STAT1β und STAT5 werden im Vergleich zum Gesundspender stärker phosphoryliert. Die Ladekontrolle mit GAPDH bestätigt, dass alle Spuren gleichmäßig beladen sind.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Aktivierung des TPO-abhängigen JAK-STAT-Signalwegs in Thrombozyten von Patienten mit TAR-Syndrom nicht homogen ist. Es gibt zwei unterschiedliche Aktivierungsmuster des Signalweges bzw. zwei „Gruppen“ von Patienten: jene mit induzierbarem pJAK2 und solche ohne induzierbares pJAK2. In Tabelle 5 sind die Ergebnisse für die zehn Patienten aus unserer Kohorte, deren Thrombozyten untersucht werden konnten, aufgelistet: Fünf der zehn Patienten (03, 32, 33, 34 und 36) weisen eine verminderte bzw. ausbleibende JAK2-Phosphorylierung und JAK-STAT-Aktivierung auf. Bei den anderen fünf Patienten (01, 26, 27, 35 und 37) wurde ein intaktes Phosphorylierungsmuster mit intakter JAK2-Phosphorylierung nachgewiesen. Die Ergebnisse zu den unterschiedlichen Phosphorylierungsmustern in Thrombozyten von Patienten mit TAR-Syndrom werden im Abschnitt 4.1. genauer erläutert und diskutiert.

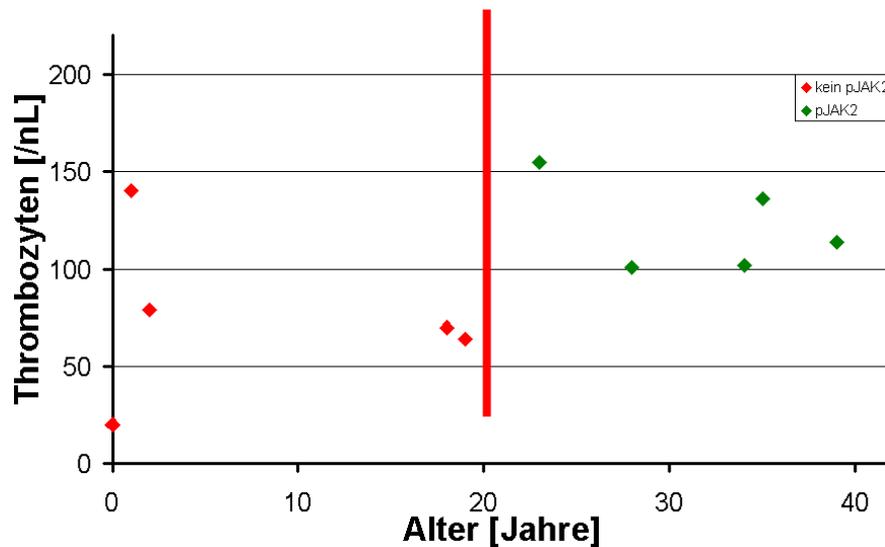
**Tabelle 5:** Expressions- und Phosphorylierungsmuster der Proteine des JAK-STAT-Signalweges in Thrombozyten von Patienten mit TAR-Syndrom

ID	pJAK2	JAK2	pTYK2	TYK2	pSTAT1	STAT1	pSTAT3	STAT3	pSTAT5	STAT5
03	—	—					•	•		
32	—	—	—	•	—	•	—	•	—	•
33	—	•								
34	—	—					—	•		
36	—	•					—	•		
01	•	•	•	•	•	•	•	•		
26	•	•					•	•		
27	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
35	•	•	•	•			•	•		
37	•	•					•	•		

ID: Patientenidentifikationsnummer, •: normale Expression / Phosphorylierbarkeit, —: verminderte bzw. ausbleibende Expression / Phosphorylierbarkeit

### 3.6. Korrelation zwischen Signaltransduktion, Alter und Thrombozytenwerte der Patienten

Die zehn Patienten unserer Kohorte, deren Thrombozyten untersucht wurden, zeigen kein einheitliches Aktivierungsmuster des TPO-Signalweges. Es gibt Patienten mit intaktem JAK-STAT-Signalweg und Patienten mit defektem Signalweg. Um herauszufinden, ob die Patienten einer „Gruppe“ Gemeinsamkeiten haben bzw. Patienten aus den unterschiedlichen „Gruppen“ neben dem Signalweg in Thrombozyten weitere Unterschiede aufweisen, wurden die Thrombozytenwerte dieser Patientenuntergruppen mit dem Alter korreliert. In Abbildung 23 ist die Korrelation zwischen pJAK2-Status, den Thrombozytenwerten und dem Alter der Patienten dargestellt. Die Werte der Patienten, deren TPO-abhängiger Signalweg in Thrombozyten defekt ist, sind mit roten Rauten dargestellt und jener Patienten, deren Signalweg intakt ist, mit grünen Rauten. Eine Zuordnung der Patienten zu einer der beiden „Gruppen“ kann nicht eindeutig über die Thrombozytenwerte erfolgen. Patientin 32-TAR hat im Alter von drei Monaten Thrombozytenwerte von 140 / nL und einen defekten Signalweg. Patientin 01-TAR hingegen hat im Alter von 27 Jahren Thrombozytenwerte von 100 / nL und einen intakten Signalweg. Stattdessen lassen sich die Patienten mit defekter JAK2-Phosphorylierung aufgrund des Alters graphisch von denen mit intaktem Signalweg unterscheiden (rote Linie): Alle Patienten mit intaktem Signalweg sind älter als 20 Jahre. Im Abschnitt 4.1. werden die Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Patienten hinsichtlich Alter, Thrombozytenwerten und skeletaler Fehlbildungen genauer diskutiert.



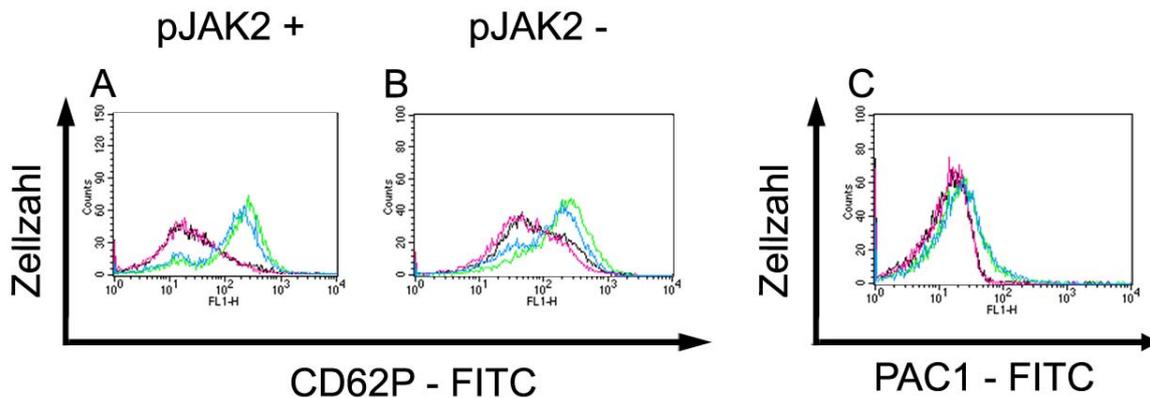
**Abbildung 23:** Korrelation der Thrombozytenwerte mit dem Alter und pJAK2-Status der zehn Patienten unserer Kohorte, deren JAK2 Phosphorylierbarkeit untersucht wurde. Rote Symbole stellen Thrombozytenwerte von Patienten dar, deren JAK2 in Thrombozyten nicht phosphorylierbar ist, grüne stellen Thrombozytenwerte von Patienten mit intakter JAK2-Phosphorylierung dar.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass bei Patienten mit TAR-Syndrom der JAK-STAT-Signalweg nicht einheitlich aktiviert wird. Pädiatrische Patienten haben einen Defekt in der JAK2-Phosphorylierung und eine verminderte Phosphorylierung der weiteren Proteine des JAK-STAT-Signalweges. Da dieser Defekt nicht auf eine Mutation im JAK2-Gen zurückzuführen ist, muss weiterhin nach der Ursache für diesen gesucht werden. Zunächst sollte herausgefunden werden, ob es weitere Veränderungen bei der TPO-abhängigen Aktivierung von Thrombozyten pädiatrischer Patienten mit TAR-Syndrom gibt.

### 3.7. Thrombozytenaktivierung ist bei Patienten mit TAR-Syndrom nicht beeinflusst

Ballmaier *et al.*<sup>7</sup> konnten zeigen, dass bei Patienten mit TAR-Syndrom die Aktivierung von Thrombozyten mit Agonisten wie ADP oder TRAP-6 intakt ist. Die Patienten mit TAR-Syndrom aus unserer Kohorte weisen Unterschiede in der TPO-abhängigen intrazellulären Signaltransduktion von Thrombozyten auf: Es gibt Patienten mit intaktem Signalweg (älter als 20 Jahre) und Patienten mit einer defekten JAK2-Phosphorylierung (jünger als 20 Jahre). Es sollte zunächst überprüft werden, ob es auch bei der Stimulation von Thrombozyten mit anderen Agonisten, wie ADP und TRAP-6, unterschiedliche Aktivierungsmuster gibt. Die aus Vollblut isolierten Thrombozyten von Patienten und Gesundspendern wurden, wie im Abschnitt 2.5. dieser Arbeit beschrieben, mit ADP und TRAP-6 stimuliert. Die Ergebnisse dieser

Stimulationsexperimente sind am Beispiel der ADP-Stimulation der Thrombozyten von einer Patientin mit intakter JAK2-Phosphorylierung (27-TAR) und einer Patientin ohne phosphoJAK2 (32-TAR) in Abbildung 24 dargestellt. Abbildung 24A und 24B zeigen die CD62P Expression auf Thrombozyten der Patientin 32-TAR bzw. 27-TAR nach fünfminütiger ADP-Stimulation. Die Aktivierbarkeit der Thrombozyten beider Patientinnen ist mit der des Gesundspenders vergleichbar. Abbildung 24C zeigt eine mit dem Gesundspender vergleichbare Expression des aktivierten GP IIb/IIIa-Komplexes auf der Thrombozytenoberfläche der Patientin 27-TAR nach fünfminütiger ADP-Stimulation.



**Abbildung 24:** CD62P- und GP IIb/IIIa Expression nach 5-minütiger Stimulation mit 20  $\mu$ M des Agonisten ADP von Thrombozyten von Gesundspendern und Patienten mit TAR-Syndrom. Schwarz: Gesundspender unstimuliert, rosa: Patient unstimuliert, grün: Gesundspender stimuliert, blau: Patient stimuliert. **A:** CD62P Expression eines Gesundspenders und 32-TAR. **B:** CD62P Expression eines Gesundspenders und 27-TAR **C:** Expression von aktiviertem GP IIb/IIIa-Komplex eines Gesundspenders und 27-TAR.

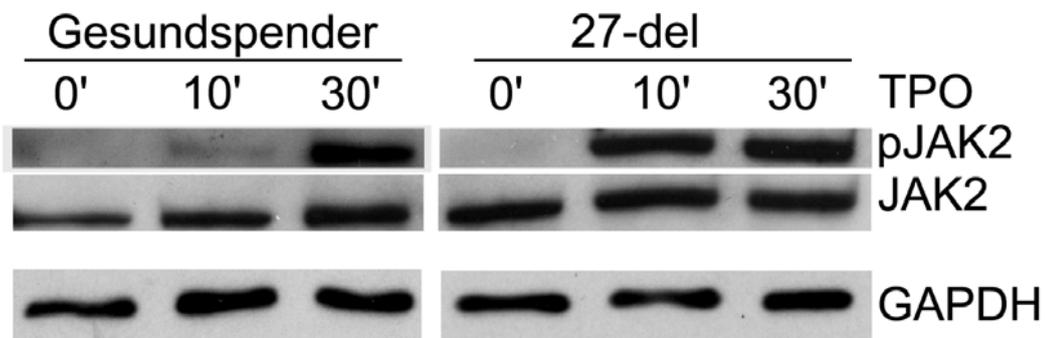
Die durchflusszytometrischen Untersuchungen von Thrombozyten der Patienten 27-TAR und 32-TAR haben gezeigt, dass die fehlende Phosphorylierung von JAK2 keinen Einfluss auf die Aktivierung von Thrombozyten mit Agonisten wie ADP und TRAP-6 (Daten nicht gezeigt) hat. Sowohl Patienten mit phosphorylierbarem JAK2 (27-TAR) als auch Patienten ohne induzierbarem pJAK2 (32-TAR) weisen eine mit den Gesundspendern vergleichbare Aktivierung und  $\alpha$ -Degranulierung von Thrombozyten auf.

Klopocki *et al.*<sup>94</sup> haben bei allen untersuchten Patienten mit TAR-Syndrom eine Mikrodeletion auf Chromosom 1q21 gefunden. Sie wurde bei 75 % der Familien von einem nicht betroffenen Elternteil vererbt. Das bedeutet, dass die Mikrodeletion zur Entstehung des TAR-Syndroms zwar notwendig, aber nicht ausreichend ist. Wenn die Deletion Einfluss auf den TPO-abhängigen Signalweg in Thrombozyten hätte, müssten Elternteile, die die Mikrodeletion auf Chromosom

1q21 haben, mit den Patienten vergleichbare Expressions- und Phosphorylierungsmuster aufweisen. Im Folgenden wird an Thrombozyten von Deletionsträgern untersucht, ob die Mikrodeletion Einfluss auf den TPO-abhängigen Signalweg in Thrombozyten hat.

### 3.8. TPO-abhängiger Signalweg in Thrombozyten von Mikrodeletionsträgern

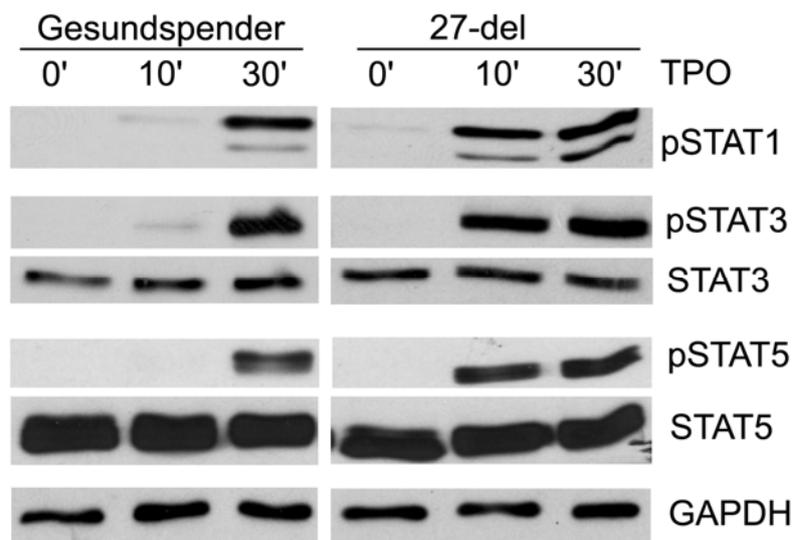
Einige unserer Patienten zeigen bei der Untersuchung des JAK-STAT-Signalweges in Thrombozyten eine verminderte bis ausbleibende JAK2-Phosphorylierung. Inwieweit die Mikrodeletion auf Chromosom 1q21 einen Einfluss auf die Aktivierbarkeit des JAK-STAT-Signalweges in Thrombozyten hat, wird im folgenden Abschnitt vorgestellt. In Abbildung 25 ist die TPO-abhängige Phosphorylierung der Januskinase JAK2 bei einem Gesundspender und der Deletionsträgerin 27-del (Mutter der Patientin 27-TAR) dargestellt. Sie weist eine etwas schnellere Kinetik der JAK2-Phosphorylierung als der Gesundspender auf, hat aber eine dem Gesundspender vergleichbare Menge an pJAK2 nach 30-minütiger TPO-Stimulation. Die Detektion mit Antikörpern gegen JAK2-Gesamtprotein und GAPDH zeigt, dass die Spuren gleichmäßig beladen sind.



**Abbildung 25:** TPO-Stimulation von Thrombozyten eines Gesundspenders und einer Mikrodeletionsträgerin (27-del). JAK2 wird bei der Trägerin in vergleichbarem Maße zum Gesundspender phosphoryliert. Die Menge an JAK2-Gesamtprotein ist gleich. Die Ladekontrolle mit GAPDH bestätigt, dass alle Spuren gleichmäßig beladen sind.

Da die Phosphorylierung von JAK2 und TYK2 (Daten nicht gezeigt) in Thrombozyten von Trägern der Mikrodeletion intakt ist, erwarten wir, dass auch die STAT-Moleküle dem Gesundspender vergleichbar aktiviert werden. In Abbildung 26 ist die TPO-abhängige Phosphorylierung der TF STAT1, STAT3 und STAT5 bei einem Gesundspender und der Deletionsträgerin 27-del (Mutter der Patientin 27-TAR) dargestellt. Die Kinetiken der STAT-

Phosphorylierungen sind bei der Deletionsträgerin 27-del ebenfalls schneller als beim Gesundspender, sind aber durchaus im Rahmen vergleichbar mit anderen Gesundspendern. Die Ladekontrolle mit den Antikörpern gegen STAT3- und STAT5-Gesamtprotein sowie gegen GAPDH bestätigen, dass alle Spuren gleichmäßig beladen sind. Es ist möglich, dass die Thrombozyten dieses Gesundspenders weniger stark auf TPO reagiert haben, als die Thrombozyten anderer Gesundspender, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Phosphorylierung des JAK-STAT-Signalweges in Thrombozyten der Deletionsträgerin 27-del intakt ist.



