

Aus dem  
Charité-Centrum 17 für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin mit Perinatalzentrum und  
Humangenetik  
Klinik für Allgemeine Pädiatrie  
Direktor: Prof. Dr. med. Gerhard Gaedicke

## **Habilitationsschrift**

# **Neue Erkenntnisse zur Zellbiologie der Thrombozytopoese und Pathophysiologie congenitaler Thrombozytopenien**

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach "Molekulare Medizin"

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von:

Diplom-Biochemiker  
Dr. rer. nat. Harald Schulze  
geboren am 21.11.1969 in Alfeld / Leine

eingereicht: Januar 2008

Dekan: Prof. Dr. med. Paul

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Fandrey, Essen

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Imbach, Basel

lucundi acti labores.  
Cicero, *De finibus* 2, 105

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. Einleitung</b> .....	1
<u>1.1. Einführung</u> .....	1
<u>1.2. Historischer Hintergrund</u> .....	2
<u>1.3 Vergleichende Thrombopoese</u> .....	3
<u>1.4. Megakaryo- und Thrombozytopoese: von der hämatopoetischen Stammzelle zum Plättchen</u> .....	4
1.4.1 Modelle der Megakaryopoese als Teil der Hämatopoese .....	5
1.4.2 Differenzierungsmarker in der Megakaryopoese .....	6
1.4.3 Polyploidie .....	7
1.4.4 Humorale Faktoren der Megakaryopoese und der Thrombozytenhomöostase.....	8
1.4.5 Transkriptionsfaktoren.....	9
1.4.6 Signaltransduktion des Thrombopoietin.....	11
<u>1.5. Haut, Muskeln und Knochen: Membransysteme und Zytoskelett in der Thrombopoese</u> ..	12
1.5.1 Das Membransystem des Megakaryozyten.....	12
1.5.2 Die Rolle des Zytoskeletts: Mikrotubuli und Actin-Filamente.....	13
1.5.3 Inhaltsstoffe des Megakaryozyten: Granula und deren Transport .....	14
<u>1.6. Plättchenbiogenese <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i></u> .....	15
<u>1.7. Congenitale Defekte der Megakaryo- und Thrombopoese</u> .....	16
<u>1.8. Zielsetzung und Ausblick</u> .....	19
<b>2. Orginalarbeiten und Übersichtsartikel</b> .....	20
<u>2.1 Differential roles of microtubule assembly and sliding in proplatelet formation by megakaryocytes</u> .....	20
<u>2.2 Interactions between the megakaryocyte/platelet-specific <math>\beta</math>1-tubulin and the secretory leukocyte protease inhibitor SLPI suggest a role for regulated proteolysis in platelet function</u> .....	31
<u>2.3 Characterization of the megakaryocyte demarcation membrane system and its role in thrombopoiesis</u> .....	41
<u>2.4 Direct visualization of thrombopoiesis in the bone marrow of living mice</u> .....	50

<u>2.5 c-mpl mutations are the cause of congenital amegakaryocytic thrombocytopenia.....</u>	55
<u>2.6 Thrombopoietin in patients with congenital thrombocytopenia and absent radii: elevated serum levels, normal receptor expression, but defective reactivity to thrombopoietin. ....</u>	64
<u>2.7 Complex inheritance pattern resembling autosomal recessive inheritance involving a microdeletion in thrombocytopenia-absent radius syndrome.....</u>	73
<u>2.8 Molecular Mechanisms of Megakaryocyte Differentiation.....</u>	83
<u>2.9 Mechanisms of thrombopoiesis.....</u>	94
<b>3. Diskussion.....</b>	103
<u>3.1 Das Zytoskelett des Megakaryozyten.....</u>	103
<u>3.2 Modelle der Thrombopoese <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>.....</u>	104
<u>3.3 Angeborene Thrombozytopenien: CAMT und TAR-Syndrom .....</u>	108
<u>3.4 Forschung in der Thrombopoese: Quo vadis? .....</u>	111
<b>4. Zusammenfassung.....</b>	113
<b>5. Danksagung.....</b>	115
<b>6. Referenzen.....</b>	116

**Eidesstattliche Erklärung**

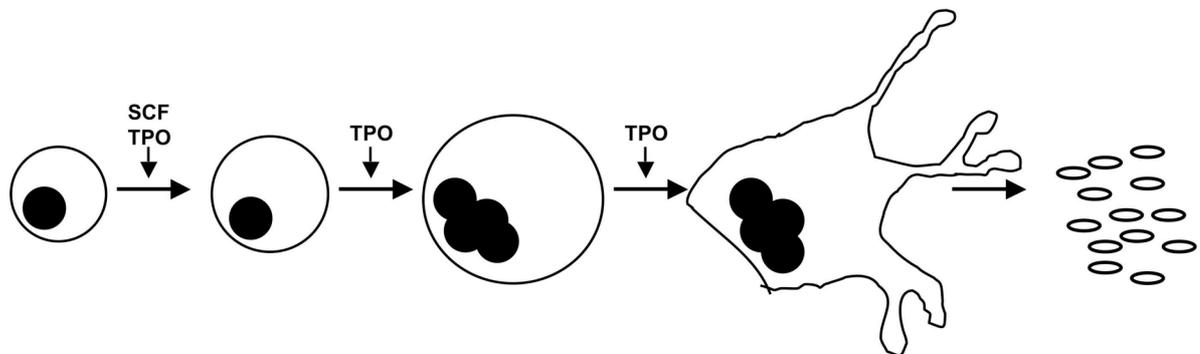
## 1. Einleitung

### 1. Einleitung

#### 1.1. Einführung

Blutplättchen oder Thrombozyten sind essentiell für die Blutstillung. Nach einer Schädigung von Blutgefäßen werden sie aufgrund ihrer Größe und Dichte in Relation zu den Erythrozyten und Leukozyten in den Blutgefäßen nach außen gedrängt. Dort befinden sie sich in engem Kontakt zu dem Gefäßendothel, aus dem Kollagen oder vWF freigesetzt und von spezifischen, hochaffinen Rezeptoren auf der Oberfläche des Thrombozyten erkannt werden. Dies führt schließlich zur Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten (Thrombusbildung) und es kann so zu einem Wundverschluss kommen. Darüber hinaus fördert die Oberfläche von aktivierten Plättchen die Generierung von aktiviertem Faktor X und unterstützt somit die Blutgerinnung durch die Spaltung von Prothrombin zu Thrombin.

Seit mehr als 150 Jahren sind die zellulären (oder genauer: korpuskulären) Bestandteile des Blutes bekannt. Thrombozyten sind seitdem immer wieder Gegenstand von wissenschaftlichen Untersuchungen. Dabei interessieren sich nicht nur Medizinern für die Rolle der Thrombozyten in der Hämostaseologie, sondern auch Biologen und Chemikern, die in zellbiologischen oder biochemischen Experimenten Zytoskelett oder Signaltransduktion untersuchen. Trotzdem ist das Wissen über die Thrombozyten verglichen mit anderen hämatopoetischen Zellen relativ gering. Grund dafür ist, dass Thrombozyten sich nur bedingt *ex vivo* untersuchen lassen, da schon eine Blutentnahme mit einer Gefäßverletzung einhergeht und die Thrombozyten oft schon (partiell) voraktiviert sind.



**Abb. 1:** Megakaryopoese. Hämatopoetische Stammzellen differenzieren in der Gegenwart von Thrombopoietin (TPO) zu Megakaryozyten, die polyploid werden. Die reifen Megakaryozyten bilden dünne Ausläufer des Zytoplasmas, die Proplättchen genannt werden. An ihren Enden schnüren sich Thrombozyten ab. SCF = Stem Cell Factor

Thrombozyten sind anukleäre subzelluläre Fragmente. Im Gegensatz zu den ebenfalls kernlosen Erythrozyten, die ihren Zellkern im Rahmen ihrer Entwicklung aktiv aus der Zelle herausbringen, entstehen Thrombozyten durch zytoplasmatische Abschnürung von sogenannten **Megakaryozyten**, den Vorläuferzellen im Knochenmark. Bei diesem Prozess kann ein einzelner Megakaryozyt ca. 1000 Blutplättchen generieren (siehe Abb. 1).

Unter **Megakaryopoese** sei im folgenden die Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen zu Zellen der megakaryozytären Linie gemeint, im allgemeinen definiert durch die Expression eines Markerproteins, das für diese spezifisch ist. Dabei können hier alle Stufen

## 1. Einleitung

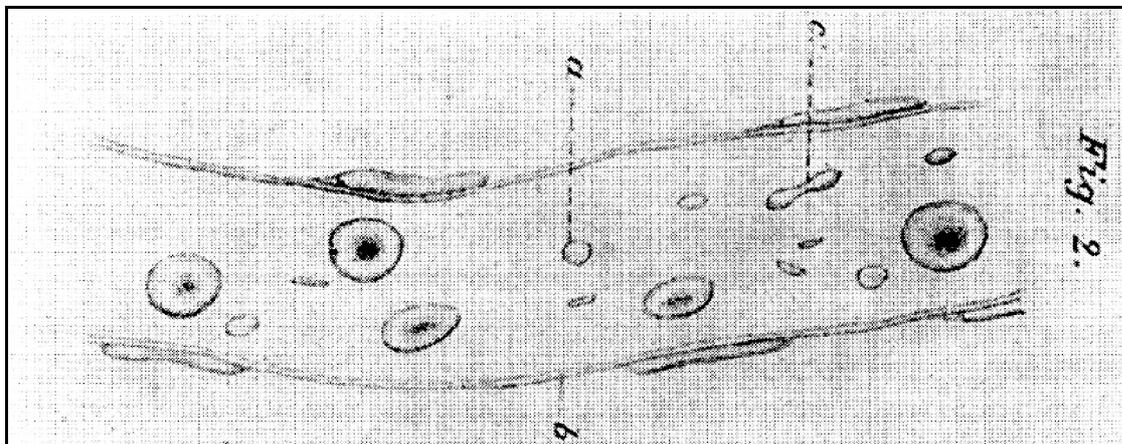
einbezogen werden, von frühen Megakaryoblasten bis hin zu reifen Megakaryozyten.

**Thrombopoese** soll hingegen im engeren Sinn nur den letzten Schritt von einem reifen Megakaryozyten zur Freisetzung von Thrombozyten beinhalten: diese umfasst die Ausbildung von **Proplättchen** (ausgedehnte Ausläufer des Zytoplasmas mit einem Durchmesser von  $3\mu\text{m}$  und einer durchschnittlichen Länge von  $250 - 500\mu\text{m}$ ) sowie den Übergang vom Knochenmark in die Blutgefäße.

## 1.2. Historischer Hintergrund

Thrombozyten sind bereits seit Mitte des 19. Jahrhunderts als Bestandteil des Bluts bekannt und die Geschichte der Entdeckungen, Meilensteine wie Fehlinterpretationen, ist Gegenstand von verschiedenen Übersichtsarbeiten [1-3]. Hier folgt eine Einführung, die die aktuellen Probleme der Modellbildung auf die historischen Aspekte hin darstellt.

DONNÉ hat 1842 drei Blutbestandteile beschrieben, die sich eindeutig auf Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten beziehen. Die kleinsten Partikel hat er als "globulins" bezeichnet. Ursprung und Funktion dieser "globulins" sind jedoch erst durch BIZZOZERO als ein "Neuer Formbestandteil des Blutes" 1882 erkannt worden (siehe Abb. 2). Dieses Datum kann daher als die eigentliche Erstbeschreibung des Thrombozyten gewertet werden. Zum Ende des 19. Jahrhunderts gibt es eine Vielzahl an Ausdrücken, die den neuen "Formbestandteilen" zugeordnet werden: Der Ausdruck "plaquette" ist wahrscheinlich 1883 durch HAYEM eingeführt worden, ihm verdanken wir auch die ersten akkuraten Messungen der Anzahl von Thrombozyten im peripheren Blut. Der Ausdruck "Blood Platelets" erfolgte durch 1882 durch OSLER, BIZZOZERO hat 1891 die "plaquettes" als "Blutplättchen" übersetzt.



**Abb. 2:** Darstellung von Blutplättchen in Blutgefäßen lebender Tiere bei BIZZOZERO, zitiert nach [1].

ASCHOFF hat 1893 "riesenkernhaltige" Zellen in der Lunge gefunden und angenommen, dass diese Zellen aus dem Knochenmark aufgrund chemotaktischer Stimuli in die Lunge einwandern [4]. Dies wurde einige Jahre später von FOA bestätigt. In den '30er Jahren des letzten Jahrhunderts entstand eine Kontroverse darüber, ob Megakaryozyten in der Lunge entstehen oder ob sie dorthin einwandern. HOWELL hat 1937 anstelle des Knochenmarks die Lunge als Hauptquelle der Thrombozyten vorgeschlagen [5]. Beide Autoren zeigen, dass mehr Blutplättchen die Lunge verlassen als hineingelangen und Thrombopoese also in der Lunge stattfindet. Die Arbeiten von

## 1. Einleitung

KAUFMAN haben aber 1965 durch Shunt-Experimente an Hunden eindrucksvoll gezeigt, dass der Ursprung der Megakaryozyten im Knochenmark liegt [6, 7]. TINGAARD PEDERSEN hat nach Experimenten in Ratten postuliert, dass das Lungengewebe als Filter zur Freisetzung von Thrombozyten fungiert und die Verteilung von Megakaryozyten in verschiedenen Gefäßen untersucht [8, 9]. Interessanterweise sind zu dieser Hypothese immer wieder Arbeiten erschienen [10-13], allerdings eindeutigen Konsens.

DOMINICI hat korrekt erkannt, dass die Blutplättchen keine Zellkerne haben, sondern als Fragmente von anderen (weißen) Blutzellen entstehen. Es ist aber der Verdienst von WRIGHT 1906, das Zytoplasma des Megakaryozyten als die Quelle der Thrombozyten erkannt zu haben. (Die größte Zelle im Knochenmark war bereits 1869 von BIZZOZERO beschrieben worden und erhielt 1890 durch HOWELL den Namen Megakaryozyt).