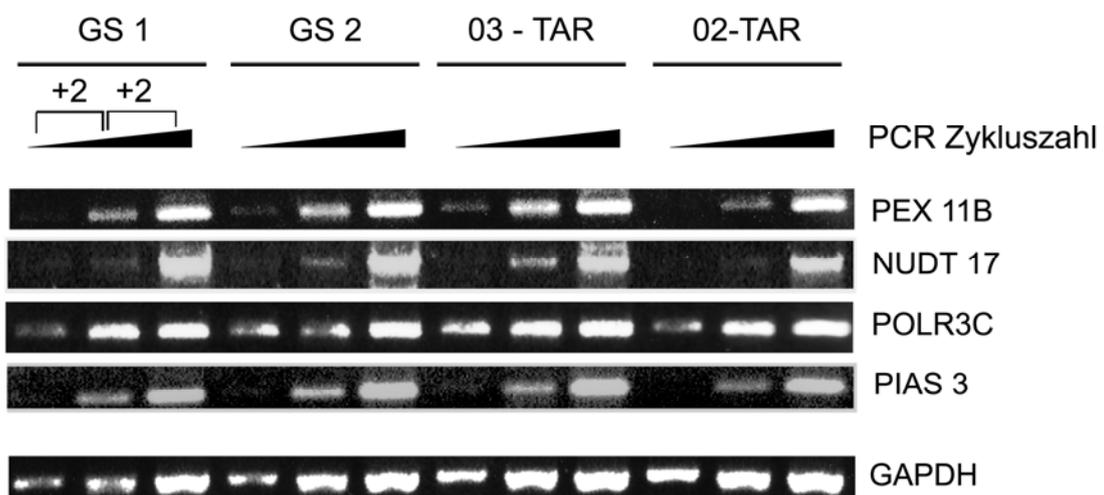
**Abbildung 26:** TPO-Stimulation von Thrombozyten eines Gesundspenders und einer Mikrodeletionsträgerin (27-del). Die STATs 1, 3 und 5 der Trägerin 27-del werden in vergleichbarem Maße zum Gesundspender phosphoryliert. Die Ladekontrolle mit GAPDH bestätigt, dass alle Spuren gleichmäßig beladen sind.

Die dargestellten Ergebnisse der Untersuchungen an Thrombozyten der Deletionsträgerin 27-del sind exemplarisch für vier weitere Mikrodeletionsträger (01-del, 03-del, 26-del und 32-del). Sie zeigen alle eine intakte TPO-Signaltransduktion in Thrombozyten. Es konnte also gezeigt werden, dass für den Defekt im TPO-abhängigen JAK-STAT-Signalweg die Mikrodeletion auf Chromosom 1q21 nicht ausreichend ist.

### 3.9. Keine verminderte RNA Expression der Gene des Mikrodeletionsbereiches

Aufgrund der geringen Anzahl kommerziell erwerblicher Antikörper gegen Proteine, die von Genen innerhalb des Mikrodeletionsbereiches auf Chromosom 1q21 kodiert werden, und der geringen isolierbaren Menge an RNA aus Thrombozyten, wurden mittels Epstein-Barr-Virus-

Transformation immortalisierte lymphoblastoide Zelllinien (LCL) von Patienten mit TAR-Syndrom und Gesundspendern angelegt. LCL haben unter anderem den Vorteil, dass sie jederzeit verfügbar sind und den genetischen Status der Patienten widerspiegeln. Um zu überprüfen, ob die von Klopocki *et al.*<sup>94</sup> bei Patienten mit TAR-Syndrom nachgewiesene Mikrodeletion einen Einfluss auf die RNA-Expression der Gene dieses DNA-Abschnittes hat, wurde mittels semiquantitativer PCR die cDNA-Menge der 13 Gene im Mikrodeletionsbereich in LCL von Patienten mit TAR-Syndrom bestimmt. In Abbildung 27 ist die Expression ausgewählter Gene im Deletionsbereich dargestellt. PEX 11B, NUDT 17, POLR3C und PIAS3 wurden exemplarisch für den gesamten Deletionsbereich dargestellt. Es sind jeweils drei Amplifikate nach semi-quantitativer PCR aus dem logarithmischen Bereich der Reaktion von zwei Gesundspendern und den Patientinnen 02-TAR und 03-TAR gezeigt. (Bei Patientin 03-TAR wurde eine defektive JAK2-Phosphorylierung nachgewiesen, bei Patientin 02-TAR wurden keine Untersuchungen an Thrombozyten durchgeführt). Es konnte gezeigt werden, dass in den LCL der Patienten mit TAR-Syndrom die mRNA-Expression der Gene innerhalb des Mikrodeletionsbereiches nicht signifikant verändert ist. Da bereits zwischen Patienten und Gesundspendern keine Unterschiede nachweisbar waren, war es nicht mehr zwingend notwendig die RNA-Expressionsprofile von Mikrodeletionsträgern zu überprüfen.



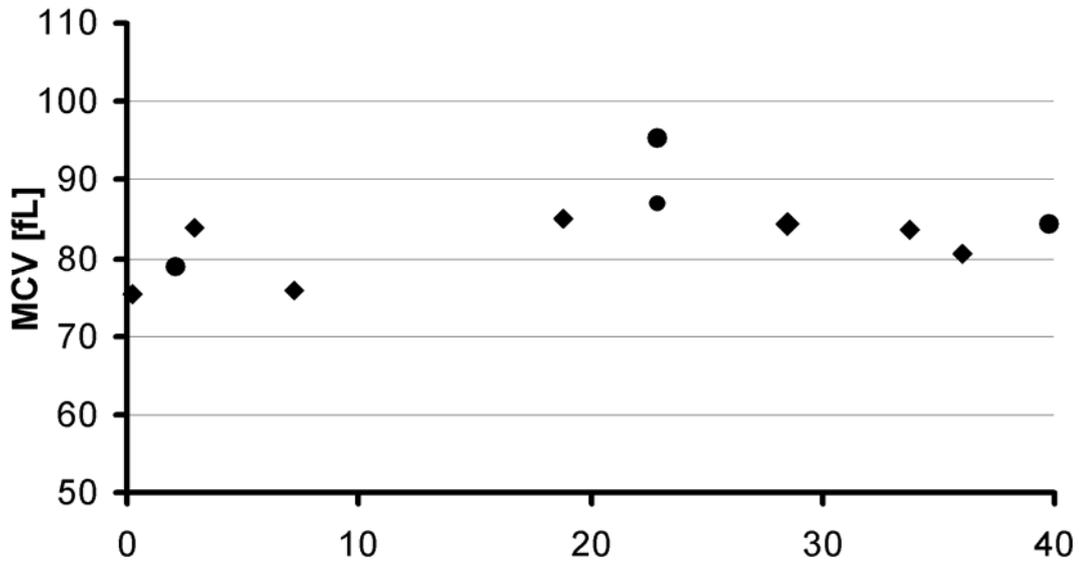
**Abbildung 27:** Semiquantitative PCR der Gene innerhalb des Mikrodeletionsbereiches auf Chromosom 1q21 exemplarisch für PEX11B, NUDT 17, POLR3C und PIAS3. Die Zunahme an PCR-Produkt bei Gesundspendern ist vergleichbar mit der der Patienten. Die Kontrolle mit GAPDH zeigt, dass die cDNA-Menge sowohl bei Gesundspendern, als auch bei Patienten gleich beladen war. +2: PCR-Zykluszahl jeweils um zwei Zyklen verlängert.

Ob diese Gene in MK oder Thrombozyten vermindert exprimiert werden, kann anhand dieser Ergebnisse allerdings nicht ausgeschlossen werden. Es bleibt weiterhin zu klären, ob die Proteine, für die diese Gene kodieren, verändert translatiert werden.

Wenn die Mikrodeletion auf Chromosom 1q21 allein nicht ausreichend für die defektive JAK2-Phosphorylierung ist und die RNA-Expression der Gene des Mikrodeletionsbereiches in LCL nicht vermindert ist, gilt es zu klären, welchen Einfluss die Mikrodeletion auf das klinische Bild der Patienten mit TAR-Syndrom hat. Es wurden einige Patienten beschrieben, die insbesondere in den ersten Lebensjahren zusätzlich Zeichen einer Anämie oder Eosinophilie aufweisen<sup>67</sup>. Bei anderen Patienten wurden perinatal auch transiente leukämoide Reaktionen beobachtet<sup>115</sup>. Jedoch sind Veränderungen dieser Zellreihen im Blutbild noch nicht systematisch beschrieben worden.

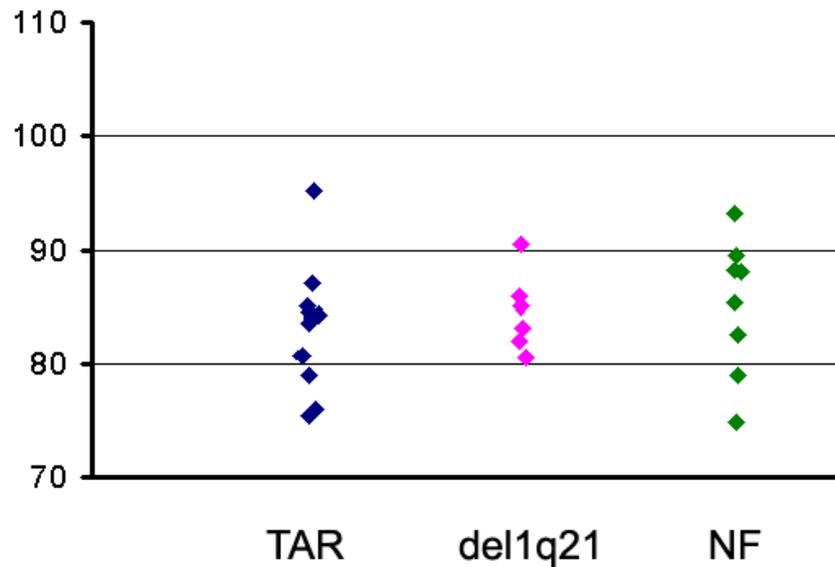
### **3.10. Blutwerte der roten Zellreihe sind bei Patienten mit TAR-Syndrom unauffällig**

Innerhalb des Mikrodeletionsbereiches auf Chromosom 1q21 befindet sich HFE2. Dieses Gen kodiert für das Protein Hämojuvelin, welches ein positiver Regulator des „Eisensensors“ Hepcidin ist und somit die Eisen- und Ferritinspiegel im peripheren Blut beeinflusst. Eine Mutation im HFE2 Gen verursacht das Krankheitsbild der juvenilen Hämochromatose (JHC). Patienten mit JHC zeigen erhöhte Eisen-, Ferritin- und Transferrinspiegel im Blut. Ob Hemizygotie des HFE2-Gens ein ähnliches klinisches Bild verursacht, soll im Folgenden untersucht werden. Es ist davon auszugehen, dass die Veränderung des Eisenstoffwechsels Auswirkungen auf Werte der erythrozytären Reihe hat: Eine vermehrte Eiseneinlagerung in die Speichergewebe des retikuloendothelialen Systems führt zu einer Verminderung der Hämoglobinkonzentration mit normo- oder mikrozytärer Anämie<sup>116-118</sup>. Dies bedeutet, dass die MCV- und MCHC-Werte eher im unteren Normwertbereich sind. Um die möglichen Auswirkungen der Mikrodeletion auf Chromosom 1q21 zu bestimmen, konnten wir Blutbilder von 13 der 26 Patienten unserer Kohorte untersuchen. Zunächst sollte überprüft werden ob bei Patienten mit TAR-Syndrom eine mikrozytäre Anämie vorliegt, dazu wurden die MCV-Werte von insgesamt elf Patienten mit TAR-Syndrom unserer Kohorte angeschaut (Abbildung 28). Von den vier pädiatrischen Patienten hat die Patientin 32-TAR mit 75,3 fL (Normbereich in diesem Alter: 84-98 fL) einen zu niedrigen MCV-Wert. Die anderen drei pädiatrischen Patienten und die erwachsenen Patienten haben MCV-Werte innerhalb des Normbereiches.



**Abbildung 28:** Mittleres korpuskuläres Volumen (MCV) der Erythrozyten von Patienten mit TAR-Syndrom. Der MCV-Normbereich ist im Kindesalter: 2 Monate alt: 84 - 98 fL, 2 - 6 Jahre alt 72 - 87 fL und 6 - 12 Jahre alt: 76 - 90 fL. Im Erwachsenenalter sind die Normwerte für Frauen und Männer 81 - 100 fL. Rauten: weiblich, Kreise: männlich. Die Normwerte für das MCV sind dem Lehrbuch *Paediatric Haematology* von John Lilleyman, Ian Hann und Victor Blanchette, herausgegeben im Jahre 1999, entnommen.

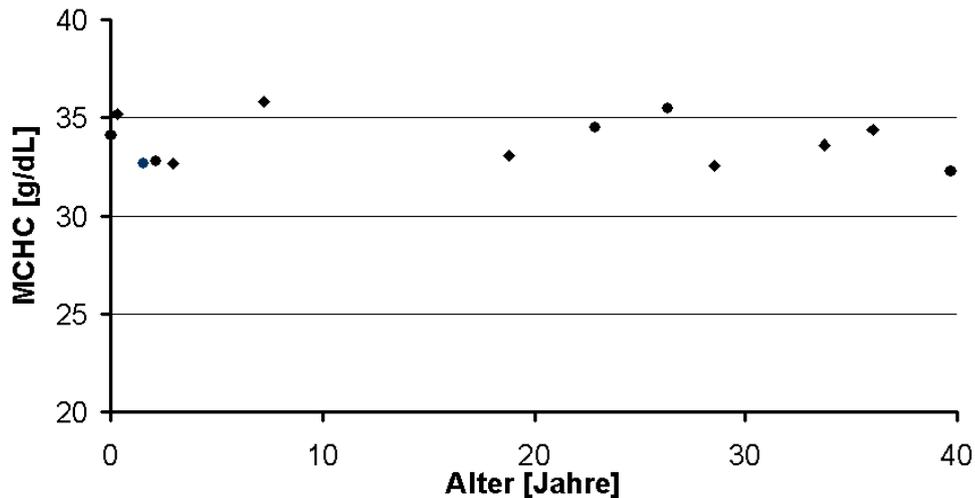
Das MCV der Patienten unserer Kohorte erstreckt sich vom unteren bis zum oberen Normwertbereich. Um zu überprüfen ob es Unterschiede zwischen Patienten, Deletionsträgern und Familienmitgliedern ohne Mikrodeletion gibt, wurden die Werte vergleichend dargestellt. Abbildung 29 zeigt, dass die Streuung der MCV-Werte von Patienten mit der ihrer Eltern vergleichbar ist. Die MCV-Werte der Deletionsträger haben eine geringere Streuung (Werte von 80,5 - 90,5 fL) als die der Patienten (75,3 - 95,2 fL) bzw. die Familienmitglieder ohne Mikrodeletion (74,7 - 93,3 fL). Aufgrund der geringen Stichprobenzahl für Patienten und Deletionsträger lassen sich leider bislang keine Aussagen zum Einfluss der Mikrodeletion auf die MCV-Werte treffen.



**Abbildung 29:** Darstellung der MCV-Werte von Patienten mit TAR-Syndrom und deren Eltern im Vergleich zu Familienangehörigen ohne Mikrodeletion. Blaue Rauten: Patienten mit TAR-Syndrom, Rosafarbene Rauten: Deletionsträger, Grüne Rauten: Familienmitglieder, bei denen keine Mikrodeletion vorliegt (NF).

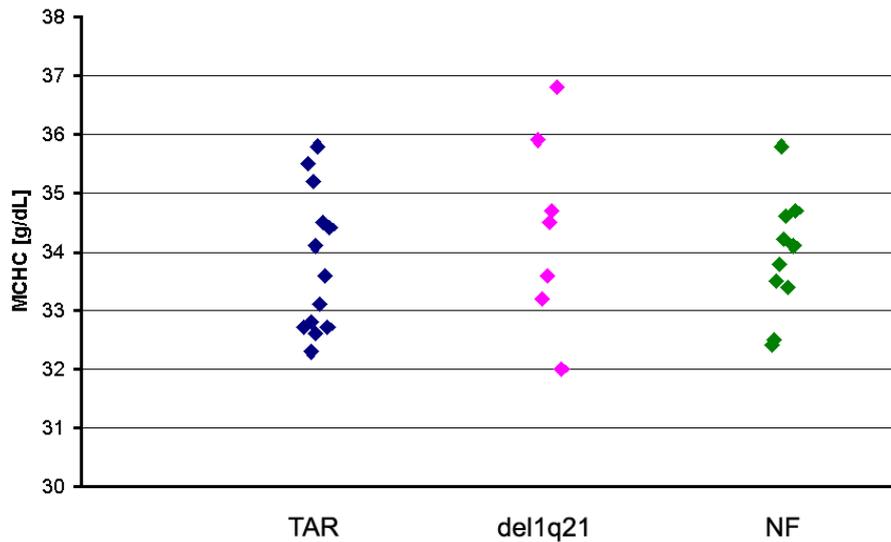
Ein weiterer Parameter der erythrozytären Blutzellreihe ist das MCHC. Dieses beschreibt den Anteil des Hämoglobins am Gesamtvolumen der Erythrozyten und lässt Aussagen über Chromie der Erythrozyten zu. Anhand der MCV- und MCHC-Werte können Rückschlüsse auf Störungen der Erythropoese gezogen werden: So sind z.B. ein verringertes MCV und ein vergrößertes MCHC ein Zeichen für eine normale Hämoglobinsynthese bei verminderter Erythropoese.