Die Rolle des Thrombozyten für die Blutstillung wurde als erstes von HAYEM beschrieben. 1912 hat dann DUKE experimentell den Zusammenhang zwischen der Anzahl von Thrombozyten und der Blutungszeit gezeigt und damit den Grundstein zum Verständnis von Blutplättchen bei Hämostase gelegt. Weitere historische Arbeiten aus dem 20. Jahrhundert werden zu Beginn der jeweiligen Kapitel kurz vorgestellt.

### 1.3 Vergleichende Thrombopoese

Die Hauptfunktion von Thrombozyten ist die **Hämostase**, d.h. das Aufrechterhalten der Gefäßintegrität sowie den schnellen Verschluss von beschädigten Arterien und Venen, um Blutverlust zu minimieren. Blutplättchen entstehen durch subzelluläre Abschnürungen von Megakaryozyten im Knochenmark. Dieser als **Thrombopoese** bezeichnete zellbiologische Vorgang, bei dem eine einzige Zelle ca. 1000 funktionale und zudem fast ununterscheidbare Fragmente bildet, ist in der Biologie einzigartig.

Hämostase findet sich bei Vertebraten als auch bei Invertebraten bis zu den Arthropoden, unabhängig davon, ob ein geschlossenes oder ein halboffenes Gefäßsystem vorliegt und wird immer durch einen spezialisierten Zelltyp vermittelt. Die Thrombopoese ein dabei ein evolutiv neues Phänomen, das sich ausschließlich bei Mammalia findet. Viele marine Invertebraten haben oft nur einen einzigen Zelltyp in der Hämolymphe. Diese **Hämozyten** übernehmen Aufgaben von der angeborenen Immunität (entsprechend Neutrophilen) bis zur Hämostase, wo sie nach Stimulation durch Agonisten aggregieren und einen Wundverschluss bilden. Bei Arthropoden finden sich **Amöbozyten**, die ein im Blutplasma befindliches Protein nach Freisetzung einer Koagulase zur Verklumpung bringen können.

Bei Vertebraten - mit Ausnahme der Säugetiere - finden sich kernhaltige **Thrombozyten**, die oft spindelförmig sind. Der Ausdruck "thrombocytes" wird in der angelsächsischen Literatur ausschließlich zur Beschreibung dieser kernhaltigen Zellen verwendet, während Blutplättchen von Säugetieren (und damit auch von Menschen) als "platelets" bezeichnet werden. Im Deutschen werden - wie auch in dieser Arbeit - beide Ausdrücke synonym gebraucht. Kernhaltige Thrombozyten finden sich bei Fischen, Amphibien, Reptilien und Vögeln. In den letzten Jahren wurde die Thrombopoese durch transgene Technologien von transparenten Zebrafischen (*Danio rerio*) visualisiert.

## 1. Einleitung

Ein großes Verdienst bei der Darstellung vergleichender Hämostase kommt LEVIN zu, der insbesondere Hämostase durch Amöbozyten von *Limulus polyphemus*, dem Pfeilschwanzkreb (engl. Horseshoe crab) untersucht hat. Übersichtsarbeiten finden sich bei [14, 15]].

Säugetiere haben weitere Mechanismen entwickelt, um Hämostase unabhängig von der MK-Plättchen-Achse aufrechtzuerhalten, z.B. durch Vasokonstriktion oder Gerinnung. Darüberhinaus ist bekannt, dass Plättchen über die Blutstillung hinaus Funktionen in der Immunantwort haben, die durchaus als Überreste der Funktion von Hämozyten oder Amöbozyten betrachtet werden können. So können Thrombozyten mit Bakterien und Viren, Pilzen oder Parasiten interagieren. Es ist daher angebracht, die Rolle von Blutplättchen bei Säugetieren oder dem Menschen nicht kategorisch auf die Hämostase zu beschränken. Die Ursache für den Übergang von kernhaltigen Thrombozyten zu anukleären Plättchen bei Säugern bleibt aber weiterhin spekulativ.

Die begrenzte Verfügbarkeit von humanen Megakaryozyten hat den Einsatz von Tiermodellen zur Untersuchung der Thrombopoese unumgänglich gemacht, allerdings sollte auch auf die Unterschiede hingewiesen werden: So exprimieren MKs von Maus, Ratte oder Katze große Mengen von **Acetylcholinesterase**, die auch als Markerenzym für MKs verwendet werden kann [16, 17], während humane MKs für Acetylcholinesterase negativ sind. Größe von Plättchen oder MKs unterscheiden sich ebenso wie die Plättchenkonzentrationen im peripheren Blut. Thrombopoese erfolgt im Menschen auch weitestgehend ausschließlich im Knochenmark, während es in der Maus signifikante extramedulläre Thrombopoese gibt mit großen Mengen von MKs z.B. in der Milz.

### 1.4. Megakaryo- und Thrombozytopoese: von der hämatopoetischen Stammzelle zum Plättchen

Megakaryozyten (MKs) stellen eine wesentliche Zellreihe innerhalb der Hämatopoese dar und sind die Vorläuferzellen aller Blutplättchen. Sie entwickeln sich wie alle anderen Blutzellen aus der hämatopoetischen Stammzelle im Knochenmark). MKs sind im Knochenmark leicht als sehr große Zellen (bis zu über 80 µm im Durchmesser) zu identifizieren. Der relative zelluläre Anteil liegt allerdings bei nur 0,2% aller kernhaltigen Zellen (Daten in der Literatur schwanken zwischen 0,05% und 0,4% [18, 19]). Durch klassische Färbetechniken (Wright-Giemsa, May-Grünwald) lassen sich verschiedene Reifestadien von MKs unterscheiden: die erste nachweisbare Zelle in der megakaryozytären Linie (**Stadium I**) ist der **Megakaryoblast**. Er ist in der Größe noch nicht von Lymphozyten zu unterscheiden. Reifere Megakaryoblasten werden polyploid (siehe Kapitel 1.4.3), sind transkriptionell hoch aktiv, **basophil** anfärbbar und erreichen zuletzt eine Größe von 15-50 µm. Mit der weiteren Ausreifung geht die Anfärbbarkeit mit basophilen Farbstoffen zurück und es entstehen (**Pro**)-**Megakaryozyten (Stadium II)**, die viele Granula beinhalten. Diese lassen sich durch **azuophile** Romanowsky-Färbung sichtbar machen und sind mit 20-80 µm etwas größer als Megakaryoblasten. Die meisten MKs, die sich in einem gesunden Knochenmark anfärben lassen, entsprechen diesem Stadium. Reife **Megakaryozyten (Stadium III)** haben aufgrund der Abnahme von Ribosomen und der Zunahme von Granula ein eher azidophiles Zytoplasma. Mitunter werden **Proplättchen**-bildende MKs auch als **Stadium IV** bezeichnet. Für eine detaillierte Beschreibung der Färbetechniken siehe auch CHESTERMAN & PENINGTON [20]. Im Rahmen der Differenzierung wandern die Zellen aus der osteoblastischen

## 1. Einleitung

Nische des Knochenmarks zu den Knochenmarksinusoiden, wo sie sich in der vaskulären Nische einfinden. Die Wanderung wird im wesentlichen durch die Chemokine *Fibroblast growth factor* (FGF)-4 und *Stromal-derived factor* (SDF)-1 bewirkt, dessen Rezeptor CXCR4 auf MKs hoch exprimiert wird [21]. Die Wirkungsweise von FGF-4 ist hingegen bislang unzureichend untersucht. Abschließend sei eine Reihe von Übersichtsartikeln erwähnt, die verschiedene Aspekte der Ausreifung von MKs zu Thrombozyten beleuchten [22-26]

In den folgenden Kapiteln sollen verschiedene Aspekte der Differenzierung von MKs näher charakterisiert werden: Erstens soll die Megakaryopoese im Blickwinkel der Hämatopoese betrachtet werden. Zweitens sollen Differenzierungsmarker für die verschiedenen Reifungsstadien der megakaryozytären Reihe vorgestellt werden. Drittens werden Mechanismen beschrieben, die zur Induktion von Endomitose und Polyploidie führen. Viertens folgt ein Abriss der Transkriptionsfaktoren, welche die Megakaryopoese regulieren. In den beiden abschließenden Kapiteln sollen humorale Faktoren vorgestellt werden, die die Differenzierung von MKs induzieren, sowie TPO und seine Signalkaskaden dargestellt werden.

### **1.4.1 Modelle der Megakaryopoese als Teil der Hämatopoese**

Die erste umfassende Theoriebildung der Hämatopoese fußt auf der Induktion und Charakterisierung von Blutzellclustern, die sich aus jeweils einer einzelnen Vorläuferzelle (sogenannte **klonogene Assays**) im semi-soliden Medium in der Gegenwart von Wachstumsfaktoren gebildet haben. Die sogenannten Kolonie-bildenden Einheiten (**colony-forming units**, CFU) zeigen, welches hämatopoetische Potential die Zelle noch gehabt hat. Es ist um so größer, je mehr verschiedene Zelltypen aus ihr entstehen können. Werden z.B. aus einer Zelle noch Granulozyten, Erythrozyten, Monozyten und Megakaryozyten, so spricht man von einer CFU-GEMM. Am besten ist das hämatopoetische System in der Maus untersucht worden. Nach dem Modell von WEISSMAN und AKASHI entwickelt sich die hämatopoetische Stammzelle (mit Selbsterneuerungspotential) zu einer multipotenten Stammzelle, die das Potential zur Selbsterneuerung verloren hat, sich aber in die Vorläuferzellen der lymphoiden Reihe (*Common Lymphocyte Progenitor*, CLP) oder der myeloiden Reihe (*Common Myeloid Progenitor*, CMP) teilen kann [27]. CLPs entwickeln sich dann weiter zu B-Zellen, T-Zellen, natürlichen Killerzellen oder dendritischen Zellen. Dem CMP entspricht der CFU-GEMM, d.h. noch alle myeloischen Zellen können sich entwickeln. In der weiteren Differenzierung spalten sich die granulozytäre und monozytäre Linie (CFU-GM oder GMP) von der erythroiden / megakaryozytären Linie (CFU-MK/CFU-E oder MKEP) ab. MKEP-Zellen lassen sich durch die Expression von CD34 und CD38 sowie die Abwesenheit von IL3Ra und CD45RA charakterisieren und diese differenzieren dann über Burst-Forming Unit (BFU)-MKs und CFU-MKs zum Megakaryoblasten und MKs aus [28].

Dieses Modell ist in den letzten Jahren von ADOLFSSON und JACOBSEN herausgefordert worden. Nach ihren Daten geht von der hämatopoetischen Stammzelle als erstes das Potential verloren, sich zur megakaryozytären/erythroiden Reihe zu entwickeln, während ein "lymphoid primed multipotent progenitor", LMPP sich noch zu allen lymphoiden Zellreihen und in die monozytäre/granulozytäre Reihe differenzieren kann [29, 30]. Beide Modelle konvergieren für die megakaryozytäre Entwicklung auf der Stufe des megakaryozytären/erythroiden Progenitors

## 1. Einleitung

(MKEP). Für die MKs ergibt sich danach eine Differenzierungsreihe über den CFU-Mega und Megakaryoblasten zu Megakaryozyten.

Das hämatopoetische System, das sich aus Kolonie-Experimenten durch klonogene Assays ergibt, bildet somit ein hierarchisches System von Zellen, die mit zunehmender Ausreifung ihr Potential verlieren, sich in verschiedene Zelltypen entwickeln zu können. Schließlich differenzieren sie zu einer reifen Zelle des peripheren Bluts, welche zwar Effektorfunktionen haben, sich jedoch in keine weiteren Zelltypen weiterentwickeln können. Die Differenzierungsentscheidungen fallen in der Gegenwart von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren bzw. Zytokinen. Faktoren, die spezifisch die Differenzierung von Stammzellen zu MKs bzw. die weitere Differenzierung zu Thrombozyten fördern, sind lange postuliert worden. Interleukin (IL)-3, IL-6 und IL-11 sowie *Leukemia inhibitory factor* (LIF) haben allerdings nur geringes Differenzierungspotential. Erst 1994 konnte mit Thrombopoietin ein hämatopoetisches Zytokin kloniert werden, das sowohl die Differenzierung zu MKs induziert als auch die Ausreifung von MKs fördert. Eine exzellente Übersicht dazu findet sich bei Kaushansky [31, 32] sowie in Monographien [14].

### **1.4.2 Differenzierungsmarker in der Megakaryopoese**

Die Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen zu reifen Zellen des peripheren Bluts geht mit einer Veränderung in der Zellausstattung einher. Dieser Weg kann anhand der Expression (oder der Abwesenheit) von Proteinen oder Eigenschaften (wie Ploidie) beschrieben werden, wobei diese "Marker" nicht notwendigerweise funktional sein müssen, sondern auch als Surrogat fungieren können. Die Differenzierungsnachweise können auf unterschiedlichsten Wegen erfolgen: der Anfärbbarkeit von Zellen im Knochenmark (Wright-Giemsa-Färbung), der Expression von Transkriptionsfaktoren oder von Glykoproteinen auf der Zelloberfläche.

Oberflächenantigene sind zur Untersuchung der Hämatopoese vielfältig eingesetzt worden, insbesondere durch die Verfügbarkeit der gut charakterisierten *cluster of differentiation* (CD)-Antigene, gegen die hoch-spezifische Antikörper generiert wurden, welche erfolgreich in der Durchflußzytometrie (FACS) eingesetzt werden können. Die Entwicklung von kleinen magnetischen Partikeln, die an Antikörper gekoppelt werden können (*Magnetic Activated Cell Sorting*) erlaubt eine Anreicherung von Populationen mit hoher Reinheit auch ohne teure Sortiergeräte. Insbesondere innerhalb der Lymphopoese sind die Stufen der T- und B-Zellentwicklung sehr gut durch die serielle Expression von Oberflächenantigenen charakterisiert worden. Diese Methode wird auch als **Immunphäotypisierung** bezeichnet. Auch für die Megakaryopoese ist eine Reihe von Markern bekannt, allerdings kann die Phäotypisierung der einzelnen Entwicklungsstufen bei weitem nicht so feinmaschig erfolgen wie für die lymphoiden Linien [26].