In Abbildung 30 sind die MCHC-Werte von insgesamt 13 Patienten unserer Kohorte dargestellt. Die Werte liegen zwischen 31,6 und 35,8 g/dL und sind somit alle innerhalb des Normbereichs.



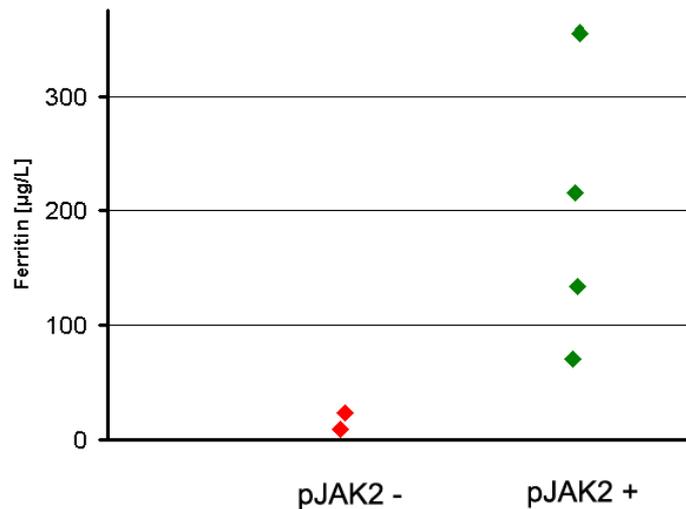
**Abbildung 30:** Mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC) der Erythrozyten von Patienten mit TAR-Syndrom. Der Normbereich von 32,9 - 35,6 g/dL im Kleinkindalter (2 - 6 Jahre) fällt auf 33,5 - 35,2 g/dL für Mädchen bzw. Frauen ab dem 12. Lebensjahr bzw. 33,0 - 35,5 g/dL für Jungen ab dem 12. Lebensjahr. Die Normwerte für die MCHC sind dem Lehrbuch *Paediatric Haematology* von John Lilleyman, Ian Hann und Victor Blanchette, herausgegeben im Jahre 1999, entnommen.

Abbildung 31 zeigt die Verteilung der MCHC-Werte von Patienten mit TAR-Syndrom und ihren Eltern. Patienten mit TAR-Syndrom haben eine den Eltern (sowohl Deletionsträger, als auch Elternteilen ohne Mikrodeletion) vergleichbare Verteilung der MCHC-Werte. Die Hämoglobin- und Hämatokritwerte der Patienten unserer Kohorte liegen ebenfalls überwiegend im Normbereich (Daten nicht dargestellt). Diese Ergebnisse legen nahe, dass bei Patienten mit TAR-Syndrom, im Vergleich zu Mikrodeletionsträgern und Familienmitgliedern ohne Mikrodeletion, die Parameter der roten Blutzellreihe keine Veränderungen aufweisen. Wir vermuten daher, dass die Mikrodeletion zumindest bei den Patienten über zwei Jahren keinen Einfluss auf die Erythropoese hat.



**Abbildung 31:** Darstellung der MCHC-Werte von Patienten mit TAR-Syndrom und deren Eltern. **Blau:** MCHC-Werte der Patienten mit TAR-Syndrom, **Rosa:** Werte der Deletionsträger, **Grün:** MCHC-Werte der Familienmitglieder, bei denen keine Mikrodeletion vorliegt (**NF**). Die Streuung der Werte ist bei Patienten mit TAR-Syndrom und Familienmitgliedern ohne Mikrodeletion kleiner als bei den Deletionsträgern.

Wie oben beschrieben (Krankheitsbild JHC) würde man bei einer durch HFE2-Haploinsuffizienz verursachten vermehrten Eisenspeicherung im Gewebe eine Verminderung der Hämoglobinwerte und damit verbunden der MCHC-Werte erwarten. Diese Veränderungen sind allerdings erst im nach Jahren feststellbar, sodass es sinnvoll ist, sich die Parameter anzusehen, auf deren Werte Hämojuvelin und Hpcidin einen direkten Einfluss haben: Ferritin im Serum, Transferrinsättigung und freies Eisen im Serum<sup>116-118</sup>. In Abbildung 32 sind exemplarisch die Ferritinwerte von sechs Patienten mit TAR-Syndrom unserer Kohorte dargestellt. Zwei der Patienten ohne induzierbarem pJAK2 haben sehr niedrige Ferritinwerte im unteren Normbereich bzw. unterhalb der unteren Normgrenze (24 bzw. 9 µg / L). Vier Patienten mit intakter JAK2 Phosphorylierung haben Ferritinwerte innerhalb des Normbereiches. Diese Ergebnisse lassen eventuell auf eine Korrelation zwischen der Ausprägung des Phosphorylierungsdefektes in Thrombozyten und der Menge an Ferritin im Serum deuten.



**Abbildung 32:** Korrelation der Ferritinwerte von Patienten mit TAR-Syndrom zu deren pJAK2 Status. Rot Symbole: Ferritinwerte der Patienten ohne induzierbarem pJAK2. Grün: Ferritinwerte von Patienten mit intakter JAK2 Phosphorylierung. Patienten ohne pJAK2 haben sehr niedrige Ferritinwerte. Normbereiche: Frauen: 20 - 200 ng / mL, Männer: 30 - 300 ng / mL.

Um die Ergebnisse dieser Arbeit zusammenzufassen, kann festgehalten werden, dass die in der Literatur verbreitete Hypothese der Verbesserung der Thrombozytenwerte innerhalb der ersten Lebensjahre von Patienten mit TAR-Syndrom nur bei ca. der Hälfte der Patienten unserer Kohorte bestätigt werden konnte. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass sich das Aktivierungsmuster des JAK-STAT-Signalweges in Thrombozyten von pädiatrischen Patienten mit TAR-Syndrom von dem erwachsener Patienten hinsichtlich der JAK2-Phosphorylierung unterscheidet. Aus den Untersuchungen an Thrombozyten von Mikrodeletionsträgern folgt, dass die Mikrodeletion nicht für die verminderte bzw. defektive Phosphorylierung des JAK-STAT-Signalweges bei Patienten mit TAR-Syndrom verantwortlich ist. Schließlich konnte gezeigt werden, dass Patienten mit TAR-Syndrom keine auffälligen Werte der erythrozytären Reihe (MCV, MCHC) aufweisen, stattdessen konnte eine etwas größere Streuung der Werte bei Patienten und Elternteilen ohne Mikrodeletion festgestellt werden. Präliminäre Daten zu Parametern des Eisenstoffwechsels legen nahe, dass es vermutlich eine Korrelation zwischen Aktivierbarkeit des JAK-STAT-Signalweges in Thrombozyten und der Ferritinmenge im Serum von Patienten mit TAR-Syndrom gibt. Allerdings sind die Daten von mehr Patienten mit TAR-Syndrom notwendig, um diese Ergebnisse zu bestätigen.

## 4. DISKUSSION

Patienten mit TAR-Syndrom sind durch Radiusaplasie und Thrombozytopenie charakterisiert. In der Literatur wird eine Besserung der Thrombozytopenie nach den ersten Lebensjahren beschrieben<sup>65,67</sup>. Ballmaier *et al.*<sup>7</sup> konnten zeigen, dass die Stimulation von Thrombozyten mit TPO, dem Hauptwachstumsfaktor für MK und Thrombozyten, bei pädiatrischen Patienten mit TAR-Syndrom im Alter zwischen 6 Wochen und 8 Jahren nicht oder kaum zur Phosphorylierung von Signalmolekülen führt. In einer anderen Studie konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Januskinase JAK2, das zentrale Molekül in der TPO-Signalkaskade, bei einem Patienten mit TAR-Syndrom nicht stimuliert wird<sup>108</sup>. 2007 wurde in einer Studie nachgewiesen, dass bei 30 von 30 untersuchten Patienten mit TAR-Syndrom eine Mikrodeletion auf Chromosom 1q21.1 vorliegt. In 75% der beschriebenen Familien wurde die Deletion von einem nicht betroffenen Elternteil vererbt<sup>94</sup>.

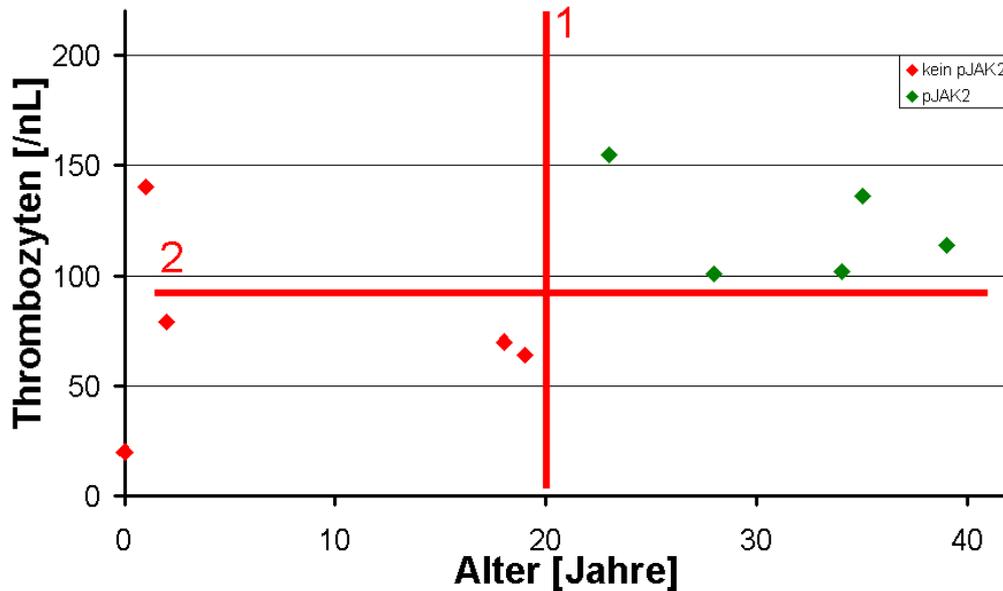
In dieser Arbeit sollte gezeigt werden, inwieweit die Beobachtungen von Hall<sup>65</sup> und Hedberg<sup>67</sup> zur Besserung der Thrombozytopenie und Blutungsneigung bei Patienten mit TAR-Syndrom auf die 26 Patienten unserer Kohorte zutreffen. Außerdem sollte überprüft werden, ob es prognostische Faktoren (z.B. Geschlecht der Patienten, Vererbung der Mikrodeletion, Ausprägung skeletaler Malformationen) für Schweregrad und Verlauf der Thrombozytopenie bei Patienten mit TAR-Syndrom gibt. Es sollte weiterhin die Phosphorylierung und Aktivierung des JAK-STAT-Signalweges in Thrombozyten von Patienten mit TAR-Syndrom bestimmt werden.

Um den Einfluss der Mikrodeletion auf das TAR-Syndrom zu untersuchen, sollte auch die TPO-Signalkaskade von Mikrodeletionsträgern charakterisiert werden. Am Beispiel von HFE2 sollte untersucht werden, ob die Mikrodeletion Einfluss auf die Entwicklung der Werte der erythrozytären Reihe wie MCV, MCHC und Ferritin hat.

### 4.1. Defektive JAK2-Phosphorylierung bei pädiatrischen Patienten mit TAR-Syndrom

Die einzigen in Thrombozyten exprimierten Januskinasen JAK2 und TYK2 werden nach TPO-Stimulation phosphoryliert und aktiviert<sup>42</sup>. Lediglich JAK2 ist essenziell, um den JAK-STAT-Signalweg in Thrombozyten zu aktivieren<sup>43</sup>. Bei Patienten mit TAR-Syndrom ist die TPO-abhängige Tyrosinphosphorylierung in Thrombozyten defekt<sup>7</sup>. Es wurde ebenfalls bei einem Patienten mit TAR-Syndrom gezeigt, dass die Kinase JAK2 nicht phosphoryliert

wird<sup>108</sup>. Ziel dieser Arbeit war es, die JAK2-Phosphorylierung in Thrombozyten bei Patienten unserer Kohorte zu bestimmen, um zu untersuchen, ob es, ähnlich wie bei der Entwicklung der Thrombozytenwerte, eine Veränderung in der JAK2-Phosphorylierbarkeit gibt. Es konnten zehn Patienten mit TAR-Syndrom untersucht werden. Hierbei wurde erstmals gezeigt, dass nicht bei allen Patienten mit TAR-Syndrom eine defekte Phosphorylierung des JAK-STAT-Signalweges vorliegt. Vielmehr ließen sich zwei verschiedene Phosphorylierungsmuster unterscheiden (Abschnitt 3.5.): Bei fünf Patienten konnte die JAK2-Phosphorylierung nicht induziert werden. Die anderen fünf Patienten wiesen einen intakten JAK-STAT-Signalweg auf. Abbildung 33 zeigt die Zusammenfassung der in dieser Arbeit erhobenen Daten zur JAK2-Phosphorylierung. Es sind zwei Geraden dargestellt, die die jeweiligen „Gruppen“ von Patienten voneinander trennen. Die mit 1 bezeichnete Gerade stellt die im Ergebnisteil bereits vorgestellte Vermutung auf, dass die „Gruppen“ sich durch das Alter der Patienten voneinander unterscheiden lassen. Dies würde bedeuten, dass Patienten mit TAR-Syndrom ab einem bestimmten Alter (ca. 20 Jahre) den Defekt in der Aktivierung des JAK-STAT-Signalweges überwinden und ebenfalls eine intakte Signalkaskade aufweisen. Dieses Modell wird durch die von Pastos *et al.*<sup>119</sup> gezeigte verminderte Reaktivität hämatopoetischer Vorläuferzellen von Kindern auf TPO unterstützt. So könnte die Verbesserung der Aktivierbarkeit auf eine Veränderung im Knochenmark zurückzuführen sein. Die mit 2 dargestellte Gerade stellt die Vermutung auf, dass nur die Patienten im schwer thrombozytopenen Bereich mit Thrombozytenwerten unter 100 / nL einen Defekt im JAK-STAT-Signalweg haben. Gegen diese Einteilung spricht, dass Patientin 32-TAR im Alter von drei Monaten und Thrombozytenwerten von 140 / nL kein pJAK2 aufweist.



**Abbildung 33:** Korrelation der Thrombozytenwerte, Alter und pJAK2 Status der Patienten mit TAR-Syndrom. Rote Symbole sind Messwerte von Patienten ohne induzierbarem pJAK2, grüne Symbole mit induzierbarem pJAK2. **1:** Trennung der beiden Phosphorylierungsmuster über das Alter der Patienten **2:** Trennung der Muster über die Thrombozytenzahl. Bei dieser Variante lässt sich Patientin 32-TAR (Thrombozytenwert 140 / nL im Alter von drei Monaten) keiner der Gruppen zuordnen.

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit lässt sich nicht sagen, ob die beiden Phosphorylierungsmuster für zwei verschiedene Verläufe des TAR-Syndroms (Patienten mit pJAK2 und Patienten ohne pJAK2) stehen oder ob alle Patienten mit einem Defekt im TPO-abhängigen JAK-STAT-Signalweg geboren werden und eine Besserung in der Signaltransduktion erfahren. Leider haben wir keinen Patienten über eine entsprechend lange Zeit untersuchen können, um zu zeigen, ob sich die Phosphorylierbarkeit ändert. In weiteren Projekten könnte man, wie bereits von de Alarcon *et al.*<sup>103</sup> oder Michalewicz *et al.*<sup>102</sup> durchgeführt, CFU-Assays mit aus Knochenmark isolierten hämatopoetischen Vorläuferzellen durchführen, um Anzahl und Funktion der MK von Patienten mit TAR-Syndrom verschiedenen Alters zu untersuchen. Allerdings werden heutzutage im klinischen Alltag nur noch selten Knochenmarkpunktionen bei Kindern durchgeführt.