Als Marker für die megakaryozytäre Linie gilt CD41, das  $\alpha$ IIb-Integrin. CD41 ist aber auch auf hämatopoetischen Vorläuferzellen (3% der CD34+ Zellen im Knochenmark) exprimiert, die sich nicht alle zu MKs differenzieren, sondern CD41 dann herunterregulieren. Erst durch die Expression der  $\beta$ 3-Integrinkette (CD61) des Fibrinogenrezeptors liegt ein spezifischer Marker vor, auch wenn CD61 noch auf wenigen anderen Zelltypen detektiert werden kann. Die Co-Expression von CD41/CD61 kann als eigentlicher Marker für die megakaryozytäre Linie gewertet werden und geht der Expression von CD42, dem Rezeptor für vWF voraus. Diese Zellen bilden in

## 1. Einleitung

den klonogenen Assays den CFU-Mk. CD42 ist ein Multimer bestehend aus den Glykoproteinen GPIX (CD42a), GPIb $\alpha$  (CD42b), GPIb $\beta$  (CD42c) und GPV (CD42d) mit einer komplexen Stöchiometrie. Zunächst bildet sich ein Komplex von GPIb und GPIX, der auch auf der Oberfläche nachweisbar ist, während die Expression von GPV später auf der Oberfläche erscheint. Diese Zellen sind in klonogenen Assays weniger potent [33]. Zeitgleich mit der Expression des kompletten CD42-Komplexes sind auch andere MK-spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche detektierbar, wie z.B. die Kollagenrezeptoren GPVI,  $\alpha 2\beta 1$  (GPIa/IIa) und CD36, PECAM-1 (CD31) sowie ein Anstieg des Thrombopoietin-Rezeptors c-Mpl (CD110) [34, 35]. vWF wird von MKs in frühen Ploidie-Stadien (2N und 4N) exprimiert, zeitgleich erfolgt die Einleitung der Endomitose [36].

### **1.4.3 Polyploidie**

In nahezu allen Zellen wird im Rahmen der Zellteilung genau darauf geachtet, dass sich das genetische Material genau einmal verdoppelt und dass es anschließend exakt auf die beiden Tochterzellen verteilt wird. Eine Zelle, die nach der S-Phase einen DNA-Gehalt von 4n hat, kann nicht noch einmal in die S-Phase gehen, ehe die Zelle sich geteilt hat. Der Prozess unter der Bezeichnung "**replication licensing**" bewirkt also, dass jeder Replikationsursprung (ori) nur einmal "feuert" und abgeschaltet bleibt, bis die Zellteilung vollständig abgelaufen ist [37]. Einige Zelltypen, die transkriptionell hoch aktiv sind, können aber auch mehr genetisches Material enthalten, so z.B. Hepatozyten, die zwei oder drei Zellkerne aufweisen, je mit einer eigenen Kernmembran umgeben. MKs gehören zusammen mit Trophoblasten zu den wenigen Zelltypen, die endomitotisch aktiv sind, eine hohe Transkriptionsrate aufweisen und polyploid werden [38]. Endomitose erfolgt innerhalb der Megakaryopoese nach der Differenzierung zu CD42-positiven Zellen und geht einher mit dem Aufbau des inneren Demarkationsmembransystems (DMS, siehe auch Kapitel 1.5.1). Reife MKs können einen DNA-Gehalt von bis zu 128N aufweisen, wobei die modal häufigste Ploidiestufe aber 16N ist. Ein Vorteil der Polyploidie ist gewöhnlich eine Zunahme an Zellgröße [39].

Auch die Ploidiestufen der MKs korrelieren mit der Zellgröße und damit der Anzahl der Plättchen, die gebildet werden können [40]. Allerdings können auch MKs mit geringer Ploidie Proplättchen bilden, so dass eine 16N-Zelle "reifer" sein kann, als ein Megakaryozyt mit 64N. In der Literatur findet man häufig den Begriff **Endomitose**, basierend auf der ursprünglichen Annahme, dass der Nukleus mit Kernmembran intakt bleibt [41]. Ultrastrukturelle Analysen haben gezeigt, dass eine "normale" Mitose stattfindet, allerdings unter Auslassung von Anaphase 2, Telephase und Zytokinese [42]. Nach Anaphase 1 gehen die Zellen wieder direkt in die G1-Phase des Zellzyklus. Daher sollte technisch (z.B. in Abgrenzung zu Hepatozyten, in denen mehrere intakte Zellkerne vorkommen) von **Endoreplikation** gesprochen werden. Der reife MK enthält den viellappigen Nucleus unter einer einzelnen Kernmembran [26].

Die regulatorischen Mechanismen, die zur Polyploidie führen, sind vielfältig untersucht worden, wobei der aktuelle Stand der Forschung noch immer verwirrend und kontrovers ist. Veränderungen in der Expression von Cyclinen (Cyclin B, Cyclin D1 und **Cyclin D3**) korrelieren mit der Induktion der Endoreplikation. In den korrespondierenden Mausmodellen konnte allerdings keines der Cycline als essentiell für die Ploidisierung identifiziert werden [43]. Daneben

## 1. Einleitung

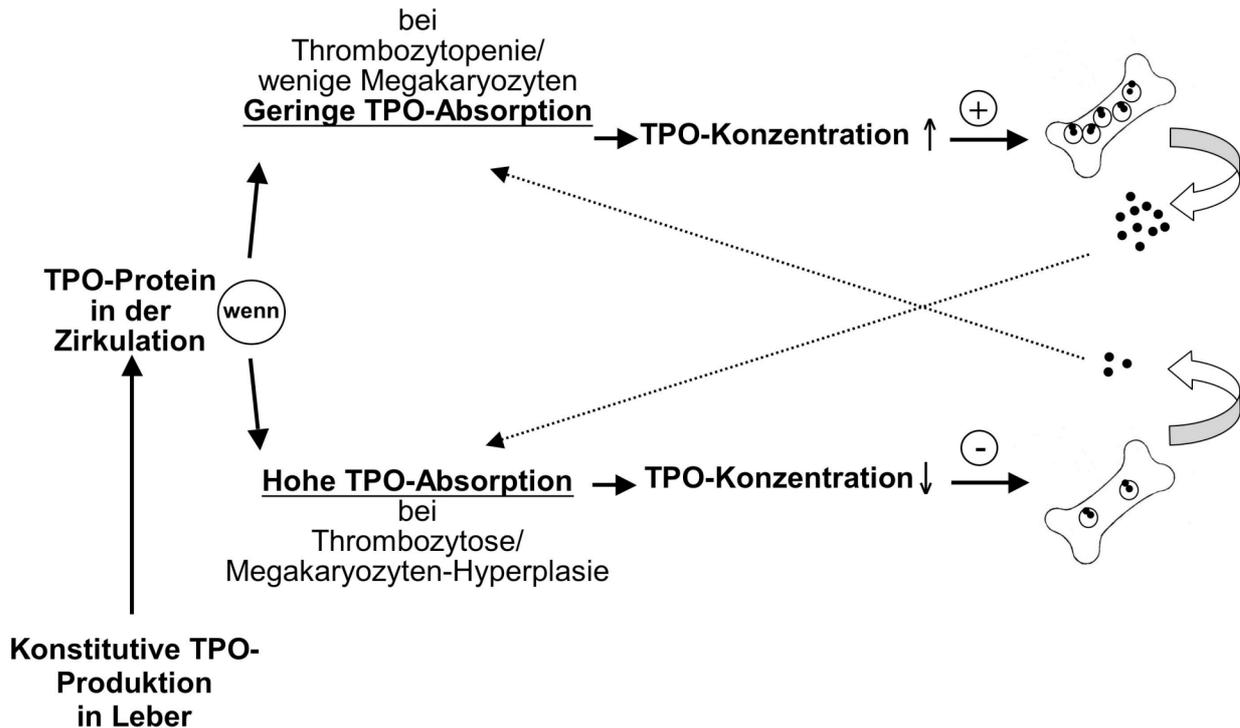
wurden die Zellzykluskinase **Aurora B** und **Survivin** sowie der zytoplasmatische Teil von GPIIb/IIIa als Kandidatenproteine diskutiert. Entscheidend ist hier jedoch lediglich, dass die Endoreplikation tatsächlich zu einer funktionalen Amplifikation des Genoms führt [44].

RASLOVA hat MKs mit distinkten Ploidiestufen (2N, 4N, 8N und 16N) sortiert und vergleichende Genexpressionsprofile erstellt. Da frühe Megakaryoblasten noch nicht polyploid sind, kann die 4N-Stufe auch noch der G2-Phase proliferierender MKs entsprechen. In ihrer Studie haben die Genexpressionsprofile von MKs der Ploidiestufen 2N und 4N sowie die der Stufen 8n und 16N zusammen geclustert. Von den ca. 100 diskriminierenden Genen, die 2N/4N- von 8N/16N-MKs unterscheiden, codieren die meisten für Plättchen-spezifische Proteine. Gene, die während zunehmender Ploidisierung kontinuierlich herunterreguliert werden, haben weitestgehend Funktionen in DNA-Replikation und DNA-Reparatur. Zusammenfassend kommen die Autoren zum Schluss, dass Polyploidisierung nicht mit einer spezifische Rolle in der Regulation der Genexpression einhergeht, sondern einem intrinsischen Differenzierungsprozess entspricht. [45].

### **1.4.4 Humorale Faktoren der Megakaryopoese und der Thrombozytenhomöostase**

In der klinischen Chemie wird die Zahl von Thrombozyten im peripheren Blut beim Erwachsenen zwischen 150000/ $\mu$ l und 400000/ $\mu$ l angegeben. Fällt der Wert unter 150000/ $\mu$ l spricht man von **Thrombozytopenie**. Erhöhte Werte über 400000 können Folge einer anderen Grunderkrankung sein (z.B. Infektionen, Tumoren, Leberschäden oder Zustand nach Splenektomie), dann spricht man von einer **reaktiven Thrombozytose**. Erhöhte Plättchenkonzentrationen entstehen aber auch als Konsequenz einer Deregulation (z.B. im Rahmen von myeloproliferativen Erkrankungen wie Polyzythämia vera, Myelofibrose oder Essentieller Thrombozythämie zumeist durch Jak2-V617F Mutationen) - dann spricht man von einer **Thrombozythämie**. Die Lebensdauer von Thrombozyten ist mit 8-10 Tagen vergleichsweise kurz und so müssen täglich ca.  $1 \cdot 10^{11}$  neue Blutplättchen generiert werden [19, 26, 46]. Die Thrombopoese wird im wesentlichen durch einen einzigen humoralen Faktor reguliert, das **Thrombopoietin** (TPO), einem Mitglied der Zytokin-Superfamilie, welches ein stark-glykosyliertes Protein mit zwei Domänen ist: die N-terminale Domäne weist eine hohe Homologie zu Erythropoietin auf und ist für die biologische Aktivität ausreichend. Die C-terminale Domäne hat keine bekannte Funktion, erhöht aber die Halbwertszeit und Bioverfügbarkeit im Plasma. TPO wird im wesentlichen in der Leber von Hepatozyten gebildet und wird konstitutiv ins Blut abgegeben. Darüberhinaus können auch Niere und Stromazellen im Knochenmark TPO produzieren, sie tragen aber nur marginal zum gesamten TPO-Level bei [47, 48]. Die Wirkung von TPO auf die Plättchenzahlen im Blut folgt zunächst einem einfachen Regelkreis, bei dem die TPO-Konzentration durch Bindung an den Rezeptor **c-Mpl** auf Zielzellen (MKs und Blutplättchen) reguliert wird. Bei einem Verlust von Plättchen kann weniger TPO gebunden werden und es kommt so zu einem erhöhten TPO-Spiegel im Plasma. Dieser Anstieg an TPO wirkt stimulierend auf hämatopoetische Vorläuferzellen im Knochenmark und verstärkt so die Megakaryopoese und erhöht in der Folge die Produktion von Thrombozyten (siehe Abb. 3) [49]. Der TPO-Rezeptor ist außer auf Plättchen und den MKs im Knochenmark nicht wesentlich auf anderen Geweben exprimiert.

## 1. Einleitung



**Abb. 3:** Regelkreis von Thrombopoietin (TPO)-Bildung in der Leber und Thrombozytopoese im Knochenmark. Details siehe Text, Abbildung verändert nach [50].

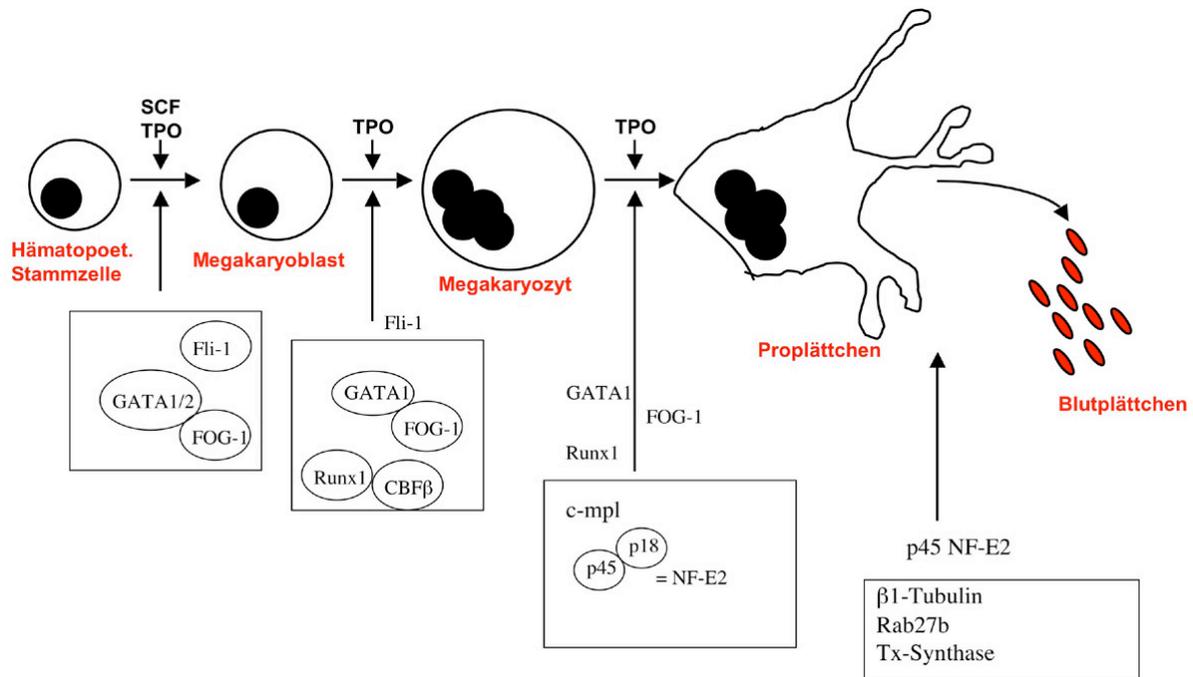
TPO-Serumspiegel sind bei einer Vielzahl von thrombozytopenischen Erkrankungen im Kindesalter und bei Erwachsenen bestimmt worden [51]. Grundsätzlich sind TPO-Spiegel bei einer Thrombozytopenie erhöht, wenn diese aufgrund einer Bildungsstörung auf Ebene der MKs im Knochenmark vorliegt wie zum Beispiel bei den congenitalen (angeborenen) Erkrankungen CAMT oder TAR-Syndrom (siehe Kapitel 1.7) oder nach Reduktion des Stammzellkompartiments nach Chemo- oder Strahlentherapie). Bei Thrombozytopenie durch einen vermehrten Umsatz oder einer gesteigerten Plättchen-Zerstörung ist das Knochenmark reich an Vorläuferzellen und TPO-Spiegel sind normal. Weitere Details zum TPO-Regelkreis findet sich in Anlehnung an die Untersuchungen von KUTER bei KAUSHANSKY [32].

### 1.4.5 Transkriptionsfaktoren

Das Wechselspiel von humoralen Faktoren und Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Interaktionen und/oder stochastischen Entscheidungen von Vorläuferzellen im Knochenmark bewirkt die Zahl und Differenzierung zu MKs und Thrombozyten. Für die Megakaryopoese sind durch die Generierung von Mausmodellen eine Reihe von Transkriptionsfaktoren identifiziert worden von denen im Folgenden nur einige wenige detailliert beschrieben werden können. Eine Reihe von Übersichtsartikeln, einschließlich zweier Arbeiten des Autors, stellen den aktuellen Stand der Forschung zusammen (siehe Kapitel 2.8 und 2.9) [25, 52, 53]. Zu den Faktoren, die in der ersten Phase die Megakaryopoese induzieren, gehören die Zinkfingerproteine GATA-2 und GATA-1. In der frühen Phase bildet **GATA-2** zusammen mit einem anderen Zinkfingerprotein *Friend of GATA* (FOG)-1 ein Heterodimer, das für die Induktion der erythroiden und megakaryozytären Linie wichtig ist. Dabei kann GATA-1 auch den Verlust von GATA-2 ersetzen. Später in der

## 1. Einleitung

Differenzierung ist dann der Komplex zwischen **GATA-1** und **FOG-1** essentiell [54]. GATA-1-defiziente-Mäuse haben eine schwere Thrombozytopenie mit vergrößerten Thrombozyten. Das Knochenmark zeigt viele MKs mit einem Differenzierungsstopp [55]. Mutationen in GATA-1 sind beschrieben worden und werden in Kapitel 1.7 diskutiert.



**Abb. 4:** Essentielle Transkriptionsfaktoren für die Megakaryopoese und Thrombozytopenie. Die für den jeweiligen Schritt charakteristischen Faktoren sind in der Box angegeben. Für NF-E2 sind einige charakterisierte Zielgene angeführt.

**Fli-1** ist ein Protein mit einer Ets-Domäne und ist essentiell für die Megakaryopoese und für die Angiogenese. Deletionen auf Chromosom 11q23 führen zu einem Verlust des *fli-1*-Gens und zu einer Makrothrombozytopenie beim Paris-Trousseau-Syndroms [56], Interessanterweise führt die gezielte Aktivierung des mutierten und gesunden Allels zur Ausprägung zweier distinkter Megakaryozytenpopulationen [57]. **Runx-1** (AML1) ist ein Transkriptionsfaktor, der früh auf die Megakaryopoese wirkt. Das Verhältnis der Expression von Runx1 zum Faktor Pu.1 entscheidet zwischen Induktion der myeloischen Reihe bzw. der megakaryozytären Reihe. Die t(8;21)-Translokationen von AML-1 mit ETO ist eine typische chromosomale Aberration bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) im Kindesalter [58]. **NF-E2** ist der Schlüsselfaktor für die terminale Thrombopoese. Der Transkriptionsfaktor besteht aus einer spezifischen **p45<sup>NF-E2</sup>**-Untereinheit und einem Mitglied der kleinen Maf-Proteine, z.B: **MafG** oder **MafK**, die ubiquitär exprimiert werden. Im Mausmodell führt der Verlust von **p45<sup>NF-E2</sup>** dazu, dass keine Blutplättchen mehr gebildet werden, während das Knochenmark viele MKs mit einem Ausreifungsstopp aufweist [59]. Mäuse, die für MafG und MafK doppelt-negativ sind, weisen für die Megakaryopoese denselben Phänotyp auf [60]. Viele Arbeitsgruppen haben inzwischen Zielgene von NF-E2 identifiziert, allerdings ist nur für wenige eine entscheidende Rolle in der Thrombopoese gezeigt worden. Zu ihnen gehören **β1-tubulin** und **Rab27b** [61, 62] (siehe Abb.4).

## 1. Einleitung

### **1.4.6 Signaltransduktion des Thrombopoietin**

Hämatopoetische Stammzellen exprimieren c-Mpl, den Rezeptor für TPO und behalten ihn als Marker bis zum Thrombozyten-Stadium auf der Zelloberfläche. Nach Bindung von TPO kommt es auf Zellen der Megakaryopoese zur Rezeptoraktivierung, welche innerhalb weniger Minuten zur Phosphorylierung der Tyrosinkinase Jak2 und Tyk2 führt, wobei Tyk2 in Zellkulturmodellen als nicht essentiell für die Signalkaskade beschrieben worden ist [63]. Jak2-Aktivierung führt zur Phosphorylierung einer Vielzahl von Substraten in verschiedenen Signalwegen (siehe Abb. 5):

1. Aus der Familie der **STAT**-Moleküle (Signal Transducer and Activator of Transcription) werden Stat1, Stat3, Stat5a und Stat5b aktiviert. Diese Homo- und Heterodimerisieren nach Phosphorylierung und translozieren in den Kern, wo sie die Transkription ihrer Zielgene initiieren [64-67]. Diese Signalkaskaden werden durch Aktivierung von negativen Regulatoren (z.B. SOCS-1) wieder abgeschaltet [68].

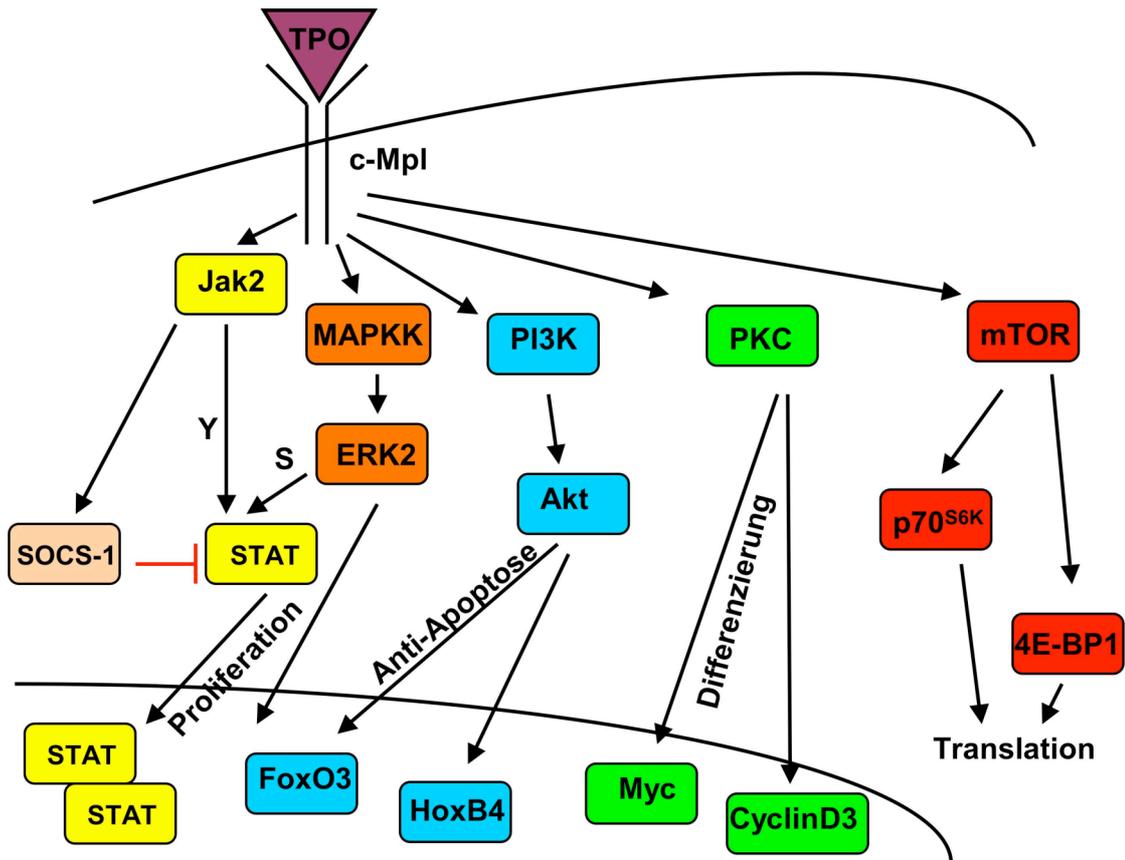
2. Der Ras-Raf-Signalweg wird aktiviert, hier im Besonderen die MAP-Kinase **ERK2** [67, 69].

3. Die Aktivierung der Phosphatidylinositol3-kinase (**PI3K**) führt zur Phosphorylierung der Serin/Threoninkinase Akt. Diese ist essentiell für die Vermittlung von anti-apoptischen Signalen. Als Substrate wurden **FoxO3**, ein Transkriptionsfaktor der Forkhead-Familie und der Homöobox-Faktor **HoxB4** identifiziert, der die Expansion der hämatopoetischen Stammzellen bewirkt. So kann erklärt werden, warum TPO auch als Wachstumsfaktor für diese Stammzellen fungiert, [70-73].

4. Verschiedene Isoformen der Proteinkinase C (**PKC**), insbesondere PKC $\alpha$ , PKC $\epsilon$  und PKC $\zeta$ , werden aktiviert und führen unter anderem zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors **c-Myc** [70, 74, 75]. Es ist seit langem bekannt, dass leukämioide Zelllinien, insbesondere Erythroleukämien und megakaryoblastische Zelllinien wie K562 oder L8057, durch Inkubation mit Phorbol-ester zu MKs differenziert werden können. Dies wurde zumeist durch Hochregulation von Oberflächenmarkern wie CD61 und Zunahme an Ploidie gezeigt, wobei in der Regel zeitgleich Marker anderer Zellreihen (z.B. Glykophorin A, CD235a) herunterreguliert werden [76].

5. Es kommt zur Phosphorylierung von mTOR, p70S6K und 4E-BP1 und zur Modulation der Ploidisierung von MKs durch Cyclin D3 und Zellzykluskinaseinhibitoren [45, 77, 78]. In den letzten Jahren wurde die Bedeutung des Rapamycin-**mTOR**-Signalweges für die Thrombopoese gezeigt. Durch die Komplexität der intrazellulären Signalwege, die auch stark untereinander vernetzt sind und sich gegenseitig beeinflussen, werden sicherlich noch andere Signaltransduktionswege durch Thrombopoietin beeinflusst. Viele Studien, die sich mit dieser Thematik befassen, verwenden hierfür Zelllinien. Dabei ist die Untersuchung der Thrombopoese jedoch problematisch, insbesondere die terminale Differenzierung von reifen MKs zu Thrombozyten, da etablierte Zelllinien ein entartetes und ungebremstes Wachstum zeigen, für die Thrombopoese jedoch Teile der apoptotischen Maschinerie benötigt werden [79].

## 1. Einleitung



**Abb. 5:** Vereinfachter Überblick über verschiedene Signalwege in Megakaryozyten, die nach Stimulation mit Thrombopoietin (TPO) aktiviert werden. Y= Tyrosinphosphorylierung, S= Serinphosphorylierung. Die zellbiologischen Begriffe bezeichnen nur grob die zugrundeliegende Biologie.