Hall<sup>65</sup> und Hedberg<sup>67</sup> beschreiben bei Patienten mit TAR-Syndrom eine Verbesserung der Thrombozytopenie und Blutungstendenz nach den ersten beiden Jahren. Wir konnten die Verbesserung jedoch nur für etwas mehr als die Hälfte der Patienten unserer Kohorte bestätigen (Abbildung 10). Dennoch konnten wir für nahezu alle Patienten mit TAR-Syndrom unserer Kohorte eine Besserung zeigen (Abbildung 12). Da der Zeitpunkt der Besserung für die Thrombozytopenie (ca. 2. Lebensjahr) nicht mit dem möglichen Zeitpunkt für eine Veränderung in der Phosphorylierbarkeit (ca. 20. Lebensjahr) übereinstimmt, vermuten wir,

dass die verschiedenen Phosphorylierungsmuster (Abbildung 33 - rote und grüne Symbole) für zwei „Gruppen“ von Patienten mit TAR-Syndrom stehen. Für diese Möglichkeit spricht, dass es bislang kein nachgewiesenes biologisches Modell gibt, welches eine Veränderung in der Phosphorylierbarkeit eines Proteins nach 20 Jahren erklären würde. Ein möglicher Ansatz, der den Übergang von einer „Gruppe“ zur Anderen unterstützt, ist, dass es während der Pubertät zu Knochenmarkveränderungen kommt, die einen Anstieg der Thrombozytenwerte zur Folge haben. Die Vererbung und das Geschlecht der Patienten haben vermutlich keinen Einfluss auf das klinische Bild der TAR-Patienten: Abbildung 10B und 10C zeigen, dass es sowohl bei Patienten mit maternal, paternal oder *de novo* vererbter Mikrodeletion zu einer Besserung der Thrombozytopenie kommen kann. Außerdem zeigen sowohl männliche als auch weibliche Patienten einen Anstieg der Thrombozytenwerte. Tabelle 6 zeigt, dass sowohl bei Patienten mit intaktem Signalweg als auch bei Patienten ohne phospho-JAK2 maternale Vererbung vorliegen kann. In beiden „Gruppen“ kommen sowohl weibliche als auch männliche Patienten mit TAR-Syndrom vor. Es kann festgehalten werden, dass das Geschlecht der Patienten und die Vererbung der Mikrodeletion vermutlich keinen prognostischen Wert auf den Verlauf der Thrombozytopenie und die Phosphorylierbarkeit von JAK2 haben. Aufgrund der geringen Patientenzahl dieser Studie (zehn) und der niedrigen Inzidenz des TAR-Syndroms (ca. 1-2 / 1000000 Lebendgeburten), ist es schwierig, Prognosen zu formulieren.

**Tabelle 6:** Zusammenhang zwischen pJAK2-Status und klinischem Bild der Patienten

	Alter	GS	Ver	Thr	Bl	DH	UH	HH	SH	HD	A
<b>kein pJAK2</b>											
03	18	w	mat	70	E	x	x				Gvr
32	0,5	w	pat	140		x	x		x		
33	0,25	m	n.b.	20	n.b.						
34	19	w	pat	64		x	x	x	x	x	Gvl
36	2	m	mat	79		x	x	x	x		
<b>pJAK2</b>											
01	28	w	mat			x	x	x		x	
26	23	m	mat	155			x			x	
27	34	w	mat	102	n.b.						
35	39	m	n.b.	114	n.b.		x	x		x	Gvl
37	37	w	n.b.	136	n.b.						

**GS:** Geschlecht, **Ver:** Vererbung, **Thr:** Thrombozytenwerte zum Zeitpunkt der Experimente [/nL], **Bl:** Blutungszeichen, **w:** weiblich, **m:** männlich, **mat:** maternal, **pat:** paternal, **n.b.:** nicht bestimmt, **E:** Epistaxis, **DH:** Daumenhypoplasie, **UH:** Ulnahypoplasie, **HH:** Humerushypoplasie, **SH:** Schulterhypoplasie, **HD:** Hüft dysplasie, **Gvr:** Genu vara, **Gvl:** Genu valga

#### 4.2. Potentielle Kandidatengene innerhalb des Mikrodeletionsbereiches 1q21.1 für das klinische Bild des TAR-Syndroms

**Tabelle 7:** Gene innerhalb des Mikrodeletionsbereiches 1q21.1 sowie deren Funktion

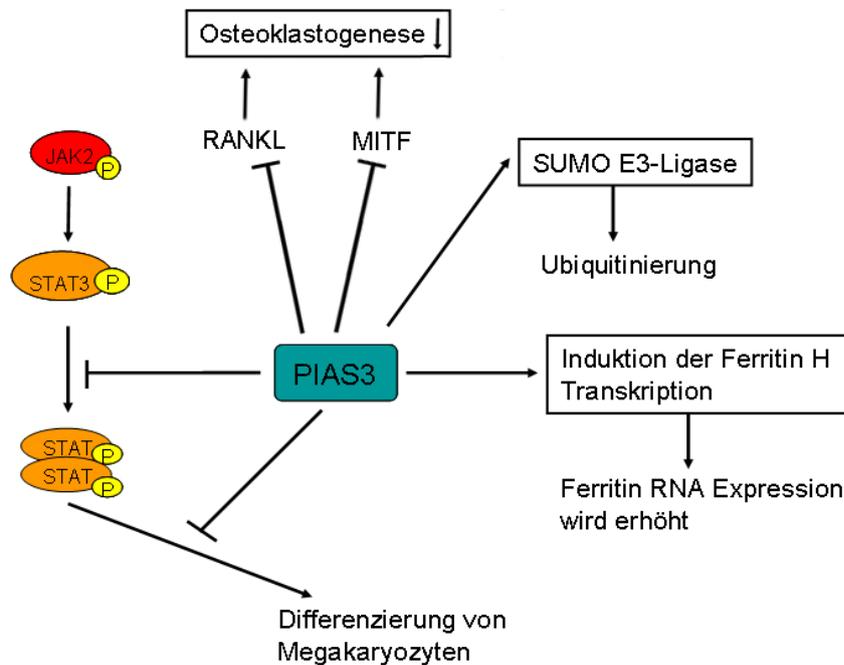
Genname	Name	Mausmodell	bekannte Funktion des Proteins	Publikation
HFE2	Hemojuvelin 2	Huang 2005	Hämojuvelin induziert Expression des Eisenregulators Heparin	<sup>120</sup>
TXNIP	Thioredoxin interacting protein / Vitamin D <sub>3</sub> up regulated protein 1	Bodnar 2002	Redoxprotein, das Apoptose induziert, ubiquitär exprimiert	<sup>121</sup>
POLR3GL	DNA-directed RNA polymerase III subunit G-like	-	Untereinheit der RNA-Polymerase III	
ANKRD34	Ankyrin repeat domain 34	-	Zytoplasmatisches Strukturprotein	
LIX1L	Limb expression 1-like	-	Während Ausbildung der hinteren Gliedmaßen von Hühnern zeitweise und lokal begrenzt exprimiert	<sup>122</sup>
GNRHR2	Gonadotropin releasing hormone (type 2) receptor 2	-	Rezeptor eines Regulators der Reproduktionskompetenz (GNRH Typ II)	<sup>123</sup>
RBM8A	RNA binding motif protein 8A	-	RBM8A Protein steigert STAT3 Transkriptionsaktivität	<sup>124</sup>
PEX11B	Peroxisomal biogenesis factor 11 beta	Li 2002	Peroxisomales Membranprotein	<sup>125</sup>
ITGA10	Integrin alpha 10	Wenke 2007 <sup>*1</sup>	Kollagen Typ II bindendes Integrin	<sup>126</sup>
ANKRD35	Ankyrin repeat domain 35	-	Zytoplasmatisches Strukturprotein	
PIAS3	Protein inhibitor of activated STAT3	Brantley 2008 <sup>*2</sup>	Negativer Regulator von STAT3 Weitere Funktionen: siehe unten	<sup>58</sup>
NUDT17	Nudix motif 17	-	Hydrolyse von Nucleosidphosphaten	<sup>127</sup>
POLR3C	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC3	-	Untereinheit der RNA-Polymerase III	
ZNF364	Zinc finger protein 364	Chen 2006 <sup>*3</sup>	E3 Ligase mit RING-Domäne	<sup>128</sup>
CD160	CD160 antigen: NK-cell receptor BY 55	-	NK-Zell Rezeptor	
PDZK1	PDZ domain-containing protein 1	Kocher 2003	Regulation des Cholesterinspiegels über SR-B1	<sup>129</sup>

<sup>\*1</sup>: ITGA10 Antisense-Konstrukt, <sup>\*2</sup>: PIAS3 siRNA, <sup>\*3</sup>: ZNF364 siRNA

In Tabelle 7 sind die Gene des Mikrodeletionsbereiches auf Chromosom 1q21.1 sowie die bekannten Funktion der Proteine, für die sie kodieren, aufgelistet. Von den Genen HFE2, TXNIP, PEX11B und PDZK1 sind in der Literatur Knock-out-Mausmodelle beschrieben (Literaturangaben in der Tabelle). Für die Depletion der Gene ITGA10, PIAS3 und ZNF364 gibt es siRNAs zur Simulation knock-out-ähnlicher Phänotypen. Der Ergebnisteil 3.9. dieser Arbeit zeigt, dass in immortalisierten B-Lymphozyten (LCLs) von Patienten mit TAR-Syndrom die RNA-Expression der Gene im Deletionsbereich nicht vermindert ist. Das in den LCLs bestimmte Expressionsprofil dieser Gene ist allerdings gewebespezifisch: So kann dieses Profil in Zellen, die auf TPO reagieren, wie z.B. Thrombozyten durchaus anders sein. Aufgrund der in 1.3.3. bereits vorgestellten negativen Regulierung des JAK-STAT-Signalweges durch PIAS3 und der in 3.10. vorgestellten positiven Regulierung des Eisenstoffwechsels durch HFE2 werden diese beiden im Folgenden genauer diskutiert. Zunächst werden die verschiedenen Funktionen von PIAS3-Protein und die Verknüpfung zur Megakaryopoese erläutert. Abschließend werden in diesem Abschnitt das Protein Hämojuvelin (HFE2) und seine fördernde regulatorische Funktion auf den Eisensensor Hemojuvelin vorgestellt.

PIAS3 ist ein Akronym für *protein inhibitor of activated STAT3*. In Abbildung 34 ist das Funktionsspektrum von PIAS3 schematisch dargestellt. PIAS3 vermindert die DNA-Bindung von aktiviertem STAT3<sup>58</sup>. Weiterhin reguliert PIAS3 die Aktivität der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B, SMAD und p53 unter anderem als *small ubiquitin like modifier* (SUMO)-E3 Ligase<sup>130-132</sup>. PIAS3 ist ein negativer Regulator der Osteoklastogenese. Es wirkt an osteoklastischen Vorläufern durch Inhibition von *microphthalmia associated transcription factor* (MITF), dadurch kommt es zu verminderter Expression der Transkriptionsfaktoren c-fos und NFATc1 und somit zu einer verminderten Ausreifung von knochenabbauenden Osteoklasten<sup>133,134</sup>. PIAS3 wirkt zusätzlich an Osteoblasten durch Inhibition von aktiviertem STAT3. Daraus resultiert eine verminderte Expression von RANKL, ein positiver Regulator von MITF<sup>134</sup>. Anhand dieser Funktionen kann PIAS3 eine knochenerhaltende Aufgabe zugesprochen werden. In einem anderen Projekt könnte daher die Knochendichte von Patienten mit TAR-Syndrom untersucht werden, um zu zeigen, ob Hemizygotie von PIAS3 zu einer Veränderung der Knochendichte führt.

Eine weitere Funktion von PIAS3 ist die Förderung der Expression von Ferritin H-RNA, die für eine Untereinheit des Ferritinproteins kodiert<sup>135</sup>. Somit hat neben dem im Folgenden besprochenen Protein Hämojuvelin, dessen Gen ebenfalls auf Chromosom 1q21 liegt, auch PIAS3 eine regulatorische Funktion auf den Eisenhaushalt.

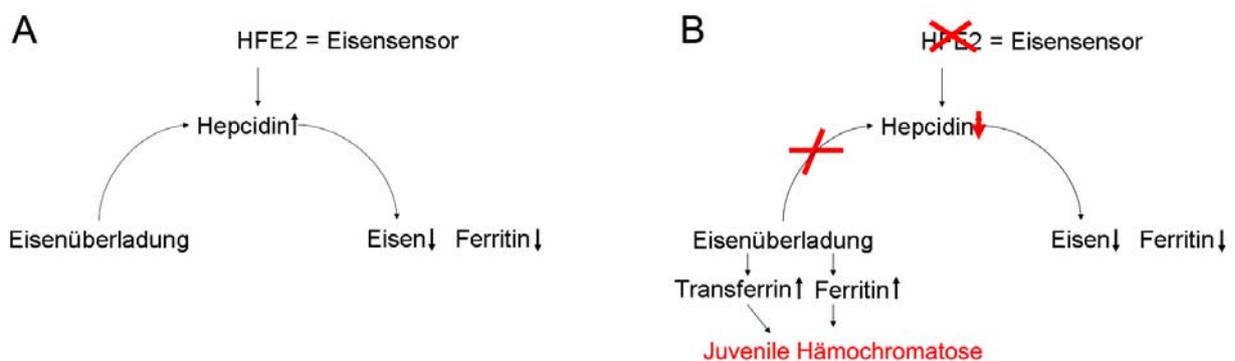


**Abbildung 34:** Übersicht über das PIAS3-Funktionsspektrum. PIAS3 ist negativer Regulator des JAK-STAT-Signalweges unter anderem in Megakaryozyten und Thrombozyten. Außerdem inhibiert PIAS3 die Expression von RANKL und des Transkriptionsfaktors MITF und hemmt damit indirekt die Osteoklastogenese. Es trägt als SUMO E3-Ligase zur Ubiquitinierung von Proteinen bei und induziert die Transkription von Ferritin H-RNA.

Eine der eben genannten Funktionen von PIAS3 ist die Verminderung der DNA-Bindung von aktiviertem STAT3<sup>58</sup>. Bei Patienten mit TAR-Syndrom und Trägern der Mikrodeletion ist eine verminderte Genexpression von PIAS3 zu erwarten, da nur die genetische Information eines Allels vorhanden ist. Unsere Arbeitsgruppe hat gezeigt, dass PIAS3-Protein in Thrombozyten von Patienten mit TAR-Syndrom exprimiert wird (unveröffentlichte Daten). Es wird vermutet, dass PIAS3 auch negativer Regulator der Megakaryopoese ist. Der Nachweis der Mikrodeletion auf Chromosom 1q21 lässt eine verminderte Inhibition der STAT3-Funktion bei verminderter Expression von PIAS3-Protein in Megakaryozyten vermuten. Das könnte zur Folge haben, dass, wie im Abschnitt 1.3. beschrieben, die Differenzierung von megakaryozytären Vorläufern zu Thrombozyten erhöht ist und eine erhöhte Anzahl an Thrombozyten im Blut messbar sein könnte. Stattdessen haben aber Patienten mit TAR-Syndrom eine verminderte Anzahl von Thrombozyten im peripheren Blut (Ergebnisteil 3.2. - Abbildung 12). Präliminäre Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass die Expression von PIAS3-Protein in Thrombozyten von Patienten mit TAR-Syndrom nicht einheitlich ist (Daten nicht dargestellt). Es ist bislang unklar, ob es

einen Zusammenhang zwischen der PIAS3-Expression und dem Schweregrad der Thrombozytopenie beim TAR-Syndrom gibt.

Patienten mit TAR-Syndrom weisen im Alter von bis zu einem Jahr eine Anämie auf, deren Ätiologie unbekannt ist. Aufgrund der geringen Ferritinwerte jener Patienten ohne phosphorylierbarem JAK2 (Abschnitt 3.10.) wird nun HFE2 betrachtet, welches das zweite Gen des Mikrodeletionsbereiches ist, das in dieser Arbeit genauer besprochen werden soll. HFE2 kodiert für das Protein Hämojuvelin. Dieses Protein ist erstmals im Zusammenhang mit der juvenilen Form der Hämochromatose beschrieben worden: Eine *loss-of-function* Mutation im HFE2-Gen führt zu diesem Krankheitsbild<sup>136</sup>. Ist Hämojuvelin mutiert, wird die RNA des Eisenregulators Hepcidin kompetitiv herunterreguliert<sup>137</sup>. In Abbildung 35 A ist der physiologische Ablauf der Hepcidin-regulierten Eisenverminderung im peripheren Blut dargestellt. In Abbildung 35 B ist gezeigt, dass die durch Hepcidin gesteuerte Eisenaufnahme in das Gewebe bei mutiertem HFE2 ausbleibt. Das Resultat ist das klinische Bild der juvenilen Hämochromatose: erhöhte Eisen-, Transferrin- und Ferritinspiegel im Blut.



**Abbildung 35:** Schematische Darstellung der HFE2 Funktion. **A:** Der Eisensensor HFE2 reguliert die Hepcidinexpression. Hepcidin ist der Hauptregulator der Eisenüberladung. **B:** Wenn HFE2 mutiert ist und seine Funktion verliert, wird HFE2 herunterreguliert und somit bleibt die Kompensation der Eisenüberladung aus. Es folgen erhöhte Eisen-, Transferrin- und Ferritinwerte im Serum: das klinische Bild der juvenilen Hämochromatose.

Patienten mit TAR-Syndrom und Träger der Mikrodeletion haben aufgrund der Mikrodeletion nur ein Allel mit der genetischen Information für das Protein Hämojuvelin. Bei Haploinsuffizienz bedeutet dies, dass die verminderte Gendosis von HFE2 zu einem ähnlichen Krankheitsbild, wie der juvenilen Hämochromatose, führen könnte. Eine wichtige Aufgabe ist daher, die Eisen-, Transferrin- und weitere Ferritinwerte von Patienten mit TAR-Syndrom zu

überprüfen, um zu zeigen, ob die verminderte Gendosis von HFE2 zur Erhöhung dieser Werte führt und die Anämie bei Patienten mit TAR-Syndrom erklären kann.

Da der Gegenstand dieser Arbeit darin bestand, den TPO-abhängigen Signalweg in Thrombozyten von pädiatrischen und erwachsenen Patienten mit TAR-Syndrom zu untersuchen und miteinander zu vergleichen, konnte die genauere Charakterisierung des Einflusses der Mikrodeletion auf die hämatologische Ausprägung des TAR-Syndroms nicht vertieft werden. Daher sollten in einem anderen Projekt weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um den vermuteten Einfluss der Mikrodeletion auf Chromosom 1q21.1 zu bestätigen: Es könnte untersucht werden, ob es eine Korrelation zwischen den Genen HFE2 bzw. PIAS3 und den Unterschieden (Abschnitt 3.5.) bzw. dem Defekt im TPO-abhängigen Signalweg in Thrombozyten existiert. Wegweisend dafür ist, dass unsere Arbeitsgruppe bereits zeigen konnte, dass Patienten mit TAR-Syndrom PIAS3-Protein unterschiedlich stark exprimieren und Abbildung 33 zeigt, dass Patienten ohne pJAK2 verminderte Ferritinwerte haben. Mit Knockout-Mausmodellen und siRNA der Gene (Tabelle 5) können in anderen Organismen bzw. Zellsystemen eventuell die hämatologischen Veränderungen beim TAR-Syndrom simuliert werden und der Einfluss der Mikrodeletion auf die Verbesserung der Thrombozytenwerte bzw. die transiente Anämie bei pädiatrischen Patienten mit TAR-Syndrom weiter untersucht werden. Im diesem Abschnitt wurde der mögliche Einfluss der Mikrodeletion auf das klinische Bild des TAR-Syndroms diskutiert. Es ist bekannt, dass die Mikrodeletion zur Ausprägung des TAR-Syndroms nicht ausreichend ist. Im Folgenden sollen mögliche Kandidaten für den zweiten Faktor, der zur Entstehung des TAR-Syndroms benötigt wird, den so genannten *TAR-modifier*, diskutiert werden.

#### **4.3. Die Mikrodeletion 1q21.1 reicht nicht aus, um am TAR-S zu erkranken, ein „modifier“ oder „second hit“ wird benötigt**

Im Abschnitt 1.5.3. der Einleitung wurde beschrieben, dass bei ca. 60% der Patienten die Mikrodeletion von einem der nicht betroffenen Elternteile vererbt wurde. Das bedeutet, dass die Mikrodeletion nicht hinreichend ist, um am TAR-Syndrom zu erkranken. Es muss einen zweiten Faktor geben, der zur Entstehung des TAR-Syndroms führt. Klopocki *et al.*<sup>94</sup> bezeichnen diesen Faktor als „TAR-modifier“. Es wird somit auch von einer digenetischen Erkrankung gesprochen. Eine Hypothese ist, dass bei einer digenetischen Erkrankung eine sehr seltene Veränderung (beim TAR-Syndrom die Mikrodeletion auf Chromosom 1q21.1) und eine relativ häufige in der

Bevölkerung weit verbreitete Veränderung (der noch unbekannte „*TAR-modifier*“ oder „*second hit*“) zusammen vorkommen. In dieser Arbeit wurden bereits mögliche Kandidaten, wie z.B. Proteine des JAK-STAT-Signalweges in Thrombozyten, genannt, die im folgenden Abschnitt als *TAR-modifier* diskutiert werden sollen.

JAK2 ist die essenzielle Kinase in Thrombozyten, die nach TPO-Stimulation aktiviert wird und weitere Signalmoleküle des JAK-STAT- und anderer Signalwege phosphoryliert<sup>42</sup>.

Abschnitt 3.4. des Ergebnisteils zeigt, dass in der JAK2-cDNA von Patienten mit TAR-Syndrom keine Mutation vorliegt. Es gilt zu klären, ob Mutationen in anderen Proteinen des JAK-STAT-Signalweges vorliegen. Es konnte gezeigt werden, dass die STAT-Moleküle STAT1, STAT3 und STAT5 in Thrombozyten von Patienten mit TAR-Syndrom phosphoryliert werden, aber es wurde nicht gezeigt, ob diese auch biologisch aktiv sind. Präliminäre Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen jedoch, dass phosphorylierte STAT3-Homodimere in Thrombozyten von Patienten mit TAR-Syndrom an DNA binden (Daten nicht dargestellt). Huang *et al.*<sup>138</sup> haben gezeigt, dass in einem STAT1-knock-out-Mausmodell ein Defekt in der Endomitose der megakaryozytären Vorläufer besteht. Eine Möglichkeit ist, dass bei Patienten mit TAR-Syndrom eine Mutation im STAT1-Gen vorliegt, das für ein Protein kodiert, welches zwar exprimiert und phosphoryliert wird, jedoch nicht aktiviert wird, z.B. weil die Translokation in den Zellkern durch eine Mutation verhindert wird und somit die Endomitose in MK von Patienten nicht positiv reguliert. Die Folge dieser ausbleibenden Aktivierung wäre eine verminderte Ploidie der MK und somit eine verminderte Zahl an freigesetzten Thrombozyten im peripheren Blut.

Abbildung 3 stellt neben dem JAK-STAT-Signalweg weitere Signalwege dar, die durch TPO in Thrombozyten aktiviert werden können. Bei Patienten mit TAR-Syndrom wurde die Phosphorylierung der Proteine dieser beiden anderen Signalwege bislang nicht untersucht. Es ist denkbar, dass Proteine dieser Signalwege bei Patienten ebenfalls nicht phosphoryliert werden. Abbildung 3 zeigt, dass pJAK2 zur Aktivierung des MAPK-ERK-Signalweges führt. Da die Kinasen ERK1 und ERK2 die Differenzierung und Proplättchenformation positiv beeinflussen, könnte eine verminderte Phosphorylierung dieser Kinasen durch fehlende JAK2-Phosphorylierung den von Letestu beschriebenen Differenzierungsarrest auf Ebene der CD41+/CD42- Vorläuferzellen im Knochenmark von Patienten mit TAR-Syndrom erklären<sup>105,139,140</sup>.

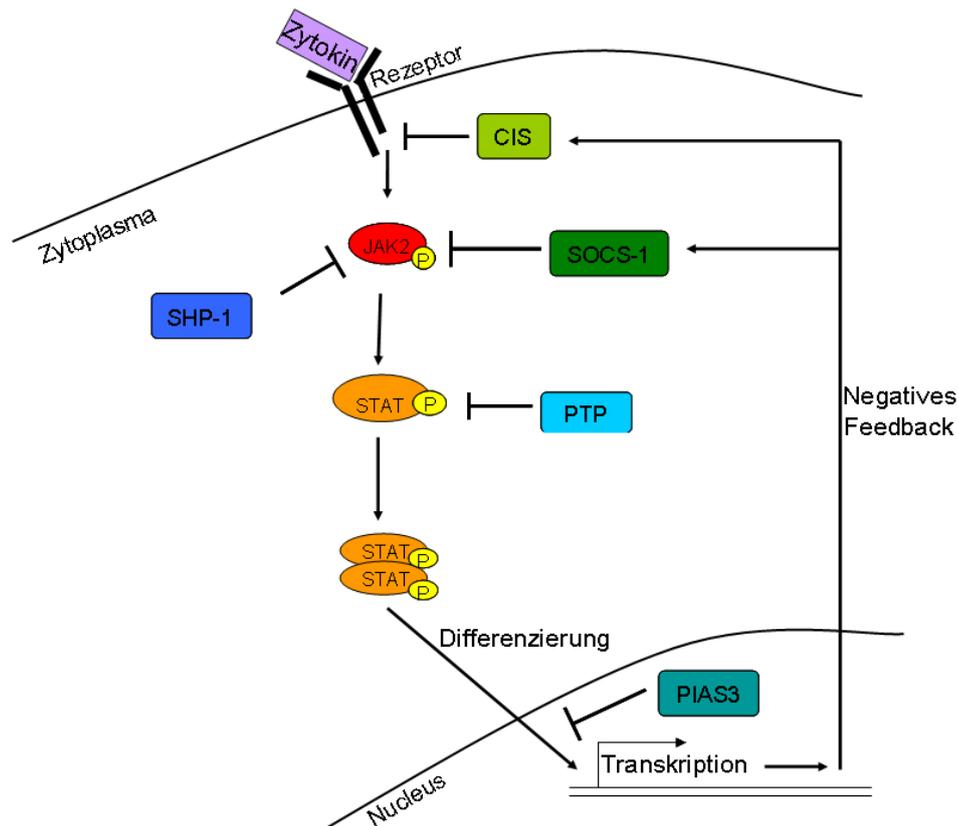
Ein weiterer in Thrombozyten aktivierter Signalweg ist der PI3K-Akt-Signalweg. Millot *et al.*<sup>139</sup> haben gezeigt, dass dieser Signalweg die Proliferation fördert und antiapoptotisch wirkt. Eine Vermutung ist, dass bei verminderter bzw. ausbleibender JAK2-Phosphorylierung die Förderung der Proliferation und Inhibition der Apoptose ausbleibt und somit weniger Thrombozyten

gebildet werden bzw. mehr MK in den programmierten Zelltod übergehen. Gilio *et al.*<sup>141</sup> haben beschrieben, dass die PI3K-Isoformen  $\alpha$  und  $\beta$  eine nonredundante Funktion in der  $\delta$ -Degranulierung von Thrombozyten haben. Yin *et al.*<sup>142</sup> haben beschrieben, dass Akt-Knockout Mäuse eine verminderte GP-Ib/IX induzierte Aggregation der Thrombozyten haben. Die Folge einer verminderten Degranulierung und Aggregation sind erhöhte Blutungsneigungen, die häufig bei Patienten mit TAR-Syndrom beobachtet wurden (Ergebnisteil 3.1. - Tabelle 4). Im Abschnitt 3.7. dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die P-Selektin-Expression nach ADP-Stimulation, als Zeichen der  $\alpha$ -Degranulierung, bei drei Patienten mit TAR-Syndrom unserer Kohorte nicht beeinträchtigt ist, obwohl Patienten mit TAR-Syndrom beschrieben worden sind, deren Thrombozyten Funktionsdefekte aufweisen<sup>143,144</sup>.

Um diese Hypothesen zu bestätigen, sollte in Zukunft die Phosphorylierung der Kinasen ERK1/2 in Thrombozyten von Patienten mit TAR-Syndrom untersucht werden sowie die Phosphorylierung von Akt exemplarisch für den PI3K-Akt-Signalweg. Spezifische Antikörper gegen phosphorylierte Epitope dieser Proteine sind kommerziell erhältlich, sodass die in dieser Arbeit etablierte Methode (Abschnitt 3.3.) für weitere in Thrombozyten aktivierte Signalwege angewendet werden kann. Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bestand darin, den JAK-STAT-Signalweg bei Patienten mit TAR-Syndrom hinsichtlich Kinetik und Ausmaß der Phosphorylierung zu charakterisieren. Die oben beschriebenen Experimente zu den beiden anderen Signalwegen in Thrombozyten konnten im Rahmen dieser Arbeit wegen der geringen verfügbaren Menge an Blut und damit an Thrombozyten von Patienten mit TAR-Syndrom nicht durchgeführt werden.

Der in Abbildung 3 dargestellte intrazelluläre JAK-STAT-Signalweg hat eine Vielzahl negativer Regulatoren. Ihre Funktion ist es, die biologische Aktivität der Proteine dieses Signalwegs zu beenden. Abbildung 36 zeigt schematisch die verschiedenen negativen Regulatoren des JAK-STAT-Signalweges, die Greenhalgh *et al.*<sup>145</sup> zusammengefasst haben. In MK und Thrombozyten wird der *suppressor of cytokine signalling* (SOCS)-1 als negatives Feedback von aktivierten STAT-Dimeren exprimiert. Wang *et al.*<sup>146</sup> haben gezeigt, dass SOCS-1 den TPO-abhängigen Signalweg inhibiert. SOCS-1 blockiert die Phosphorylierungsepitope von JAK2<sup>57</sup>. Ein weiterer negativer Regulator des JAK-STAT-Signalweges ist das *cytokine inducing SH2-containing protein* (CIS). Dessen Expression wird ebenfalls als negatives Feedback von Zielgenen der STAT-Dimere induziert<sup>147</sup>. CIS-1, welches in Thrombozyten exprimiert ist, bindet intrazellulär an den TPO-Rezeptor, sodass weder Januskinasen noch STAT-Moleküle an diesen binden können<sup>148</sup>. Weitere Phosphatasen sind *SH2-domain containing phosphatase* (SHP)-1 und *protein*

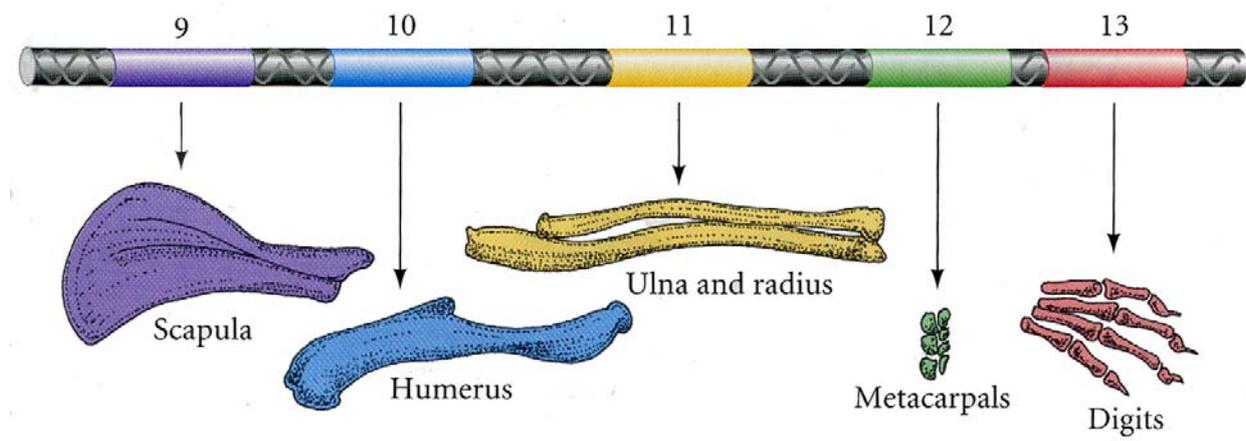
*tyrosine phosphatase* (PTP), welche die Phosphorylierung der Januskinasen bzw. der STAT-Moleküle vermindern<sup>149</sup>. Neben den eben genannten zytoplasmatischen Inhibitoren gibt es auch nukleäre Inhibitoren. Der wichtigste Vertreter dieser Gruppe ist das in Abschnitt 4.2. bereits genauer vorgestellte PIAS3. Eine Hypothese ist, dass bei Patienten mit TAR-Syndrom einer der in Abbildung 36 dargestellten negativen Regulatoren entweder hochreguliert ist oder eine *gain-of-function* Mutation hat. Um dieser Fragestellung nachzugehen, sollte zunächst im Immunoblotting-Verfahren die Expression dieser Inhibitoren in Thrombozyten nachgewiesen werden und anschließend die DNA dieser Proteine sequenziert werden. Das Problem bei diesem Ansatz ist, dass Thrombozyten kernlose Zellfragmente sind, sodass eine eventuelle transkriptionale Regulation in diesem System nicht untersucht werden kann. Alternativ können durch Knochenmarkpunktion MK isoliert werden und der Einfluss der negativen Regulatoren auf die fehlende JAK2-Phosphorylierung in *ex vivo*-Experimenten untersucht werden. Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung der transkriptionalen Regulation in MK wäre die bereits von Letestu *et al.*<sup>105</sup> beschriebene Isolation von CD34+ HSC aus peripherem Blut, welche *in vitro* zu MK differenziert werden können.



**Abbildung 36:** Darstellung der negativen Regulatoren des JAK-STAT-Signalweges. Es gibt verschiedene zytoplasmatische und nukleäre Inhibitoren dieses Signalweges. Zu den zytoplasmatischen gehören *cytokine inducing SH2-containing protein* (CIS), *suppressor of cytokine signalling* (SOCS)-1, *SH2-Domain-containing Protein* (SHP)-1 und *Protein Tyrosin Phosphatasen* (PTP). PIAS3 ist ein nukleärer Inhibitor von aktiviertem STAT3. Die Transkription von CIS und SOCS-1 wird von aktivierten STAT-Dimeren induziert, sodass diese als negative Feedbackmoleküle betrachtet werden können.