## 1.5. Haut, Muskeln und Knochen: Membransysteme und Zytoskelett in der Thrombopoese

### 1.5.1 Das Membransystem des Megakaryozyten

Die ersten elektronenmikroskopischen Arbeiten zur Ultrastruktur von MKs erfolgten 1957 durch YAMADA an Zellen in der Milz der Maus. Er hatte ein ausgedehntes Membransystem im Inneren der MKs beobachtet. Diese Membransysteme waren in der Form von Feldern angeordnet, die wie vorgeformte, zukünftige Plättchen aussahen, da sie bereits mit Granula gepackt waren [80]. Diese **Platelet territories** sollten also bei der Thrombopoese aus dem Inneren des MKs an das Blut als neu geformte Plättchen abgegeben werden. Da es die zukünftigen Plättchen voneinander abgrenzt, wurde es als **Demarkationsmembransystem** (DMS) bezeichnet. Es bildet sich durch Invagination der äußeren Zellmembran wie man durch Färbetechniken gezeigt hat: Bei der Inkubation von MKs in den Färbelösungen konnte auch das DMS angefärbt werden und ist somit von außen für zugefügte Farbstoffe wie *Ruthenium Red* zugänglich [81, 82]. Diese Theorie wurde in den folgenden Jahren verschiedentlich ausgebaut, insbesondere durch die Arbeiten von ZUCKER-FRANKLIN, deren Atlas der Hämatopoese ein Meilenstein in der Ultrastruktur-Kennntnis der MKs und Plättchen war [13, 83-85]. Verfeinerungen des Modells finden sich bei KOSAKI, der

## 1. Einleitung

2005 ein "Proto-Plättchen" der Thrombopoese vorschlägt [23] (zur Diskussion siehe auch Kapitel 3.2).

Andere haben die Daten unterschiedlich interpretiert und eine Reihe von Problemen, die sich aus dem Plättchenfelder-Modell ergibt, in das Zentrum ihrer Kritik gestellt: jedes Blutplättchen ist mit Mikrotubuli-Filamenten in der Peripherie ausgestattet. Diese "platelet marginal band coil" setzt voraus, dass bei der Abschnürung der "vorgeformten" Plättchen auch Mikrotubuli-Filamente das Plättchen umgeben. Diese konnten allerdings in den EM-Bildern nicht identifiziert werden. Alternativ wurde die Funktion des DMS als Membran-Reservoir erkannt, das den immensen Zuwachs an Oberfläche ermöglicht, wenn sich eine einzige kugelförmige Zelle mit einem Durchmesser von 50-80  $\mu\text{m}$  in ca. 1000 Plättchen transformiert, die jeweils mit einer Membran eingepackt werden müssen. RADLEY hat den Namen "Demarkationsmembransystem" als unzutreffend charakterisiert, da es keine neuen Plättchen demarkiert, d.h. abgrenzt, sondern als Membranreservoir dient [86, 87]. Von RADLEY und HALLER stammt auch die erste Reihe von Fotografien mittels zeitauflösender Mikroskopie zur Dynamik von **Proplättchen** [88]. Mit verbesserter Zeitraffer-Videomikroskopietechnik und der Möglichkeit, die Bilder zu Videofilmen zusammenzusetzen hat ITALIANO maßgeblich zum Verständnis der Dynamik von Proplättchen beigetragen [89]. Das Proplättchenmodell ist Gegenstand vielfältiger Übersichtsartikel, auf die hier nicht weiter eingegangen werden soll [22, 23, 90-92].

### **1.5.2 Die Rolle des Zytoskeletts: Mikrotubuli und Actin-Filamente**

Die Bedeutung von Mikrotubuli für die Thrombopoese wurde von TABLIN und LEVEN durch den Einsatz von Zellgiften wie Colchicin erkannt, die die Ausbildung von Proplättchen in der Zellkultur inhibiert haben [93, 94]. Färbungen von reifen, Proplättchen-bildenden MKs mit Antikörpern gegen Tubulin zeigen in der Immunfluoreszenz, dass polymerisierte Mikrotubuli-Filamente die Proplättchenschäfte auskleiden. An der Spitze dieser Schäfte bildet sich dann eine tränenförmige Struktur und die Mikrotubuli-Filamente lagern sich zu einer Spirale zusammen, welche dann die äußere Struktur des Blutplättchens bilden wird [89]. Es ist sicher eine zellbiologische Meisterleistung, dass aus einer einzigen sphärischen Zelle ca. 1000 diskoidale Zellfragmente entstehen, deren Morphologie sich im Grunde kaum unterscheidet. Die detaillierte Beobachtung der Proplättchenbildung *in vitro* mittels Zeitraffer-Videomikroskopie hat zum einen gezeigt, wie hoch dynamisch dieser Vorgang ist und zum anderen eine Reihe von neuen Fragen aufgetan:

(1) Wie wachsen die Mikrotubuli-Filamente aus dem Zellkörper des MKs hinaus? Mit welcher Geschwindigkeit erfolgt das Vorwärtstreiben der Ausläufer?

(2) Plättchen werden nur an den Spitzen der Proplättchen abgeschnürt, dabei kommt es zu Verzweigungen der Proplättchen nach Biegen und Drehen der Schäfte. Nach den Verzweigungen müssen die neuen Ausläufer wieder mit Mikrotubuli ausgekleidet werden und dazu müssen neue Mikrotubuli weit entfernt vom Zellkörper polymerisiert werden. Wie werden diese ektopen Mikrotubuli-Filamente nukleiert, wenn klassische Nukleationsmechanismen wie der  $\gamma$ -Tubulin-Ringkomplex ( $\gamma$ -TuRC) nicht vorhanden sind?

(3) Von den 5  $\beta$ -Tubulin-Isoformen beim Menschen, ist  $\beta$ 1-Tubulin eine stark abweichende Isoform. Zum einen zeigt sie mit allen anderen Isoformen, die auf Aminosäureebene unterein-

## 1. Einleitung

ander ca. 95% homolog sind, eine starke Abweichung der Sequenz (ca. 70% Homologie zu den anderen Isoformen). Zum anderen ist es in seiner Expression stark restringiert. Neben den ubiquitär exprimierten  $\beta$ 2- und  $\beta$ 5-Tubulin, sind  $\beta$ 3- und  $\beta$ 4-Tubulin nur im Gehirn und in Neuronen zu finden.  $\beta$ 1-Tubulin findet sich nur in MKs und Plättchen. Was ist das besondere an  $\beta$ 1-Tubulin und welche Bindungspartner weist diese Isoform auf?

(4) Die Zugabe von Actin-Zellgiften wie Cytochalasin B oder D inhibieren nicht die Ausbildung von Proplättchen, aber deren Verzweigung. An welchen Stellen in der Thrombopoese sind Actin-Filamente bzw. deren Polymerisation essentiell?

**$\beta$ 1-Tubulin** ist ein essentielles Protein für die normale Thrombopoese. Mäuse, ohne  $\beta$ 1-Tubulin weisen nur 40% der normalen Plättchenzahlen auf. Die generierten Plättchen sind sphärisch statt diskoid und ultrastrukturelle Aufnahmen zeigen, dass das Mikrotubuli-Filament in der Peripherie von Plättchen nur 2-3 statt normalerweise 8-12 mal aufgewickelt ist [61, 95]. Um die Rolle von  $\beta$ 1-Tubulin in der Thrombopoese weiter zu charakterisieren, haben wir Proteine identifiziert, die an den C-Terminus von  $\beta$ 1-Tubulin binden, eine Domäne, die die Bindung von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs) vermittelt [96]. Dabei haben wir *Secretory Leukocyte Inhibitory Protein (SLPI)* identifiziert, ein Proteaseinhibitor, der sowohl mit Mikrotubuli assoziiert, als auch in den Granula lokalisiert ist. Daneben konnten wir auch **RanBP10**, ein bislang wenig charakterisiertes Protein, als  $\beta$ 1-Tubulin-bindendes Protein charakterisieren. Es spielt eine Rolle in der Nukleation bzw. Bündelung von Mikrotubuli in der Zellperipherie von reifen MKs (Manuskript in Revision). In Kapitel 2.2. zeige ich, welche Auswirkungen das Fehlen von SLPI auf die Thrombopoese und die Aktivierung von Thrombozyten mit Agonisten hat.

### **1.5.3 Inhaltsstoffe des Megakaryozyten: Granula und deren Transport**

Eine wesentliche Funktion der Thrombozyten besteht in der Hämostase. Der Verschluss eines verletzten Gefäßes erfolgt nach Plättchenaktivierung durch die Adhäsion von Thrombozyten an die subendotheliale Matrix sowie die Aggregation von Thrombozyten zu einem Thrombus. Zur maximalen Aktivierung von Thrombozyten ist die Sekretion von Granula essentiell. Blutplättchen haben drei verschiedene Formen von Granula, die aufgrund ihrer Erscheinung in der Elektronenmikroskopie und ihren Inhaltsstoffen unterschieden werden:  **$\alpha$ -Granula** sind am häufigsten, mit ca. 40-80 in humanen und 15-30 in murinen Plättchen. Sie beinhalten im wesentlichen Protein der Plättchenadhäsion, Chemokine, Gerinnungsfaktoren, allgemeine Wachstumsfaktoren und pro- wie antiangiogenetische Faktoren, darunter Fibrinogen, vWF, Faktor V oder  $\beta$ -Thromboglobulin oder *platelet-derived growth factor* PDGF. Auf der Membran der  $\alpha$ -Granula befinden sich weitere GPIIb/IIIa-Moleküle, die nach Degranulation die Fibrinogen-Rezeptordichte auf der aktivierten Plättchenmembran erhöhen. P-Selectin (CD62-P) findet sich nur auf der inneren Membran von  $\alpha$ -Granula, nicht aber an der Oberfläche von ruhenden Plättchen. Im Zuge der Exozytose wird P-Selectin an die Zelloberfläche gebracht und kann somit als **Aktivierungsmarker** fungieren. Elektronendichte oder "dense" Granula gaben den  **$\delta$ -Granula** ihren Namen. Sie sind kleiner und auch weniger häufig als  $\alpha$ -Granula. In ihnen konzentrieren sich Nukleotide wie ADP, ATP, GDP oder GTP, Pyrophosphat, zweiwertige Kationen wie  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Mg}^{2+}$  sowie

## 1. Einleitung

Serotonin, welches oft als Markermolekül für diesen Granulatyp gilt. Die Membran der  $\delta$ -Granula hat CD63 auf der Oberfläche, das wie CD62P als ein Aktivierungsmarker für die Exozytose gilt. Die  **$\lambda$ -Granula** haben lysosomale Inhaltsstoffe wie Hydrolasen, Cathepsine und in ihrer Membran Proteine wie CD63 und *Lysosomal Associated Membrane Protein* (LAMP)-1 und -2. Granulasyntese und -sortierung erfolgen bereits im MKs, wobei die Inhaltsstoffe insbesondere der  $\alpha$ -Granula sowohl durch Synthese innerhalb des MK erfolgen kann wie auch durch Pinozytose von außen, wie z.B. für Fibrinogen oder Faktor V nachgewiesen [97, 98]. In den letzten Jahren haben sich Modelle entwickelt, die gemeinsame Vorläufervesikel für  $\alpha$ - und  $\delta$ -Granula aufzeigen: die **multivesicular body**-Theorie geht davon aus, dass sich neben reifen  $\alpha$ -Granula auch unreife Granulavorstufen in MKs nachweisen lassen [99, 100]. Neben differentieller Sekretion von  $\alpha$ - und  $\delta$ -Granula, die durch Actin vermittelt wird [101], sind auch 2 Typen von  $\alpha$ -Granula beschrieben worden, die sich in ihrer Zusammensetzung unterscheiden. Eine Gruppe enthält eher pro-, die andere Gruppe anti-angiogenetische Faktoren, wobei die beiden  $\alpha$ -Granula-Subtypen auch differentiell sezerniert werden können [102]. Neben diesen zellbiologischen Mechanismen bleibt in der Zukunft wohl auch eine neue Rolle der Plättchen in der **Angiogenese** zu erforschen.

Im reifen MK müssen die Granula zusammen mit Mitochondrien von dem Zellkörper über die Proplättchen in die zu bildenden Thrombozyten transportiert werden und dabei Entfernungen im Bereich von 0,5mm zurücklegen. Jennifer RICHARDSON *et al.* haben gezeigt, dass der Transport entlang von polymerisierten Mikrotubuli-Filamenten erfolgt und im wesentlichen von Kinesinen als Motorproteinen vermittelt werden. Der vesikuläre Transport erfolgte individuell und bidirektional. Erreicht ein Vesikel allerdings die Spitze eines Proplättchens, so wird es dort gefangen und kehrt nicht mehr zum Proplättchenschaft zurück. Dabei wird gewährleistet, dass jedes Plättchen eine sehr ähnliche Grundausstattung von Granula bekommt [103].

### 1.6. Plättchenbiogenese *in vitro* und *in vivo*

Bis in die 90er Jahre des letzten Jahrhunderts wurde Thrombopoese nahezu ausschließlich mittels statischer Bilder der Elektronenmikroskopie ultrastrukturell untersucht. Obwohl diese Technik störungsanfällig und anfällig für Artefakte ist, wurden die Grundkonzepte vielfach korrekt beschrieben: z.B. die Lage der MKs an den Knochenmarks sinusoiden [104] oder der Vor-schub von pseudoplasmatischen Ausläufern durch das fenestrierte Endothel und das Abschnüren von Plättchen in die Blutgefäße [105].

In der Milz befinden sich reife MKs in der Nähe von Sinusoiden der roten Pulpa. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen kann man sehen, wie Abschnürungen von MKs bis hin zu ganzen MKs in das Lumen des Sinusoids gelangen [105]. Dabei wird das Endothel fenestriert und es kann sogar zu "Ausstülpungen" des MKs auf Seite des Knochenmarks kommen [106]. Ein Nachteil dieser Techniken besteht darin, dass die *in vivo*-Situation nur durch statische Bilder (Elektronen- und Rasterelektronenmikroskopie) gezeigt werden kann. MKs befinden sich im wesentlichen ausschließlich im Knochenmark, während sich Plättchen nicht in der Knochenmarkskavität, sondern ausschließlich im peripheren Blut befinden mit Ausnahme der Plättchen in der Milz und im retikuloendothelialen System. Aus diesen Beobachtungen hat sich ein Modell der Thrombopoese entwickelt, bei dem der eigentliche Geburtsprozess über die endotheliale Barriere

## 1. Einleitung

(also "**transmural**" [105]) erfolgt. AVECILLA zeigte in einer grundlegenden Arbeit die Co-Lokalisation von MKs im Knochenmark mit den Chemokinen FGF-4 und SDF-1 und deren Rezeptoren. Dazu folgt die Einbindung in das System der **osteoblastischen Nische** (für die hämatopoetischen Stammzellen) und der **vaskulären Nische**, an der die eigentliche Thrombopoese erfolgt [21].