Um den „TAR-modifier“ zu identifizieren und damit das Auftreten der Thrombozytopenie und der beidseitigen Radiusaplasie bei Patienten mit TAR-Syndrom zu erklären, könnte auch der gemeinsame embryogenetische Abschnitt von Hämatopoese/Megakaryopoese und Zeugopodentwicklung, der ab der dritten Embryonalwoche stattfindet, untersucht werden<sup>150</sup>. Bonsi *et al.*<sup>151</sup> haben gezeigt, dass bei Patienten mit TAR-Syndrom eine Mutation im nicht kodierenden 5'-Ende des TGF- $\beta$ 2-Gens vorliegt. TGF- $\beta$ 2 ist ein positiver Regulator der Megakaryopoese und Osteogenese. Eine weitere für Hämatopoese und Osteogenese gemeinsame Transkriptionsfaktorfamilie ist die Homeobox (HOX)-Familie<sup>152</sup>. Die HOX-Gene induzieren die gerichtete Expression der Extremitäten. Abbildung 37 zeigt die Zuordnung der HOX-Gengruppen zum jeweiligen Knochen der oberen Extremität. Fleischmann *et al.*<sup>111</sup> haben die cDNA der HOX-Gene HOXA10, HOXA11 und HOXD11 von Patienten mit TAR-Syndrom sequenziert und nachgewiesen, dass diese nicht mutiert sind. Trotzdem könnte es durch Mutationen im Promoterbereich oder Defekte in Enzymen posttranslationaler Modifikation zur

verminderten oder fehlenden funktionalen HOX-Protein kommen. Andererseits könnten auch epigenetische Veränderungen, wie Methylierung oder Acetylierung, in den DNA-Abschnitten der HOX-Gene vorliegen, die bei einer Sequenzierung, wie von Fleischmann *et al.*<sup>111</sup> durchgeführt, nicht entdeckt werden.



**Abbildung 37:** HOXA-Gengruppen 9-13 induzieren die gerichtete Expression der oberen Extremität, nach Gilbert „*Developmental biology*“ 7<sup>th</sup> edition. Mit Stylopod werden Scapula und Humerus bezeichnet, Zeugopod beschreibt Ulna und Radius. Autopod umfasst die Handwurzelknochen und Fingerknochen.

In Tabelle 8 sind die in der Literatur bisher veröffentlichten Knockout-Mausmodelle wichtiger Gene, die die Gliedmaßenentwicklung beeinflussen, beschrieben. Eine im *Tbx5*-Gen vorkommende heterozygote *loss-of-function* Mutation verursacht beim Menschen das Holt-Oram-Syndrom (HOS). Patienten mit diesem Syndrom haben angeborene Herzanomalien und Malformationen der oberen Extremitäten<sup>153,154</sup>. Das HOS ist eine wichtige Differentialdiagnose des TAR-Syndroms. Wenn eine Mutation im *Tbx5*-Gen das Krankheitsbild des HOS verursacht, könnte man vermuten, dass bei einer phänotypisch sehr ähnlichen Krankheit wie dem TAR-Syndrom eine Mutation im gleichen oder einem funktionell verknüpften Gen, wie z.B. den HOX-Genen, vorliegt. Podlasek *et al.*<sup>155</sup> haben herausgefunden, dass HOXA10-defiziente männliche Mäuse eine verminderte Ausprägung der Geschlechtsorgane haben. In Tabelle 4 des Abschnitts 3.1. dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass auch Patienten mit TAR-Syndrom Veränderungen des Urogenitaltraktes haben. Vier der fünf Patienten mit diesen Veränderungen sind männliche Patienten, die in den meisten Fällen die Mikrodeletion 1q21 von der Mutter vererbt bekommen haben.

**Tabelle 8:** Knock-out-Modelle wichtiger Gene, die die Gliedmaßenentwicklung beeinflussen

Gen	Modell	Phänotyp / humane Erkrankung	Artikel
FGF10	-/- Maus	fehlende Ausreifung der hinteren Gliedmaßen	156
Tbx4	-/- Maus	nicht lebensfähig, stirbt an Tag 10,5 post conceptionem	157
Tbx5	Heterozygote Menschen	Holt-Oram-Syndrom Herzanomalien und skeletale Malformationen der ob. Ex.	153 154
HOXA 10	-/- Maus (männlich)	verminderte Ausprägung der Geschlechtsorgane keine Angaben zu Skelettfehlbildungen	155
HOXA 11, HOXD 11	-/- Maus	Verlust des Zeugopods	158
HOXA 13, HOXD 13	-/- Maus	Verlust des gesamten Autopods	159

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass zur Identifikation des TAR-modifiers verschiedenen Ansätzen nachgegangen werden kann: Zum einen könnte die Expression negativer Regulatoren des JAK-STAT-Signalweges untersucht werden und zum anderen könnte die gemeinsame embryogenetische Phase der Hämatopoese und Zeugopodentwicklung nach Mutationen und verminderter Expression beteiligter Gene bzw. Proteine untersucht werden.

#### 4.4. Zuordnung des TAR-Syndroms zu den BMFS

Knochenmarkfehlsyndrome (*Bone marrow failure syndromes* (BMFS)) sind Erkrankungen, bei denen, wie im Abschnitt 1.4. dieser Arbeit bereits erläutert, eine gestörte Bildung von Blutzellen im Knochenmark vorliegt<sup>61</sup>. Man teilt BMFS nach der Anzahl der Blutzellreihen, deren Bildung defekt ist, in zwei Gruppen ein: So gibt es Panzytopenien wie z.B. die Fanconi Anämie, bei der die Patienten in den meisten Fällen eine aplastische Anämie entwickeln<sup>62</sup>. Die andere Gruppe beschreibt die *single cytopenias*. Das sind Zytopenien, bei denen Blutzellen einer einzelnen Zellreihe vermindert ausgereift werden, so haben Patienten mit schwerer kongenitaler Neutropenie nur einen Defekt in der Ausreifung neutrophiler Granulozyten. Bei den meisten

Patienten mit TAR-Syndrom ist die Thrombozytopenie die einzige hämatologische Veränderung, die nicht in den ersten Monaten zurückgeht. Es wird in der Literatur von vielen Autoren zu den *single cytopenias* gezählt<sup>63</sup>. Im Abschnitt 3.2. dieser Arbeit konnte die in der Literatur zum TAR-Syndrom verbreitete Aussage, dass Thrombozytenwerte in den ersten zwei Lebensjahren steigen, für die Hälfte der Patienten unserer Kohorte bestätigt werden. Dies spricht gegen eine Einordnung des TAR-Syndroms als typisches BMFS.

Die Literatur zum TAR-Syndrom zeigt widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der Knochenmarkfunktion von Patienten mit TAR-Syndrom: Einige Autoren konnten zeigen, dass weder bei *in vitro*-Experimenten Wachstum von MK-Kolonien zu verzeichnen ist noch im Knochenmarkausstrich eine normale Anzahl an MK zu finden ist<sup>7,104,160</sup>. DeAracon *et al.*<sup>103</sup> konnten jedoch ein normales Wachstum dieser Kolonien mit veränderter Morphologie (vergrößerte Zellzahl bei kleinerer Zellgröße) zeigen. Weiterhin wurden kontroverse Ergebnisse bezüglich der MK Kolonie-stimulierenden Aktivität von Patientenserum publiziert: deAracon *et al.*<sup>103</sup> und Michaelevicz *et al.*<sup>102</sup> finden normale bis verminderte Kolonie-stimulierende Aktivität in den Blutserum von Patienten mit TAR-Syndrom, wohingegen Ballmaier *et al.*<sup>7</sup>, Homans *et al.*<sup>104</sup> und Letestu *et al.*<sup>105</sup> erhöhte Aktivität fanden. Die beschriebenen Veränderungen im Knochenmark und die in dieser Arbeit bestätigte anhaltende Thrombozytopenie bei der Hälfte der Patienten unserer Kohorte sind Merkmale, die dafür sprechen, dass das TAR-Syndrom in die Gruppe der *single cytopenias* der BMFS zugeordnet wird.

In dieser Arbeit wurden erstmals systematisch Daten und experimentelle Ergebnisse von erwachsenen Patienten mit TAR-Syndrom aufgeführt: Wir konnten zeigen, dass diese Patienten Thrombozytenwerte im unteren Normbereich mit Werten zwischen 100 und 150 / nL haben und einen intakten TPO-abhängigen JAK-STAT-Signalweg in Thrombozyten aufweisen. Wir vermuten, dass der Schweregrad der Thrombozytopenie bei Patienten mit TAR-Syndrom abnimmt und sich nicht wie bei anderen BMFS verschlechtert. Weiterhin legen diese Daten nahe, dass das TAR-Syndrom keine Entwicklung zeigt, wie sie bei anderen BMFS beschrieben ist, wie z.B. die Fanconi-Anämie, bei der mehr als 30 % der Patienten eine Leukämie entwickeln oder die schwere kongenitale Neutropenie, bei der ca. 20 % der Patienten eine Leukämie oder ein MDS entwickeln<sup>63,161</sup>. Bei erwachsenen Patienten mit TAR-Syndrom wurden bisher keine Untersuchungen am Knochenmark durchgeführt, um die verminderte Anzahl an MK, die bei pädiatrischen Patienten nachgewiesen wurde, bei diesen Patienten zu bestätigen<sup>104,160</sup>. Wobei sich auch die medizinische Notwendigkeit dieser invasiven und riskanten Maßnahme in Frage stellen lässt, nur um einen weiteren Verlaufparameter zu determinieren. Stattdessen könnte man bei älteren Patienten die im peripheren Blut vorkommenden HSC (CD34+) isolieren, zu MK

differenzieren und hierbei nach Unterschieden von pädiatrischen und adulten HSC suchen. Gegen eine Zuordnung zu den BMFS spricht auch, dass beim TAR-Syndrom bisher kein Übergang in ein MDS beobachtet wurde. Es wurden vier Patienten beschrieben, die eine akute Form der Leukämie (drei Patienten mit AML, ein Patient mit ALL) entwickelt haben, jedoch ist nicht sicher auszuschließen, dass bei diesen *Case Reports* die Patienten möglicherweise eine andere Erkrankung, wie z.B.: FA, hatten<sup>86-88</sup>. Ein weiteres Argument gegen eine Zuordnung zu den BMFS ist, dass das TAR-Syndrom keine Vorstufe einer aplastischen Anämie ist, wie es z.B. bei der CAMT der Fall ist<sup>162</sup>.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass das TAR-Syndrom eine Erkrankung ist, die typische Zeichen eines BMFS, wie verminderte Produktion hämatopoetischer Vorläuferzellen, aufweist, aber einen sehr untypischen Verlauf für diese Gruppe von Erkrankungen annimmt. Die meisten Patienten mit TAR-Syndrom haben lediglich in den ersten Lebensjahren eine erhöhte Blutungsneigung, die im Laufe der Zeit rückläufig ist. Der Schweregrad der Thrombozytopenie nimmt im Laufe des Älterwerdens ab und der Defekt in der Signaltransduktion von Thrombozyten ist bei erwachsenen Patienten nicht mehr nachzuweisen. Auf Grund dieser Ergebnisse und der nicht eingeschränkten Lebenserwartung durch das TAR-Syndrom selbst, ist dieses vermutlich nicht als BMFS einzuordnen. Es könnte als eine milde Form bzw. Sonderform der BMFS angesehen werden.

#### **4.5. Ausblick**

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass der Defekt in der TPO-abhängigen JAK2-Phosphorylierung nicht bei allen Patienten mit TAR-Syndrom vorliegt<sup>108</sup>. Vielmehr gibt es zwei verschiedene Phosphorylierungsmuster: defekte JAK2-Phosphorylierung mit verminderter Phosphorylierung weiterer Proteine des JAK-STAT-Signalweges bei jungen Patienten mit niedrigen Plättchenzahlen und intakte JAK2-Phosphorylierung mit ebenfalls intakter Aktivierung der Proteine des JAK-STAT-Signalweges bei älteren Patienten und nur minimal erniedrigten Plättchenzahlen. Es konnte gezeigt werden, dass sich der Schweregrad der Thrombozytopenie nicht über das Ausmaß der skeletalen Malformation (Abschnitt 4.1.), Geschlecht der Patienten und den Vererbungsmodus der Mikrodeletion auf Chromosom 1q21.1 (Abschnitt 3.2.) prognostizieren lässt. Allerdings ist die Einschätzung des Schweregrades der Thrombozytopenie von großem Nutzen für eine rechtzeitige und effektive Therapie der Thrombozytopenie und

Blutungsneigung von Patienten mit TAR-Syndrom. Bisherige Therapieversuche mit IL-6 und EPO führten langfristig leider zu keinem Erfolg<sup>100,101</sup>.

Eine erfolgreiche Therapie der Thrombozytopenie bei Patienten mit TAR-Syndrom könnte eventuell mit den in den letzten Jahren entwickelten und auf den Markt gebrachten TPO-Mimetika Eltrombopag (Promacta®) und Romiplostim (Nplate®) erreicht werden<sup>163</sup>. Diese wurden bislang erfolgreich zur Therapie der chronischen Immnthrombozytopenischen Purpura (ITP) eingesetzt<sup>146,164</sup>.

Schwerpunkt der Forschung am TAR-Syndrom sollte die Suche nach dem TAR-modifier (oder auch Second Hit) sein, um die Entstehung des TAR-Syndroms zu verstehen und dort therapeutisch anzusetzen.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Patienten mit TAR-Syndrom sind durch eine bilaterale Radiusaplasie und Thrombozytopenie charakterisiert. In Fallbeschreibungen werden häufig eine Besserung der Thrombozytopenie und eine Verringerung der Blutungsneigung beschrieben. In einem Fall wurde die Januskinase JAK2 in Thrombozyten eines Patienten nicht phosphoryliert. Unsere Arbeitsgruppe hat kürzlich nachgewiesen, dass bei allen 30 untersuchten Patienten eine Mikrodeletion auf Chromosom 1q21.1 vorliegt. Diese Mikrodeletion wurde in 75 % der Fälle von einem Elternteil (Mikrodeletionsträger) vererbt.

In der vorliegenden Arbeit konnten folgende neuen Erkenntnisse gewonnen werden:

1. Nur etwas mehr als die Hälfte der 26 Patienten unserer Kohorte zeigen nach den ersten Lebensjahren eine Besserung der Thrombozytopenie. Diese Verbesserung ist unabhängig vom Geschlecht der Patienten und vom Vererbungsmodus der Mikrodeletion. Ansonsten sind auch bei älteren Patienten die Thrombozytenwerte sehr niedrig.
2. Bei der Untersuchung der TPO-Reaktivität in Thrombozyten von zehn Patienten mit TAR-Syndrom konnte erstmals gezeigt werden, dass die Phosphorylierung der Kinase JAK2 in Thrombozyten von Patienten mit TAR-Syndrom nicht einheitlich ist: Vielmehr lassen sich die Patienten in zwei Gruppen teilen: Bei fünf pädiatrischen Patienten wurde JAK2 nicht phosphoryliert. Bei fünf erwachsenen Patienten zeigen eine intakte JAK2-Phosphorylierung in Thrombozyten.
3. Die Patienten, deren JAK2 Phosphorylierung in Thrombozyten nicht nachweisbar ist, zeigen ebenfalls eine verminderte Phosphorylierung der anderen Proteine des JAK-STAT-Signalweges (TYK2, STAT1, 3 und 5). Die erwachsenen Patienten zeigen auch hier eine intakte Phosphorylierung dieser Proteine.
4. Die Mikrodeletion allein reicht nicht aus, um die TPO-Signalkaskade in Thrombozyten zu beeinflussen: In Thrombozyten von vier Mikrodeletionsträgern wurde eine intakte Phosphorylierbarkeit des JAK-STAT-Signalweges nachgewiesen.
5. Hemizygotie des HFE2-Genes, einem wichtigen Eisenregulator, hat bei Patienten mit TAR-Syndrom keine Auswirkungen auf Parameter der roten Zellreihe (MCV, MCHC etc.), um die Anämie beim TAR-Syndrom erklären zu können.

---

## LITERATUR

1. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*. 2000 Mar 9;404(6774):193-7.
2. Maino VC, Picker LJ. Identification of functional subsets by flow cytometry: intracellular detection of cytokine expression. *Cytometry*. 1998 Oct 15;34(5):207-15.
3. Jiang Y, Beller DI, Frenzl G, Graves DT. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J Immunol*. 1992 Apr 15;148(8):2423-8.
4. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Experimental hematology*. 2000 Aug;28(8):875-84.
5. Nicola NA. Hemopoietic cell growth factors and their receptors. *Annual review of biochemistry*. 1989;58:45-77.
6. Gainsford T, Nandurkar H, Metcalf D, Robb L, Begley CG, Alexander WS. The residual megakaryocyte and platelet production in c-mpl-deficient mice is not dependent on the actions of interleukin-6, interleukin-11, or leukemia inhibitory factor. *Blood*. 2000 Jan 15;95(2):528-34.
7. Ballmaier M, Schulze H, Strauss G, et al. Thrombopoietin in patients with congenital thrombocytopenia and absent radii: elevated serum levels, normal receptor expression, but defective reactivity to thrombopoietin. *Blood*. 1997 Jul 15;90(2):612-9.
8. Miyakawa Y, Oda A, Druker BJ, et al. Thrombopoietin induces tyrosine phosphorylation of Stat3 and Stat5 in human blood platelets. *Blood*. 1996 Jan 15;87(2):439-46.
9. Schulze H, Shivdasani RA. Molecular mechanisms of megakaryocyte differentiation. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2004 Aug;30(4):389-98.
10. Chang Y, Bluteau D, Debili N, Vainchenker W. From hematopoietic stem cells to platelets. *J Thromb Haemost*. 2007 Jul;5 Suppl 1:318-27.
11. Goldfarb AN. Transcriptional control of megakaryocyte development. *Oncogene*. 2007 Oct 15;26(47):6795-802.
12. Desrivieres S, Kunz C, Barash I, Vafaizadeh V, Borghouts C, Groner B. The biological functions of the versatile transcription factors STAT3 and STAT5 and new strategies for their targeted inhibition. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 2006 Jan;11(1):75-87.

13. Nagata Y, Muro Y, Todokoro K. Thrombopoietin-induced polyploidization of bone marrow megakaryocytes is due to a unique regulatory mechanism in late mitosis. *The Journal of cell biology*. 1997 Oct 20;139(2):449-57.
14. Vitrat N, Cohen-Solal K, Pique C, et al. Endomitosis of human megakaryocytes are due to abortive mitosis. *Blood*. 1998 May 15;91(10):3711-23.
15. Jones OP. Origin of megakaryocyte granules from Golgi vesicles. *The Anatomical record*. 1960 Oct;138:105-13.
16. Youssefian T, Cramer EM. Megakaryocyte dense granule components are sorted in multivesicular bodies. *Blood*. 2000 Jun 15;95(12):4004-7.
17. Eilers M, Schulze H, Welte K, Ballmaier M. Thrombopoietin acts synergistically on Ca(2+) mobilization in platelets caused by ADP or thrombin receptor agonist peptide. *Biochemical and biophysical research communications*. 1999 Sep 16;263(1):230-8.
18. Kaushansky K. Thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. *Blood*. 1995 Jul 15;86(2):419-31.
19. Emerson SG, Thomas S, Ferrara JL, Greenstein JL. Developmental regulation of erythropoiesis by hematopoietic growth factors: analysis on populations of BFU-E from bone marrow, peripheral blood, and fetal liver. *Blood*. 1989 Jul;74(1):49-55.
20. Chen BD, Mueller M, Chou TH. Role of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in the regulation of murine alveolar macrophage proliferation and differentiation. *J Immunol*. 1988 Jul 1;141(1):139-44.
21. Solar GP, Kerr WG, Zeigler FC, et al. Role of c-mpl in early hematopoiesis. *Blood*. 1998 Jul 1;92(1):4-10.
22. Lok S, Kaushansky K, Holly RD, et al. Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production in vivo. *Nature*. 1994 Jun 16;369(6481):565-8.
23. Broudy VC, Kaushansky K. Thrombopoietin, the c-mpl ligand, is a major regulator of platelet production. *Journal of leukocyte biology*. 1995 May;57(5):719-25.
24. Emmons RV, Reid DM, Cohen RL, et al. Human thrombopoietin levels are high when thrombocytopenia is due to megakaryocyte deficiency and low when due to increased platelet destruction. *Blood*. 1996 May 15;87(10):4068-71.
25. Stefanich E, Senn T, Widmer R, Fratino C, Keller GA, Fielder PJ. Metabolism of thrombopoietin (TPO) in vivo: determination of the binding dynamics for TPO in mice. *Blood*. 1997 Jun 1;89(11):4063-70.

26. Hitchcock IS, Chen MM, King JR, Kaushansky K. YRRL motifs in the cytoplasmic domain of the thrombopoietin receptor regulate receptor internalization and degradation. *Blood*. 2008 Sep 15;112(6):2222-31.
27. Kuter DJ, Rosenberg RD. The reciprocal relationship of thrombopoietin (c-Mpl ligand) to changes in the platelet mass during busulfan-induced thrombocytopenia in the rabbit. *Blood*. 1995 May 15;85(10):2720-30.
28. Baker SJ, Rane SG, Reddy EP. Hematopoietic cytokine receptor signaling. *Oncogene*. 2007 Oct 15;26(47):6724-37.
29. Bazan JF. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990 Sep;87(18):6934-8.
30. Kishimoto T, Taga T, Akira S. Cytokine signal transduction. *Cell*. 1994 Jan 28;76(2):253-62.
31. Baumann G, Maier D, Freuler F, Tschopp C, Baudisch K, Wienands J. In vitro characterization of major ligands for Src homology 2 domains derived from protein tyrosine kinases, from the adaptor protein SHC and from GTPase-activating protein in Ramos B cells. *European journal of immunology*. 1994 Aug;24(8):1799-807.
32. Drachman JG, Sabath DF, Fox NE, Kaushansky K. Thrombopoietin signal transduction in purified murine megakaryocytes. *Blood*. 1997 Jan 15;89(2):483-92.
33. Rojnuckarin P, Drachman JG, Kaushansky K. Thrombopoietin-induced activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in normal megakaryocytes: role in endomitosis. *Blood*. 1999 Aug 15;94(4):1273-82.
34. Ihle JN, Witthuhn B, Tang B, Yi T, Quelle FW. Cytokine receptors and signal transduction. *Bailliere's clinical haematology*. 1994 Mar;7(1):17-48.
35. Ihle JN. Cytokine receptor signalling. *Nature*. 1995 Oct 19;377(6550):591-4.
36. Drachman JG, Griffin JD, Kaushansky K. The c-Mpl ligand (thrombopoietin) stimulates tyrosine phosphorylation of Jak2, Shc, and c-Mpl. *The Journal of biological chemistry*. 1995 Mar 10;270(10):4979-82.
37. Sattler M, Salgia R, Durstin MA, Prasad KV, Griffin JD. Thrombopoietin induces activation of the phosphatidylinositol-3' kinase pathway and formation of a complex containing p85PI3K and the protooncprotein p120CBL. *Journal of cellular physiology*. 1997 Apr;171(1):28-33.
38. Matsumura I, Nakajima K, Wakao H, et al. Involvement of prolonged ras activation in thrombopoietin-induced megakaryocytic differentiation of a human factor-dependent hematopoietic cell line. *Molecular and cellular biology*. 1998 Jul;18(7):4282-90.

39. Guerriero R, Parolini I, Testa U, et al. Inhibition of TPO-induced MEK or mTOR activity induces opposite effects on the ploidy of human differentiating megakaryocytes. *Journal of cell science*. 2006 Feb 15;119(Pt 4):744-52.
40. Feng J, Witthuhn BA, Matsuda T, Kohlhuber F, Kerr IM, Ihle JN. Activation of Jak2 catalytic activity requires phosphorylation of Y1007 in the kinase activation loop. *Molecular and cellular biology*. 1997 May;17(5):2497-501.
41. Drachman JG, Miyakawa Y, Luthi JN, et al. Studies with chimeric Mpl/JAK2 receptors indicate that both JAK2 and the membrane-proximal domain of Mpl are required for cellular proliferation. *The Journal of biological chemistry*. 2002 Jun 28;277(26):23544-53.
42. Rodriguez-Linares B, Watson SP. Thrombopoietin potentiates activation of human platelets in association with JAK2 and TYK2 phosphorylation. *The Biochemical journal*. 1996 May 15;316 ( Pt 1):93-8.
43. Drachman JG, Millett KM, Kaushansky K. Thrombopoietin signal transduction requires functional JAK2, not TYK2. *The Journal of biological chemistry*. 1999 May 7;274(19):13480-4.
44. Akkerman JW. Thrombopoietin and platelet function. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2006 Apr;32(3):295-304.
45. Hanks SK, Quinn AM, Hunter T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science (New York, NY)*. 1988 Jul 1;241(4861):42-52.
46. Giordanetto F, Kroemer RT. Prediction of the structure of human Janus kinase 2 (JAK2) comprising JAK homology domains 1 through 7. *Protein engineering*. 2002 Sep;15(9):727-37.
47. Luo H, Rose P, Barber D, et al. Mutation in the Jak kinase JH2 domain hyperactivates *Drosophila* and mammalian Jak-Stat pathways. *Molecular and cellular biology*. 1997 Mar;17(3):1562-71.
48. Saharinen P, Silvennoinen O. The pseudokinase domain is required for suppression of basal activity of Jak2 and Jak3 tyrosine kinases and for cytokine-inducible activation of signal transduction. *The Journal of biological chemistry*. 2002 Dec 6;277(49):47954-63.
49. Higgins DG, Thompson JD, Gibson TJ. Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. *Methods in enzymology*. 1996;266:383-402.
50. Kurzer JH, Saharinen P, Silvennoinen O, Carter-Su C. Binding of SH2-B family members within a potential negative regulatory region maintains JAK2 in an active state. *Molecular and cellular biology*. 2006 Sep;26(17):6381-94.

51. Chishti AH, Kim AC, Marfatia SM, et al. The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane. *Trends in biochemical sciences*. 1998 Aug;23(8):281-2.
52. Argetsinger LS, Kouadio JL, Steen H, Stensballe A, Jensen ON, Carter-Su C. Autophosphorylation of JAK2 on tyrosines 221 and 570 regulates its activity. *Molecular and cellular biology*. 2004 Jun;24(11):4955-67.
53. Funakoshi-Tago M, Pelletier S, Moritake H, Parganas E, Ihle JN. Jak2 FERM domain interaction with the erythropoietin receptor regulates Jak2 kinase activity. *Molecular and cellular biology*. 2008 Mar;28(5):1792-801.
54. Copeland NG, Gilbert DJ, Schindler C, et al. Distribution of the mammalian Stat gene family in mouse chromosomes. *Genomics*. 1995 Sep 1;29(1):225-8.
55. Schulze H, Ballmaier M, Welte K, Germeshausen M. Thrombopoietin induces the generation of distinct Stat1, Stat3, Stat5a and Stat5b homo- and heterodimeric complexes with different kinetics in human platelets. *Experimental hematology*. 2000 Mar;28(3):294-304.
56. Banfic H, Tang X, Batty IH, Downes CP, Chen C, Rittenhouse SE. A novel integrin-activated pathway forms PKB/Akt-stimulatory phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate via phosphatidylinositol 3-phosphate in platelets. *The Journal of biological chemistry*. 1998 Jan 2;273(1):13-6.
57. Waiboci LW, Ahmed CM, Mujtaba MG, et al. Both the suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) kinase inhibitory region and SOCS-1 mimetic bind to JAK2 autophosphorylation site: implications for the development of a SOCS-1 antagonist. *J Immunol*. 2007 Apr 15;178(8):5058-68.
58. Chung CD, Liao J, Liu B, et al. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science (New York, NY)*. 1997 Dec 5;278(5344):1803-5.
59. Strippoli P, Savoia A, Iolascon A, et al. Mutational screening of thrombopoietin receptor gene (c-mpl) in patients with congenital thrombocytopenia and absent radii (TAR). *British journal of haematology*. 1998 Nov;103(2):311-4.
60. Ballmaier M, Germeshausen M, Schulze H, et al. c-mpl mutations are the cause of congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Blood*. 2001 Jan 1;97(1):139-46.
61. Alter BP. Bone marrow failure syndromes in children. *Pediatric clinics of North America*. 2002 Oct;49(5):973-88.
62. Alter BP. Aplastic Anemia, Pediatric Aspects. *The oncologist*. 1996;1(6):361-6.

63. Alter BP. Diagnosis, genetics, and management of inherited bone marrow failure syndromes. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology*. 2007;2007:29-39.
64. Federman N, Sakamoto KM. The genetic basis of bone marrow failure syndromes in children. *Molecular genetics and metabolism*. 2005 Sep-Oct;86(1-2):100-9.
65. Hall JG, Levin J, Kuhn JP, Ottenheimer EJ, van Berkum KA, McKusick VA. Thrombocytopenia with absent radius (TAR). *Medicine*. 1969 Nov;48(6):411-39.
66. Greenhalgh KL, Howell RT, Bottani A, et al. Thrombocytopenia-absent radius syndrome: a clinical genetic study. *Journal of medical genetics*. 2002 Dec;39(12):876-81.
67. Hedberg VA, Lipton JM. Thrombocytopenia with absent radii. A review of 100 cases. *The American journal of pediatric hematology/oncology*. 1988 Spring;10(1):51-64.
68. Teufel M, Enders H, Dopfer R. Consanguinity in a Turkish family with thrombocytopenia with absent radii (TAR) syndrome. *Human genetics*. 1983;64(1):94-6.
69. Geddis AE. Inherited thrombocytopenia: Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia and thrombocytopenia with absent radii. *Seminars in hematology*. 2006 Jul;43(3):196-203.
70. Ashinoff R, Geronemus RG. Thrombocytopenia-absent radii syndrome and lack of response to the pulsed dye laser. *Archives of dermatology*. 1990 Nov;126(11):1520-1.
71. Ward RE, Bixler D, Provisor AJ, Bader P. Parent to child transmission of the thrombocytopenia absent radius (TAR) syndrome. *Am J Med Genet Suppl*. 1986;2:207-14.
72. Schnur RE, Eunpu DL, Zackai EH. Thrombocytopenia with absent radius in a boy and his uncle. *American journal of medical genetics*. 1987 Sep;28(1):117-23.
73. Greenwald HM, & Sherman, I. Congenital essential thrombocytopenia. *Am J Dis Child*. 1929;38:1245-51.
74. Giampietro PF, Adler-Brecher B, Verlander PC, Pavlakis SG, Davis JG, Auerbach AD. The need for more accurate and timely diagnosis in Fanconi anemia: a report from the International Fanconi Anemia Registry. *Pediatrics*. 1993 Jun;91(6):1116-20.
75. Alter BP. Bone marrow failure: a child is not just a small adult (but an adult can have a childhood disease). *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology*. 2005:96-103.

76. Thompson AA, Nguyen LT. Amegakaryocytic thrombocytopenia and radio-ulnar synostosis are associated with HOXA11 mutation. *Nature genetics*. 2000 Dec;26(4):397-8.
77. Van Den Berg DJ, Francke U. Roberts syndrome: a review of 100 cases and a new rating system for severity. *American journal of medical genetics*. 1993 Nov 15;47(7):1104-23.
78. Sinha AK, Verma RS, Mani VJ. Clinical heterogeneity of skeletal dysplasia in Roberts syndrome: a review. *Human heredity*. 1994 May-Jun;44(3):121-6.
79. Kantaputra PN, Yamasaki K, Ishida T, Kishino T, Niikawa N. A dominantly inherited malformation syndrome with short stature, upper limb anomaly, minor craniofacial anomalies, and absence of TBX5 mutations: report of a Thai family. *American journal of medical genetics*. 2002 Aug 15;111(3):301-6.
80. Newbury-Ecob RA, Leanage R, Raeburn JA, Young ID. Holt-Oram syndrome: a clinical genetic study. *Journal of medical genetics*. 1996 Apr;33(4):300-7.
81. Dokal I, Ganly P, Riebero I, et al. Late onset bone marrow failure associated with proximal fusion of radius and ulna: a new syndrome. *British journal of haematology*. 1989 Feb;71(2):277-80.
82. Sola MC, Slayton WB, Rimsza LM, et al. A neonate with severe thrombocytopenia and radio-ulnar synostosis. *J Perinatol*. 2004 Aug;24(8):528-30.
83. Thompson AA, Woodruff K, Feig SA, Nguyen LT, Schanen NC. Congenital thrombocytopenia and radio-ulnar synostosis: a new familial syndrome. *British journal of haematology*. 2001 Jun;113(4):866-70.
84. Vega H, Waisfisz Q, Gordillo M, et al. Roberts syndrome is caused by mutations in ESCO2, a human homolog of yeast ECO1 that is essential for the establishment of sister chromatid cohesion. *Nature genetics*. 2005 May;37(5):468-70.
85. Csaba E, Marta V, C E. Holt-Oram syndroma. *Orv Hetil*. 1991;132:73-8.
86. Camitta BM, Rock A. Acute lymphoidic leukemia in a patient with thrombocytopenia/absent radii (Tar) syndrome. *The American journal of pediatric hematology/oncology*. 1993 Aug;15(3):335-7.
87. Fadoo Z, Naqvi SM. Acute myeloid leukemia in a patient with thrombocytopenia with absent radii syndrome. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2002 Feb;24(2):134-5.
88. Go RS, Johnston KL. Acute myelogenous leukemia in an adult with thrombocytopenia with absent radii syndrome. *European journal of haematology*. 2003 Apr;70(4):246-8.