In der hier beschriebenen Arbeit (siehe Kapitel 2.4) in Zusammenarbeit mit JUNT aus dem Labor von VON ANDRIAN konnte mit Hilfe von Zwei- bzw. Multi-Photonen-Intravitalmikroskopie unter Verwendung eines transgenen Mausmodells (CD41-EYFP<sup>ki</sup>-Mäusen [107, 108]) die Lage von MKs im Knochenmark bestimmt werden und im Rahmen von zeitaufgelöster Videomikroskopie die Thrombopoese im Knochenmark der lebenden Maus analysiert werden [46].

### 1.7. Congenitale Defekte der Megakaryo- und Thrombopoese

Die Zahl der Thrombozyten im peripheren Blut liegt zwischen 150000/ $\mu$ l und 400000/ $\mu$ l und ist streng reguliert. Abweichungen nach oben oder nach unten führen über die bezeichneten Regelkreise (siehe Kapitel 1.4.4) dazu, dass sich die Zahl der Thrombozyten wieder im Normbereich einpendelt. Grundsätzlich sind Thrombozytopenien die häufigere Abweichung von der Norm, wobei reaktive Thrombozytosen nach vielen Erkrankungen (insbesondere durch Ausschüttung von IL-6 in der Leber) transient auftreten können.

Der Befund der "Thrombozytopenie" ist häufig ein Laborbefund, der klinisch mit Blutungszeichen einhergehen kann, aber nicht muss. Die Zahl der Thrombozyten im peripheren Blut wird in der Regel von automatisierten Blutzählgeräten bestimmt. Grundsätzlich sollte man bei erniedrigten Plättchenzahlen auch an **Pseudothrombozytopenien** denken, bei denen z.B. durch die Blutentnahme Mikrothromben entstehen, die zu falsch-niedrigen Plättchenwerten führen. Auch kann durch EDTA eine Thrombozytopenie induziert werden [109].

Thrombozytopenien entstehen wenn das Fließgleichgewicht im Regelkreis zwischen Bildung und Abbau gestört ist. Daher lassen sich Thrombozytopenien nach verschiedenen Kriterien einteilen wie z.B. durch verminderte Bildung im Knochenmark oder einem verstärkten Umsatz oder Abbau wie bei der Immun-vermittelten Thrombozytopenie (ITP). Letztere stellen die Hauptursache von Thrombozytopenien im Kindesalter dar. Weitere Möglichkeiten der Einteilung sind z.B. die Gruppierung in angeborene und erworbene Thrombozytopenien, Thrombozytopenien nach der Plättchengröße (verkleinert als **Mikrothrombozytopenie**, normale Plättchengröße oder vergrößert als **Makrothrombozytopenie**) sowie die Einteilung nach den genetischen Ursachen soweit bekannt und in diesem Zusammenhang nach den Vererbungswegen (autosomal-rezessiv, autosomal-dominant, X-chromosomal etc.). Keine dieser Einteilungen ist a priori vorzuziehen, sondern reflektiert höchstens die Sichtweise. In den letzten Jahren wurden eine Reihe von Übersichtsartikeln zu Thrombozytopenien publiziert [109-111]. Im folgenden stehen die **congenitalen Thrombozytopenien** aufgrund einer angeborenen Bildungsstörung im Knochenmark im Fokus.

Es sei an dieser Stelle hervorgehoben, dass jegliche Einteilung immer unter dem Vorbehalt einer zum Teil noch unverständenen Ätiologie erfolgt. So findet sich das *Thrombocytopenia-absent-radii* (TAR)-Syndrom oft unter den autosomal-rezessiven Erbgängen. Die Einteilung nach Plättchengröße hängt neben den Messmethoden auch von vielfältigen Normwerten ab: so können

## 1. Einleitung

Unterformen des Wiskott-Aldrich-Syndroms mit milden Varianten auch im Bereich normal großer Plättchen im Zählautomat erscheinen und eine mittlere Plättchengröße (z.B. als *Mean Platelet Volume*, MPV gemessen) müsste durch weitere Parameter wie die Verteilungskurve (*Platelet Distribution Width*, PDW und/oder die Messung der Fraktion großer Plättchen (*Platelet Large Cell Ratio* P-LCR) ergänzt werden. Diese Werte liegen aber in der Regel nicht vor und können oft auch nicht einfach interpretiert werden. (siehe Tabelle 1).

**Tabelle 1:** Übersicht der wichtigsten angeborenen Thrombozytopenien: AR= autosomal-rezessiv, AD= autosomal-dominant, X= X-chromosomal

Syndrom/ Erkrankung	Gen	Locus	Modus	Plättchen- größe	Anmerkung
CAMT	THPOR/ c-mpl	1p34	AR	normal	Übergang in aplastische Anämie, TypI/TypII
TAR	?	del1q21	?	normal	weitere Faktoren nötig
Thrombozytopenie und radioulnäre Synostose	HoxA11	7p15-14.2	AD		
Familiäre Thrombozytopenie mit Prädisposition zur AML	AML1/ Runx1	21q22.2	AD	normal	erhöhter Übergang in MDS/AML
Chromosom 10-assoziert THC2	MASTL/ FLJ1481 3	10p12- 11.2	AD	normal	
Paris-Trousseau/Jacobsen	Fli-1	11q23	AD	vergrößert	Haploinsuffizienz, geistige Retardierung
Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS)	WASp	Xp11.23- 22	X	verkleinert	Immundefizienz, Ekzeme
X-linked thrombocytopenia (XLT)	WASp	Xp11.23- 22	X	verkleinert	schwächere Ausprägung als WAS
GATA1-Mutation	GATA1	Xp11.23	X	vergrößert	
Bernard-Soulier-Syndrom	GP1BA GP1BB GP9	17pter- p12 22q11.2 3q21	AR	vergrößert	milde Thrombozytopenie
May-Hegglin-Anomalie	MYH9	22q12.3		vergrößert	Neutrophilen-Einschlüsse
MYH9-vermittelte TP	MYH9	22q12.3	AD	vergrößert	Epstein-, Fechtner-Sebastian-Syndrome
Mediterrane Thrombozytopenie	GP1BB	22q11.2	AD	vergrößert	
Storage-pool-deficiency	??	??			
Grey platelet-Syndrom	??	??	?	vergrößert	

Im folgenden sind nun die Thrombozytopenien ausführlicher dargestellt, die einen Defekt in der Megakaryopoese bzw. Thrombopoese aufweisen: die congenitale amegakaryozytäre Thrombozytopenie (CAMT) und das Thrombocytopenia-Absent-Radii (TAR)-Syndrom. Bei beiden Erkrankungen finden sich keine oder nur wenige MKs im Knochenmark. Aus diesem Grunde werden beide Erkrankungen den Knochenmarksbildungsstörungen (engl. *Bone Marrow Failure Syndrome*, BMFS) zugeordnet. Bei CAMT und TAR-S ist in Knochenmarkbiopsien nur

## 1. Einleitung

die megakaryozytäre Reihe betroffen, während alle anderen Linien primär normozellulär sind. Damit fallen die Erkrankungen innerhalb der BMFS in die Gruppe der "unilineage"-Syndrome, zu denen auch die Blackfan-Diamond-Anämie (BDA), oder die schwere congenitale Neutropenie (SCN) gehören. Im weiteren Verlauf kann es aber bei der CAMT und auch der BDA zu Veränderungen in weiteren Zellreihen kommen. CAMT und TAR-S sind durch extrem niedrige Plättchenzahlen charakterisiert, die oft unter 50000/ $\mu$ l liegen. Patienten werden schnell nach der Geburt durch eine Fülle von Blutungen und Petechien auffällig und werden dann in der Klinik vorstellig. Zur Präzision sind den Erkrankungen im folgenden die Nummern aus der *Online Mendellian Inheritance in Man* (OMIM) zugeordnet ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

Während die Thrombozytopenie bei der **CAMT** (OMIM #604498) ohne weitere Veränderungen einhergeht, ist das **TAR-Syndrom** (OMIM #274000) durch die Veränderungen im Skelett schnell diagnostiziert: es fehlen beide Radiusknochen ohne Beeinträchtigung des Handstrahls. Dies ist wichtig zur Unterscheidung der Fanconi-Anämie, bei der häufig die Daumen fehlen. Zusammen mit der Thrombozytopenie wurde es 1969 von Judith HALL als Syndrom vereint [112]. Später haben Übersichtsartikel die Besonderheiten bei über 100 Fällen zusammengestellt [113, 114]. Differentialdiagnostisch relevant sind

(1) die **Fanconi-Anämie** (FA, OMIM #227650), bei der es auch als erstes Symptom zur Thrombozytopenie kommen kann. Allerdings ist hierbei der erste Strahl (Daumen) hypoplastisch sowie begleitende Veränderungen (Makrozytose der Erythrozyten, persistierendes HbF) zu diagnostizieren. Die Diagnose wird durch die erhöhte Chromosomenbrüchigkeit nach Diepoxybutan- bzw. Mitomycin C-Gabe gestellt, wobei Mosaik die Diagnose erschweren können. Ursache der FA sind Mutationen in Genen, die für einen multimeren Proteinkomplex codieren, der eine essentielle Rolle in der DNA-Reparatur aufweist. Siehe auch die Übersichtsartikel von [115, 116].

(2) Das **Holt-Oram-Syndrom** (HOS, OMIM #142900) ist durch Daumenanomalien und atriale Septumdefekte charakterisiert und wird durch Mutationen im Gen für **Tbx5**, ein Gen der Brachyury-Genfamilie bedingt [117, 118].

(3) Bei der **radio-ulnären Synostose** (RUS, OMIM #179300) gibt es ebenfalls Fehlbildungen des Unterarms, allerdings ist der Radiusknochen vorhanden und mit der Elle zusammengewachsen. Ursächlich sind Mutationen im Homöobox-Gen **HoxA11** beschrieben worden [119].

(4) Das **Roberts-Syndrom** (RBS, OMIM#268300) ist neben hypoplastischer Arme durch weitere faziale Veränderungen charakterisiert und wird durch Mutation im Gen **ESCO2** verursacht. ESCO2 codiert für ein Protein, das für die Trennung von Tochterchromatiden in der S-Phase verantwortlich ist.

Die CAMT und das TAR-Syndrom sind durch eine verminderte oder fehlende Megakaryopoese charakterisiert [120, 121]. In den hier dargestellten Originalarbeiten (Kapitel 2.5-2-7) haben wir versucht, die Thrombozytopenie in dieser Erkrankung weiter zu charakterisieren. In Abgrenzung zur CAMT konnten wir den TPO-Rezeptor auf der Zelloberfläche nachweisen, allerdings ist er nicht voll funktionsfähig: Stimulation von Thrombozyten mit TPO führte zu einer stark verminderten Signaltransduktion, die wir in einer Folgearbeit auf die Januskinase Jak2 eingrenzen konnten. Diese Kinase bindet an den Rezeptor und wird bei Gesundspendern unmittelbar nach Aktivierung phosphoryliert. Die Patienten wiesen normale Mengen der Kinase auf, die aber nicht

## 1. Einleitung

phosphoryliert wird [122]. Rémi LETESTU hat den Defekt weiter auf Ebene der MKs charakterisiert und gezeigt, dass es zwar zu einer Ausbildung von CD41-positiven Zellen aus den hämatopoetischen Stammzellen kommt, allerdings nur wenige Zellen CD42-positiv werden. Dieser Differenzierungsblock erklärt die niedrigen Thrombozytenzahlen beim TAR-Syndrom, wobei eben die wenigen gebildeten Thrombozyten aus diesen "normal"-reifen MKs entstehen [123]. Als naheliegende genetische Ursachen wurden Mutationen in den Genen für c-Mpl ausgeschlossen [124] sowie die codierenden Bereiche der Homöobox-Gene HoxA10, HoxA11 und HoxD11, die in Mausmodellen für Hämatopoese und Gliedmaßenentwicklung verantwortlich sind [125]. Wir konnten weiterhin zeigen, dass erhöhte Thrombopoietin-Konzentrationen in Serum bzw. Plasma vorliegen und dass das TPO biologisch aktiv ist [51, 126]. Interessanterweise sind die TPO-Spiegel beim TAR-Syndrom nur mäßig erhöht, aber alle Patienten wiesen zusätzlich erhöhte IL-11-Werte auf. Inwieweit dies mit dem beobachteten Anstieg der Plättchenzahlen nach dem 1. bis 2. Lebensjahr korreliert, ist unklar. CAMT-Patienten weisen extrem hohe TPO-Spiegel auf und wir konnten zudem zeigen, dass das gebildete TPO biologisch aktiv ist [51]. In den folgenden Originalarbeiten wurde die Signaltransduktion von TPO in Blutplättchen bei beiden Erkrankungen untersucht, sowie die Defekte auf genetischer Ebene charakterisiert. Für die CAMT gelten inzwischen Mutationen im c-mpl-Gen als ursächlich, während beim TAR-S der Nachweis der Mikrodeletion auf Chromosom 1q21 als Marker auch für die genetische Beratung verwendet werden kann.

### 1.8. Zielsetzung und Ausblick

Thrombozyten sind kernlose, zelluläre Bestandteile des peripheren Bluts, die von Vorläuferzellen im Knochenmark abgeschnürt werden. In den letzten Jahren wurde ein Großteil des gegenwärtigen Forschungsstands von MICHELSON als Editor in einem Lehrbuch zusammengefasst: "Platelets" umfasst in der aktuellen Auflage 71 Kapitel auf 1376 Seiten [15]. Es ist daher ausdrücklich notwendig, noch einmal hervorzuheben, dass sich diese Arbeit im Rahmen dieses Feldes ausschließlich mit verschiedenen Aspekten der Thrombopoese, das heißt der Bildung von Thrombozyten aus MKs, beschäftigt. Die Aktivierung von Thrombozyten und die Thrombusbildung wird nur da erwähnt, wo sie in einem direkten Zusammenhang mit der Thrombopoese steht. Zu drei Themenblöcken sind im folgenden Originalarbeiten zusammengestellt:

- (A) beschreibt die Aufgabe von Mikrotubuli und des Zytoskeletts für die Thrombopoese,
- (B) widmet sich der Rolle des inneren Membransystems für die Transformation eines großen MKs in ca. 1000 diskoidale Plättchen und
- (C) untersucht molekulare Defekte der Thrombopoese bei zwei congenitalen Thrombozytopenien: CAMT und TAR-Syndrom.

In Kapitel 3 werden diese Arbeiten noch weitergehend diskutiert, wobei das abschließende Kapitel 3.4 die Probleme und die Zukunft der Forschung auf dem Gebiet der Thrombopoese und Thrombozytopenien als Ausblick beleuchten soll.

Abschließend stellen zwei Übersichtsartikel des Autors weitere Aspekte der Megakaryopoese und Thrombozytopenie dar.

## 2. Originalarbeiten und Übersichtsartikel

### **2. Originalarbeiten und Übersichtsartikel**

#### 2.1 Differential roles of microtubule assembly and sliding in proplatelet formation by megakaryocytes.

Patel SR, Richardson J, **Schulze H**, Kahle E, Galjart N, Drabek K, Shivdasani RA, Hartwig JH, Italiano JE Jr. (Blood, 2005; 106: 4076-4085).

Megakaryozyten sind terminal differenzierte Zellen und die unmittelbaren Vorläufer der Thrombozyten. In den letzten Stunden der Ausreifung bilden sich lange, verzweigte Ausschnürungen des Zytoplasmas, die als Proplättchen bezeichnet werden. Proplättchen verlängern sich mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von 0,85  $\mu\text{m}/\text{min}$  in einem Mikrotubuli-abhängigen Prozess. Wenn man Rhodamin-Tubulin zu permeabilisierten Proplättchen gibt, kann man mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie des *End-Binding Protein 3* (EB3) und mittels Zeitraffer-Videomikroskopie eines grün-fluoreszierenden (EGFP) Protein-markierten EB3 nachweisen, dass Mikrotubuli, die als bipolare Filamente organisiert sind, über die gesamte Ausdehnung des Proplättchen kontinuierlich neue Monomere polymerisieren. In unreifen Megakaryozyten, die noch keine Proplättchen haben, werden die Plus-Enden von Mikrotubuli initiiert und wachsen mit einer Rate von 8,9 bis 12,3  $\mu\text{m}/\text{min}$  durch Nukleation an den Zentrosomen. Im Gegensatz dazu sind die Wachstumsraten von Mikrotubuli in Proplättchen hoch variabel (1,5 – 23,5  $\mu\text{m}/\text{min}$ ) und damit sowohl langsamer als auch schneller als jene in unreifen Zellen. Trotz des kontinuierlichen Aufbaus von Mikrotubuli, verlängern sich Proplättchen auch dann, wenn der Netto-Aufbau gestoppt wird. Ein alternativer Mechanismus, um diese Bildung zu erklären, ist das Aneinandergleiten (sliding) einzelner Mikrotubuli-Filamente. In Triton X-100-permeabilisierten Proplättchen kann man die Elongation von Proplättchen nur dann beobachten, wenn man Dynein und Dynactin hinzufügt, nicht aber mit Kinesin. In der Gegenwart von Adenosintriphosphat (ATP) beobachtet man Raten von 0,65  $\mu\text{m}/\text{min}$ . Durch retrovirale Expression von Dynamitin (p50), das die Dynactin/Dynein Funktion inhibiert, kann man die Elongation von Proplättchen unterbrechen. Wir schließen daraus, dass eine kontinuierliche Polymerisation von Mikrotubuli für die Elongation von Proplättchen notwendig ist. Das Aneinandergleiten von überlappenden Mikrotubuli ist ein wesentlicher Aspekt dieser Verlängerung.

## 2. Originalarbeiten und Übersichtsartikel

### 2.2 Interactions between the megakaryocyte/platelet-specific $\beta$ 1-tubulin and the secretory leukocyte protease inhibitor SLPI suggest a role for regulated proteolysis in platelet function.

**Schulze H**, Korpál M, Bergmeier W, Italiano JE Jr, Wahl SM, Shivdasani, RA. (Blood, 2004; 104: 3949-3957).

$\beta$ 1-Tubulin ist eine Plättchen-spezifische Isoform, die für eine optimale Thrombopoese und die diskoide Formgebung von Blutplättchen unerlässlich ist. Wir haben einen Hefe Zwei-Hybrid-Screen mit dem divergenten C-Terminus von  $\beta$ 1-Tubulin als Köder verwendet, um in einer cDNA-Bibliothek aus primären Megakaryozyten Proteine zu identifizieren, die an  $\beta$ 1-Tubulin binden. Wir haben Secretory Leukocyte Protease Inhibitor (SLPI) identifiziert, ein Inhibitor für Serinproteasen, der eine Rolle als sezernierter Faktor mit verschiedenen Funktionen in der Entzündung spielt. SLPI befindet sich in Megakaryozyten und Plättchen in zwei unterschiedlichen Kompartimenten: Zum einen akkumuliert SLPI im Zytoplasma in granulären Strukturen, während es zum anderen auch entlang peripherer Mikrotubuli co-lokalisiert. Letztere Fraktion geht verloren, wenn die Mikrotubuli durch Kälte depolymerisieren oder in Blutplättchen von  $\beta$ 1-Tubulin (-/-)-Mäusen. Diese Beobachtungen zeigen eine unerwartete Interaktion zwischen einem zytoskeletären Protein und einem Proteaseinhibitor. SLPI (-/-)-Mäuse zeigen normale Bildung von Proplättchen, normale Thrombozytenzahlen und -form und das periphere Bündel von Mikrotubuli. SLPI ist daher nicht notwendig für eine normale Thrombopoese. Auf der anderen Seite wird SLPI nach Stimulation von Plättchen freigesetzt und von seiner Bindung mit Mikrotubuli der peripheren Mikrotubuli-Bündel in ruhenden Plättchen gelöst. SLPI inhibiert Neutrophile Elastase und diese Aktivität ist reduziert in  $\beta$ 1-Tubulin (-/-)-Mäusen. Wir folgern daraus, dass SLPI zum Teil entlang von Mikrotubuli-Filamenten von Megakaryozyten und Plättchen co-lokalisiert und dass diese Bindung durch die  $\beta$ 1-Tubulin Isoform vermittelt wird. SLPI mag daher unerwartete Funktionen in Megakaryozyten und Plättchen aufweisen, mit eingeschlossen eine regulierte proteolytische Aktivität nach der Aktivierung von Blutplättchen.

## 2. Originalarbeiten und Übersichtsartikel

### 2.3 Characterization of the megakaryocyte demarcation membrane system and its role in thrombopoiesis.

**Schulze H**, Korpál M, Hurov J, Kim SW, Zhang, J, Cantley LC, Graf T, Shivdasani RA. (Blood, 2006; 107: 3868-3875).

Die Abschnürung von Blutplättchen aus Megakaryozyten erfolgt durch die Ausbildung von Proplättchen, wobei sich dabei die Membranoberfläche deutlich vergrößert und es zu dramatischen Veränderungen im Zytoskelett kommt. Das Demarkationsmembransystem (DMS) entsteht durch Invagination der Zellmembran und ist Kennzeichen reifer Megakaryozyten. Es wurde als Quelle der Proplättchenmembranen postuliert. Wir haben durch direkte Beobachtung von Fluorophor-markierten Membranen zeigen können, dass dies tatsächlich der Fall ist. In reifen Megakaryozyten wird das DMS positiv für Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat PI-4,5-P(2), ein Phospholipid, das sich in anderen Zellen ausschließlich in der Plasmamembran findet. Die Synthese von PI-4,5-P(2) im DMS erfolgt in Nähe zur Phosphatidylinositol-5-Phosphat-4-Kinase  $\alpha$  (PIP4K $\alpha$ ). Die Expression von "small hairpin" (sh)-RNAs, die zu einer Depletion von PIP4K $\alpha$ -Protein in primären Megakaryozyten führt, resultiert auch in einer Reduktion des DMS und in kleineren Megakaryozyten. PI-4,5-P(2) ist daher ein Markerlipid und wahrscheinlich ein essentieller Bestandteil der inneren Membranen. PI-4,5-P(2) fördert die Polymerisation von Actin-Filamenten durch Aktivierung von kleinen GTPasen der Rac/Rho/Cdc42-Subfamilie sowie den Wiskott-Aldrich Syndrom (WAS)-Proteinen. Wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass PI-4,5-P(2) im DMS von Megakaryozyten mit filamentösem Actin (F-Actin) assoziiert ist. Die Expression eines dominant-negativen N-WASp-Fragmentes führte ebenso zur Inhibition von Proplättchen-Bildung wie die Zugabe pharmakologischer Konzentrationen eines Inhibitors der Actin-Polymerisation. Dadurch zeigt sich, dass der WASp/Actin-Aktivierung nach der Ausdehnung des DMS und der Zellausreifung erfolgt. Diese Beobachtungen schlagen zusammen einen Signalweg vor, wobei PI-4,5-P(2) die Bildung des DMS ermöglicht und die lokale Bildung von Actin-Filamenten für die Bildung von Thrombozyten vorbereitet.

## 2. Originalarbeiten und Übersichtsartikel

### 2.4 Direct visualization of thrombopoiesis in the bone marrow of living mice.

Junt T, **Schulze H**, Chen Z, Massberg S, Goerge T, Krueger A, Wagner D, Graf T, Italiano JE, Shivdasani RA, von Andrian UH. (Science, 2007; 317: 1767-1770).

Blutplättchen werden bei Säugetieren von Megakaryozyten im Knochenmark gebildet, wobei der Mechanismus noch sehr wenig verstanden ist. Hier beschreiben wir die Verwendung von Multi-Photonen-Intravital-Mikroskopie im Knochenmark von lebenden Mäusen, um die Plättchenbildung *in vivo* zu visualisieren. Wir verwendeten transgene "knock-in"-Tiere, die eine modifizierte cDNA für das fluoreszente Protein eYFP unter dem Megakaryozyten-spezifischen GPIIb (CD41)-Promoter exprimieren. Die cDNA wurde dabei so verändert, dass das Protein am C-Terminus über einen Lipidanker in die internen Membranen von reifen Megakaryozyten eingebaut wird und diese so durch Fluoreszenz detektiert werden können. Im Gegensatz zu B-Zellen im Knochenmark bewegen sich Megakaryozyten wenig innerhalb des Knochenmarks, insbesondere an den Gefäßen, wo sie ihre dynamischen Proplättchen-ähnlichen Ausläufer in die Knochenmarksinsinoide ausstrecken. Diese Pseudopodien-ähnlichen Ausläufer werden innerhalb der Blutgefäße durch den Scherstress von ihrem transendothelialen Stamm abgetrennt, wobei Proplättchen im peripheren Blut nachgewiesen werden können. *In vitro* konnte die Menge an Proplättchen aus differenzierten Megakaryozyten durch Anwendung von Scherstress verstärkt werden. Diese Ergebnisse bestätigen das Modell der Proplättchenbildung im Rahmen der Plättchen-Biogenese *in vivo* und stimmen mit der Möglichkeit überein, dass der hydrodynamische Scherstress des Blutstroms in den Blutgefäßen ein biophysikalischer Regulator der Thrombopoese ist.

## 2. Originalarbeiten und Übersichtsartikel

### 2.5 c-mpl mutations are the cause of congenital amegakaryocytic thrombocytopenia.

Ballmaier M, Germeshausen M, **Schulze H**, Cherkaoui K, Lang S, Gaudig A, Krukemeier S, Eilers M, Strauss G, Welte K. (Blood, 2001; 97: 139-146).

Congenitale amegakaryozytäre Thrombozytopenie (CAMT) ist eine seltene Erkrankung mit isolierter Thrombozytopenie in den ersten Lebensjahren, die in späteren Lebensjahren in eine Panzytopenie übergehen kann. Thrombopoietin (TPO) ist ein hämatopoetischer Wachstumsfaktor, der die Megakaryopoese und Thrombozytopenie reguliert und auch eine wichtige Rolle in der frühen Hämatopoese spielt. Wir haben 9 Patienten mit CAMT auf Defekte in der TPO-Produktion und –Reaktivität untersucht. Dabei haben wir bei allen Patienten erhöhte TPO-Serumspiegel gefunden. Allerdings zeigten weder Plättchen noch hämatopoetische Vorläuferzellen von Patienten mit CAMT eine Reaktivität. Diese wurde als Synergismus von TPO mit Adenosindiphosphat (ADP) in der Plättchenaktivierung bestimmt oder als Wachstum von megakaryozytären Kolonien in sogenannten Stammzell-Assays. Bei der durchflusszytometrischen Analyse konnten wir bei 3 von 3 Patienten c-Mpl, den Rezeptor für TPO, nicht nachweisen. Bei der Sequenzierung des c-mpl-Gens haben wir bei 8 von 8 Patienten Mutationen identifizieren können. Bei 5 Patienten führen Mutationen zu Verschiebungen des Leserasters oder zu verfrühten Stop-Codons, so dass wir bei diesen einen kompletten Verlust von c-Mpl erwarten. Bei drei weiteren Patienten sollten die hetero- oder homozygoten Mutationen zum Aminosäureaustausch in der extrazellulären Domäne des Rezeptors führen. Dabei korrelierte der Typ der Mutationen mit dem klinischen Verlauf und Schweregrad der CAMT-Patienten. Wir folgern daraus, dass Mutationen im c-mpl-Gen zu einer fehlerhaften Expression von des TPO-Rezeptors c-Mpl führen und bei Patienten mit CAMT ursächlich für die Thrombozytopenie sowie den Übergang in die Panzytopenie sind.