89. Rao VS, Shenoi UD, Krishnamurthy PN. Acute myeloid leukemia in TAR syndrome. *Indian journal of pediatrics*. 1997 Jul-Aug;64(4):563-5.
90. Maas C, Arand J, Orlikowsky T, Goelz R. [Newborn with phocomelia and thrombocytopenia. Case report]. *Zeitschrift für Geburtshilfe und Neonatologie*. 2002 Jul-Aug;206(4):161-3.
91. Pfeiffer RA, Haneke C. The phocomelia-thrombocytopenia syndrome. A follow-up report. *Humangenetik*. 1975;26(2):157-8.
92. Ray R, Zorn E, Kelly T, Hall JG, Sommer A. Lower limb anomalies in the thrombocytopenia absent-radius (TAR) syndrome. *American journal of medical genetics*. 1980;7(4):523-8.
93. Anyane-Yeboah K, Jaramillo S, Nagel C, Grebin B. Tetraphocomelia in the syndrome of thrombocytopenia with absent radii (TAR syndrome). *American journal of medical genetics*. 1985 Apr;20(4):571-6.
94. Klopocki E, Schulze H, Strauss G, et al. Complex inheritance pattern resembling autosomal recessive inheritance involving a microdeletion in thrombocytopenia-absent radius syndrome. *American journal of human genetics*. 2007 Feb;80(2):232-40.
95. Hall JG. Thrombocytopenia and absent radius (TAR) syndrome. *Journal of medical genetics*. 1987 Feb;24(2):79-83.
96. Whitfield MF, Barr DG. Cows' milk allergy in the syndrome of thrombocytopenia with absent radius. *Archives of disease in childhood*. 1976 May;51(5):337-43.
97. Bellver J, Lara C, Perez-Aytes A, Pellicer A, Remohi J, Serra V. First-trimester diagnosis of thrombocytopenia-absent radius (TAR) syndrome in a triplet pregnancy. *Prenatal diagnosis*. 2005 Apr;25(4):332-4.
98. Ergur A, Yergok YZ, Ertekin A, Tayyar M, Yilmazturk A. Prenatal diagnosis of an uncommon syndrome: thrombocytopenia absent radius (TAR). *Zentralblatt für Gynäkologie*. 1998;120(2):75-8.
99. Donnenfeld AE. Prenatal diagnosis of thrombocytopenia in TAR syndrome. *Prenatal diagnosis*. 1994 Jan;14(1):73-4.
100. Dempfle CE, Burck C, Grutzmacher T, Wizenmann J, Heene DL. Increase in platelet count in response to rHuEpo in a patient with thrombocytopenia and absent radii syndrome. *Blood*. 2001 Apr 1;97(7):2189-90.
101. Aquino VM, Mustafa MM, Vaickus L, Wooley R, Buchanan GR. Recombinant interleukin-6 in the treatment of congenital thrombocytopenia associated with absent radii. *J Pediatr Hematol Oncol*. 1998 Sep-Oct;20(5):474-6.

102. Michalevicz R, Baron S, Burstein Y. Osteoclast-like cells grow in cultures of multipotent hematopoietic progenitors in thrombocytopenia and absent radii (TAR) syndrome. *Israel journal of medical sciences*. 1988 Jan;24(1):42-5.
103. de Alarcon PA, Graeve JA, Levine RF, McDonald TP, Beal DW. Thrombocytopenia and absent radii syndrome: defective megakaryocytopoiesis-thrombocytopoiesis. *The American journal of pediatric hematology/oncology*. 1991 Spring;13(1):77-83.
104. Homans AC, Cohen JL, Mazur EM. Defective megakaryocytopoiesis in the syndrome of thrombocytopenia with absent radii. *British journal of haematology*. 1988 Oct;70(2):205-10.
105. Letestu R, Vitrat N, Masse A, et al. Existence of a differentiation blockage at the stage of a megakaryocyte precursor in the thrombocytopenia and absent radii (TAR) syndrome. *Blood*. 2000 Mar 1;95(5):1633-41.
106. Cremer M, Schulze H, Linthorst G, et al. Serum levels of thrombopoietin, IL-11, and IL-6 in pediatric thrombocytopenias. *Annals of hematology*. 1999 Sep;78(9):401-7.
107. Schulze H. Biochemische Untersuchungen zur Signaltransduktion des Thrombopoietin-Rezeptors c-Mpl in Thrombozyten [Dissertation]: Universität Hannover, 1999.
108. Ballmaier M, Schulze H, Cremer M, Folman CC, Strauss G, Welte K. Defective c-Mpl signaling in the syndrome of thrombocytopenia with absent radii. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 1998;16 Suppl 2:177-84.
109. Rijli FM, Chambon P. Genetic interactions of Hox genes in limb development: learning from compound mutants. *Current opinion in genetics & development*. 1997 Aug;7(4):481-7.
110. Buske C, Humphries RK. Homeobox genes in leukemogenesis. *International journal of hematology*. 2000 Jun;71(4):301-8.
111. Fleischman RA, Letestu R, Mi X, et al. Absence of mutations in the HoxA10, HoxA11 and HoxD11 nucleotide coding sequences in thrombocytopenia with absent radius syndrome. *British journal of haematology*. 2002 Feb;116(2):367-75.
112. Ihara K, Ishii E, Eguchi M, et al. Identification of mutations in the c-mpl gene in congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999 Mar 16;96(6):3132-6.
113. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*. 1987 Apr;162(1):156-9.

114. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *The New England journal of medicine*. 2005 Apr 28;352(17):1779-90.
115. Barth S, Steiniger U. Thrombozytopenie-Radiosaplasie-Syndrom. *Paediatrische Praxis*. 1995;49:687-91.
116. Cash JM, Sears DA. The anemia of chronic disease: spectrum of associated diseases in a series of unselected hospitalized patients. *The American journal of medicine*. 1989 Dec;87(6):638-44.
117. Means RT, Jr., Krantz SB. Progress in understanding the pathogenesis of the anemia of chronic disease. *Blood*. 1992 Oct 1;80(7):1639-47.
118. Weiss EJ, Hamilton JR, Lease KE, Coughlin SR. Protection against thrombosis in mice lacking PAR3. *Blood*. 2002 Nov 1;100(9):3240-4.
119. Pastos KM, Slayton WB, Rimsza LM, Young L, Sola-Visner MC. Differential effects of recombinant thrombopoietin and bone marrow stromal-conditioned media on neonatal versus adult megakaryocytes. *Blood*. 2006 Nov 15;108(10):3360-2.
120. De Domenico I, Ward DM, Langelier C, et al. The molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin down-regulation. *Molecular biology of the cell*. 2007 Jul;18(7):2569-78.
121. Saxena G, Chen J, Shalev A. Intracellular shuttling and mitochondrial function of thioredoxin-interacting protein. *The Journal of biological chemistry*. 2009 Dec 3.
122. Swindell EC, Moeller C, Thaller C, Eichele G. Cloning and expression analysis of chicken Lix1, a founding member of a novel gene family. *Mechanisms of development*. 2001 Dec;109(2):405-8.
123. Hoo RL, Chan KY, Leung FK, Lee LT, Leung PC, Chow BK. Involvement of NF-kappaB subunit p65 and retinoic acid receptors, RARalpha and RXRalpha, in transcriptional regulation of the human GnRH II gene. *The FEBS journal*. 2007 Jun;274(11):2695-706.
124. Muromoto R, Taira N, Ikeda O, et al. The exon-junction complex proteins, Y14 and MAGOH regulate STAT3 activation. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009 Apr 24;382(1):63-8.
125. Li X, Baumgart E, Morrell JC, Jimenez-Sanchez G, Valle D, Gould SJ. PEX11 beta deficiency is lethal and impairs neuronal migration but does not abrogate peroxisome function. *Molecular and cellular biology*. 2002 Jun;22(12):4358-65.
126. Wenke AK, Kjellman C, Lundgren-Akerlund E, et al. Expression of integrin alpha10 is induced in malignant melanoma. *Cell Oncol*. 2007;29(5):373-86.

127. Caffrey JJ, Safrany ST, Yang X, Shears SB. Discovery of molecular and catalytic diversity among human diphosphoinositol-polyphosphate phosphohydrolases. An expanding Nudt family. *The Journal of biological chemistry*. 2000 Apr 28;275(17):12730-6.
128. Chen C, Seth AK, Aplin AE. Genetic and expression aberrations of E3 ubiquitin ligases in human breast cancer. *Mol Cancer Res*. 2006 Oct;4(10):695-707.
129. Kocher O, Pal R, Roberts M, Cirovic C, Gilchrist A. Targeted disruption of the PDZK1 gene by homologous recombination. *Molecular and cellular biology*. 2003 Feb;23(4):1175-80.
130. Schmidt D, Muller S. PIAS/SUMO: new partners in transcriptional regulation. *Cell Mol Life Sci*. 2003 Dec;60(12):2561-74.
131. Shuai K, Liu B. Regulation of gene-activation pathways by PIAS proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2005 Aug;5(8):593-605.
132. Kotaja N, Karvonen U, Janne OA, Palvimo JJ. PIAS proteins modulate transcription factors by functioning as SUMO-1 ligases. *Molecular and cellular biology*. 2002 Jul;22(14):5222-34.
133. Kim K, Lee J, Kim JH, et al. Protein inhibitor of activated STAT 3 modulates osteoclastogenesis by down-regulation of NFATc1 and osteoclast-associated receptor. *J Immunol*. 2007 May 1;178(9):5588-94.
134. Hikata T, Takaishi H, Takito J, et al. PIAS3 negatively regulates RANKL-mediated osteoclastogenesis directly in osteoclast precursors and indirectly via osteoblasts. *Blood*. 2009 Mar 5;113(10):2202-12.
135. Iwasaki K, Hailemariam K, Tsuji Y. PIAS3 interacts with ATF1 and regulates the human ferritin H gene through an antioxidant-responsive element. *The Journal of biological chemistry*. 2007 Aug 3;282(31):22335-43.
136. Papanikolaou G, Samuels ME, Ludwig EH, et al. Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nature genetics*. 2004 Jan;36(1):77-82.
137. Lin L, Goldberg YP, Ganz T. Competitive regulation of hepcidin mRNA by soluble and cell-associated hemojuvelin. *Blood*. 2005 Oct 15;106(8):2884-9.
138. Huang Z, Richmond TD, Muntean AG, Barber DL, Weiss MJ, Crispino JD. STAT1 promotes megakaryopoiesis downstream of GATA-1 in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2007 Dec;117(12):3890-9.

139. Millot GA, Vainchenker W, Dumenil D, Svinarchuk F. Distinct effects of thrombopoietin depending on a threshold level of activated Mpl in BaF-3 cells. *Journal of cell science*. 2002 Jun 1;115(Pt 11):2329-37.
140. Mazharian A, Watson SP, Severin S. Critical role for ERK1/2 in bone marrow and fetal liver-derived primary megakaryocyte differentiation, motility, and proplatelet formation. *Experimental hematology*. 2009 Oct;37(10):1238-49 e5.
141. Gilio K, Munnix IC, Mangin P, et al. Non-redundant roles of phosphoinositide 3-kinase isoforms alpha and beta in glycoprotein VI-induced platelet signaling and thrombus formation. *The Journal of biological chemistry*. 2009 Oct 8.
142. Yin H, Stojanovic A, Hay N, Du X. The role of Akt in the signaling pathway of the glycoprotein Ib-IX induced platelet activation. *Blood*. 2008 Jan 15;111(2):658-65.
143. Zahavi J, Gale R, Kakkar VV. Storage pool disease of platelets in an infant with thrombocytopenic absent radii (TAR) syndrome simulating Fanconi's anaemia. *Haemostasis*. 1981;10(3):121-33.
144. Day HJ, Holmsen H. Platelet adenine nucleotide "storage pool deficiency" in thrombocytopenic absent radii syndrome. *Jama*. 1972 Aug 28;221(9):1053-4.
145. Greenhalgh CJ, Hilton DJ. Negative regulation of cytokine signaling. *Journal of leukocyte biology*. 2001 Sep;70(3):348-56.
146. Wang T, Wang Z, Yang R. Thrombopoietic growth factors in the treatment of immune thrombocytopenic purpura. *Critical reviews in oncology/hematology*. Apr 6.
147. Starr R, Willson TA, Viney EM, et al. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature*. 1997 Jun 26;387(6636):917-21.
148. Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene*. 2002 Feb 20;285(1-2):1-24.
149. Mertens C, Darnell JE, Jr. SnapShot: JAK-STAT signaling. *Cell*. 2007 Nov 2;131(3):612.
150. Cecchini MG, Hofstetter W, Halasy J, Wetterwald A, Felix R. Role of CSF-1 in bone and bone marrow development. *Molecular reproduction and development*. 1997 Jan;46(1):75-83; discussion -4.
151. Bonsi L, Marchionni C, Alviano F, et al. Thrombocytopenia with absent radii (TAR) syndrome: from hemopoietic progenitor to mesenchymal stromal cell disease? *Experimental hematology*. 2009 Jan;37(1):1-7.

152. Argiropoulos B, Humphries RK. Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis. *Oncogene*. 2007 Oct 15;26(47):6766-76.
153. Basson CT, Bachinsky DR, Lin RC, et al. Mutations in human TBX5 [corrected] cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. *Nature genetics*. 1997 Jan;15(1):30-5.
154. Li QY, Newbury-Ecob RA, Terrett JA, et al. Holt-Oram syndrome is caused by mutations in TBX5, a member of the Brachyury (T) gene family. *Nature genetics*. 1997 Jan;15(1):21-9.
155. Podlasek CA, Seo RM, Clemens JQ, Ma L, Maas RL, Bushman W. Hoxa-10 deficient male mice exhibit abnormal development of the accessory sex organs. *Dev Dyn*. 1999 Jan;214(1):1-12.
156. Sekine I, Hagiwara T, Miyazaki H, et al. Thrombocytopenia with absent radii syndrome: studies on serum thrombopoietin levels and megakaryopoiesis in vitro. *J Pediatr Hematol Oncol*. 1998 Jan-Feb;20(1):74-8.
157. Naiche LA, Papaioannou VE. Loss of Tbx4 blocks hindlimb development and affects vascularization and fusion of the allantois. *Development (Cambridge, England)*. 2003 Jun;130(12):2681-93.
158. Davis AP, Capecchi MR. A mutational analysis of the 5' HoxD genes: dissection of genetic interactions during limb development in the mouse. *Development (Cambridge, England)*. 1996 Apr;122(4):1175-85.
159. Fromental-Ramain C, Warot X, Messadecq N, LeMeur M, Dolle P, Chambon P. Hoxa-13 and Hoxd-13 play a crucial role in the patterning of the limb autopod. *Development (Cambridge, England)*. 1996 Oct;122(10):2997-3011.
160. Kanz L, Kostielniak E, Welte K. Colony-stimulating activity (CSA) unique for the megakaryocytic hemopoietic cell lineage, present in the plasma of a patient with the syndrome of thrombocytopenia with absent radii (TAR). *Blood*. 1989;74:248a.
161. Rosenberg PS, Alter BP, Bolyard AA, et al. The incidence of leukemia and mortality from sepsis in patients with severe congenital neutropenia receiving long-term G-CSF therapy. *Blood*. 2006 Jun 15;107(12):4628-35.
162. Ballmaier M, Germeshausen M, Krukemeier S, Welte K. Thrombopoietin is essential for the maintenance of normal hematopoiesis in humans: development of aplastic anemia in patients with congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2003 May;996:17-25.
163. Stasi R, Evangelista ML, Amadori S. Novel thrombopoietic agents: a review of their use in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Drugs*. 2008;68(7):901-12.

164. Wadenvik H, Olsson B. Moving towards a new era in the management of chronic immune thrombocytopenia. *Annals of hematology*. Mar 26.

## DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich Prof. Gerhard Gaedicke für die Vermittlung in die Arbeitsgruppe von PD Dr. Harald Schulze danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt PD Dr. Harald Schulze für die Bereitstellung des von mir bearbeiteten Dissertationsthemas. Auch bedanke ich mich für die intensive und einzigartige Betreuung sowie die unerschöpfliche Fähigkeit mich zu motivieren.

Großer Dank gilt der Arbeitsgruppe von PD Dr. Harald Schulze, in der ich über fachliche Gespräche und das Erlernen vieler praktischer Fähigkeiten hinaus viele wertvolle Erfahrungen für mein weiteres Leben mitnehmen konnte: Silke Fleischhauer, Imke Meyer, Stefan Kunert und Janine Fiedler.

Ich möchte Frau Dr. med. Gabriele Strauß aus der Klinik für Pädiatrie m.S. Onkologie und Hämatologie der Charité für den Kontakt zu den Patienten mit TAR-Syndrom und die zahlreichen Stunden konstruktiver Zusammenarbeit ganz herzlich danken.

Prof. Heidemarie Neitzel und Traute Burmester vom Institut für Humangenetik der Charité Universitätsmedizin Berlin möchte ich für die Anfertigung und Aufbewahrung der von Patienten generierten Zelllinien sowie die Bereitstellung der S2-Laboratorien danken.

Besonderer Dank gilt Susann Schade, Imke Driemel und Konrad Hofmann, die sich dazu bereit erklärt haben, meine Dissertation Korrektur zu lesen.

Schließlich möchte ich allen danken, die mich während des Anfertigens meiner Dissertation unterstützt und motiviert haben, insbesondere meinen Eltern, Susann Schade und Ulrike Niehle.

## EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

„Ich, Martin Wannack, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: ‚Pathophysiologie der Blutbildung bei Patienten mit *Thrombocytopenia absent radii* (TAR)- Syndrom‘ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

# Lebenslauf

---

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.