## 2. Originalarbeiten und Übersichtsartikel

### 2.6 Thrombopoietin in patients with congenital thrombocytopenia and absent radii: elevated serum levels, normal receptor expression, but defective reactivity to thrombopoietin.

Ballmaier M\*, **Schulze H\***, Strauß G, Cherkaoui K, Wittner N, Lynen S, Wolters S, Bogenberger J, Welte K. (Blood, 1997; 90: 612-619). (\*Co-Erstautoren)

Die Pathophysiologie der Thrombozytopenie bei dem "Thrombocytopenia-absent-radii (TAR)-Syndrom" ist bislang unverstanden. Wir haben bei 5 Patienten mit TAR-Syndrom die Serumspiegel von Thrombopoietin (TPO) sowie die *in vitro*-Reaktivität von Blutplättchen auf TPO untersucht. Wir konnten bei allen Patienten erhöhte TPO-Serumspiegel nachweisen und damit einen TPO-Bildungsdefekt als Ursache für die Thrombozytopenie im TAR-Syndrom ausschließen. Weiterhin konnten wir eine vergleichbare Expression des TPO-Rezeptors c-Mpl auf der Oberfläche von Thrombozyten (5 von 5 Patienten) und ein ähnliches Molekulargewicht (4 von 4 Patienten) im Vergleich zu Gesundspendern nachweisen. Die Stimulation von Thrombozyten mit Agonisten wie Adenosindiphosphat (ADP) oder dem Thrombin-Rezeptor Agonist-Peptid (TRAP) war bei Patienten mit TAR-Syndrom normal. Jedoch konnten wir im Vergleich zu Gesundspendern bei den Patienten keine *in vitro*-Reaktivität der Blutplättchen auf TPO zeigen. Dazu haben wir einen Synergismus von TPO mit ADP oder TRAP in der Plättchenaktivierung untersucht. Bei 3 von 4 untersuchten Patienten war die TPO-induzierte Induktion von Tyrosinphosphorylierungen von Plättchenproteinen komplett gestört und bei 1 von 4 Patienten deutlich vermindert. Unsere Ergebnisse weisen daraufhin, dass die fehlerhafte Megakaryopoese und Thrombopoese beim TAR-Syndrom nicht in einem Defekt der TPO-Produktion begründet liegt, sondern in einem Defekt der TPO-abhängigen Signaltransduktion durch den Rezeptor c-Mpl-

## 2. Originalarbeiten und Übersichtsartikel

### 2.7 Complex inheritance pattern resembling autosomal recessive inheritance involving a microdeletion in thrombocytopenia-absent radius syndrome.

Klopocki E\*, Schulze H\*, Strauß G, Ott CE, Hall J, Trotier F, Fleischhauer S, Greenhalgh L, Newbury-Ecob RA, Neumann LM, Habenicht R, König R, Seemanova E, Megarbane A, Ropers H, Ullmann R, Horn D, Mundlos S. (American Journal of Human Genetics, 2007; 80: 232-240). (\*Co-Erstautoren)

Das "Thrombocytopenia-absent radii" (TAR)-Syndrom ist durch hypomegakaryozytäre Thrombozytopenie und bilaterale Radiusaplasie charakterisiert, wobei beide Daumen vorhanden sind. Weiterhin treten häufig auch angeborene Herzfehler und Kuhmilch-Intoleranz auf. Da in einigen Familien mit klinisch unauffälligen Eltern mehrere Kinder betroffen sind, wurde ein autosomal-rezessiver Erbgang für das TAR-Syndrom beschrieben; allerdings sprechen einige Argumente für einen komplexeren Erbgang. In dieser Studie haben wir eine gemeinsame interstitielle Mikrodeletion auf Chromosom 1q21.1 bei 30 von 30 untersuchten Patienten mit TAR-Syndrom durch Verwendung von "Microarray"-basierter vergleichender Genomhybridisierung (CGH) nachweisen können. Die Untersuchung der Eltern zeigte weiterhin, dass die Deletion bei 25% der betroffenen Patienten *de novo* erfolgte. Interessanterweise konnten wir eine Vererbung der Mikrodeletion sowohl durch die mütterliche als auch durch die väterliche Linie nachweisen. Im Gegenzug konnten wir die Deletion nicht bei einer großen Kohorte von Gesundspendern nachweisen. Dies spricht dafür, dass die Mikrodeletion eine wesentliche Rolle in der Pathogenese des TAR-Syndroms spielt. Wir vermuten, dass die Mikrodeletion eine notwendige, aber keine hinreichende Ursache zur Ausprägung des TAR-Syndroms ist und dass sich der Phänotyp nur dann ausprägt, wenn es gleichzeitig ein bislang nicht identifizierter Modifikator "modifier of TAR" (mTAR) vorliegt.

## 2. Originalarbeiten und Übersichtsartikel

### 2.8 Molecular Mechanisms of Megakaryocyte Differentiation.

**Schulze H**, Shivdasani RA. (Seminars in Thrombosis and Hemostasis, 2004; 4: 389-397).

Jeder Megakaryozyt im Knochenmark schnürt ca. 1000 Blutplättchen in den Blutstrom ab. Die zugrundeliegenden molekularen und zellulären Mechanismen sind vielfältig untersucht worden. Anhand genetischer Studien an Mausmodellen konnte man zunehmend die Mechanismen aufzeigen, durch welche Transkriptionsfaktoren bewirken, megakaryozytäre Vorläuferzellen von Zellen anderer Blutreihen abzugrenzen und schließlich zu der charakteristischen zellulären Ausstattung von Megakaryozyten beitragen. In anderen Untersuchungen konnte gezeigt werden wie sich neu zu bildende Blutplättchen bilden: in einer terminalen Phase der Ausreifung von Megakaryozyten formen sich lange zelluläre Ausläufer, die als Proplättchen bezeichnet werden. Dieser Übersichtsartikel beschreibt einige ausgewählte Transkriptionsfaktoren, die eine wichtige Rolle in der Differenzierung von Megakaryozyten spielen. Darüberhinaus zeigen wir angeborene Erkrankungen mit Thrombozytopenie, die durch eine unzureichende Megakaryo- bzw. Thrombozytopoese bedingt sind und diskutieren entsprechende Mausmodelle. Die hier vorgestellten Forschungsergebnisse sollen dazu beitragen, die Rahmenbedingungen zusammenzustellen, unter denen Megakaryozytopoese und Thrombozytopoese erfolgen, insbesondere im Kontext den Übergang auf die megakaryozytäre Linie und die damit verbundenen morphologischen Veränderungen. Obwohl viele dieser Mechanismen sich ausschließlich bei Megakaryozyten finden, sind die zugrundeliegenden Gene nur zum Teil linienspezifisch exprimiert, während andere weitreichender exprimiert werden.

## 2. Originalarbeiten und Übersichtsartikel

### 2.9 Mechanisms of thrombopoiesis.

**Schulze H**, Shivdasani RA. (Journal of Thrombosis and Hemostasis, 2005; 3: 1717-1724).

Megakaryozyten expandieren und differenzieren während mehrerer Tage in Gegenwart des hämatopoetischen Wachstumsfaktors Thrombopoietin (TPO), ehe sie schließlich Tausende von Thrombozyten freisetzen. Die letzten Schritte dieses Vorgangs beinhalten die Zusammensetzung und letztendlich Abschnürung von neuen Blutplättchen und gehen mit einer einzigartigen zellulären Veränderung einher. Diese wird durch das Zusammenspiel von einer Reihe von Transkriptionsfaktoren, Signalmolekülen und Elementen des Zytoskeletts orchestriert. In diesem Übersichtsartikel fassen wir die neuesten Forschungsergebnisse zusammen, die die Physiologie sowie die molekularen Grundlagen der Differenzierung von Megakaryozyten betreffen. Genomweite Ansätze, einschließlich Genexpressionsanalysen während der Megakaryopoese und Analysen des Thrombozyten-Proteoms, haben dazu beigetragen, neue Plättchen-spezifische Faktoren und Differenzierungsmarker zu identifizieren. Die extrazellulären Faktoren wie das Chemokin "Stromal-Derived Factor" (SDF)-1 und der "Fibroblast Growth Factor" (FGF)-4 dirigieren Interaktionen von Megakaryozyten mit dem Knochenmarkstroma und regulieren so unabhängig von Zytokinen die Ausreifung von Megakaryozyten und den terminalen Übergang zu Thrombozyten. Ein Überschuss von Megakaryozyten im Knochenmark führt zu vielfältigen pathologischen Veränderungen wie exzessive Knochenbildung oder Myelofibrose. Die neuen Erkenntnisse tragen zum Verständnis der molekularen Grundlagen dieser Erkrankungen bei. Weiterhin fassen wir in dieser Arbeit den Status von Transkriptionsfaktoren zusammen, die die Megakaryozytopoese kontrollieren. Dabei liegt unser Schwerpunkt auf den "Nuclear Factor Erythroid 2" (NF-E2) und seine beiden mutmaßlichen Zielgene  $\beta$ 1-Tubulin und  $3\beta$ -Hydroxysteroid-Reduktase. Megakaryozyten exprimieren Steroidrezeptoren und einige Liganden der Estrogen-Familie, die so zu einer autokrinen Rückkopplung bei der Bildung von Proplättchen, den unmittelbaren zellulären Vorläufern der Blutplättchen, beitragen könnten. Schlussendlich fassen wir unsere eigenen Studien der zellulären und molekularen Aspekte von Bildung von Proplättchen zusammen und ordnen unsere Ergebnisse in den Kontext der noch unbeantworteten Fragen über die Mechanismen von Thrombozytopoese.

### 3. Diskussion

### **3. Diskussion**

Diese Schrift umfasst verschiedene Originalarbeiten des Autors, die die Ausreifung von Megakaryozyten zu Thrombozyten sowie die Defekte dieser als Thrombopoese bezeichneten Differenzierung in einigen angeborenen Erkrankungen behandeln. Im folgenden sollen die hier vorangestellten Originalarbeiten diskutiert werden. Dabei ergeben sich drei Blöcke:

Zunächst werden die zellbiologischen Arbeiten betrachtet mit besonderem Fokus auf das Zytoskelett und dort auf das **Mikrotubuli**-System. Zweitens werden die Arbeiten zum **Membransystem** des Megakaryozyten und Thrombozyten und die Modelle der Thrombopoese *in vitro* und *in vivo* diskutiert. Drittens sollen Erkrankungen der Thrombopoese aufgrund von defekter Megakaryopoese dargestellt werden mit besonderem Fokus auf die congenitale amegakaryozytäre Thrombozytopenie und das **Thrombocytopena-absent-radii-(TAR)-Syndrom**. Abschließend soll ein Ausblick auf die Zukunft der Thrombopoese-Forschung gegeben werden.

#### 3.1 Das Zytoskelett des Megakaryozyten

Mittels zeitaufgelöster Mikroskopie konnten wir das Wachstum von Proplättchenausläufern genau bestimmen. Die **Elongation** von Proplättchen in der Zellkultur lag bei ca. 14  $\mu\text{m}/\text{min}$  und war damit größer als die Wachstumsrate centrosomaler Mikrotubuli (10  $\mu\text{m}/\text{min}$ ) bzw. der Polymerisationsrate von Tubulin-Mono- bzw. Dimeren an bereits bestehenden Filamenten (5  $\mu\text{m}/\text{min}$ ). Wir postulieren daher, dass es zusätzlich zu einem Aneinandergleiten (**sliding**) verschiedener paralleler Mikrotubuli-Filamente kommt, und dass man die Elongationsgeschwindigkeit als eine Überlagerung der beiden zellbiologischen Phänomene auffassen kann. Das Aneinandergleiten wird von **Dynein** vermittelt, einem Mikrotubuli-assoziiertem Motorprotein, das zum Minusende wandert. **Kinesine** hingegen haben eine essentielle Rolle im Transport von Granula und bringen diese entlang des Proplättchens zu dessen Spitze, wo das neue Blutplättchen "zusammengesetzt" wird. Im Gegenzug haben die Dyneine eine Rolle im Aneinandergleiten und ermöglichen so einen schnellen Mechanismus für die Elongation der Proplättchen. Die von uns gemessenen Geschwindigkeiten bestätigen diese Annahme (Kapitel 2.1).

Das wichtigste Strukturprotein an diesen Mikrotubuli-Filamenten ist  **$\beta$ 1-Tubulin**. Wir haben den C-Terminus als Köder verwendet, um nach Proteinen zu fischen, die spezifisch an  $\beta$ 1-Tubulin binden. Dazu haben wir einen Hefe-Zwei-Hybrid-Assay verwendet und zunächst eine cDNA-Bibliothek von murinen MKs kloniert. Von ca. 100 Klonen, die drei verschiedene Reportergene aktivieren konnten, codierte etwa ein Drittel für den Elongationsfaktor eEF1 $\alpha$ . Dieses Protein ist ein bona fide beschriebenes Mikrotubuli-bindendes Protein, und daher untersuchten wir die weiteren Kandidatengene. Zunächst haben wir dabei Secretory Leukocyte Inhibitory Protein **SLPI** analysiert, da SLPI-defiziente-Mäuse mit reduzierten Plättchenzahlen beschrieben worden sind. In der hier vorgestellten Arbeit konnte gezeigt werden, dass SLPI in MKs und Plättchen exprimiert ist und dass es in der Tat an  $\beta$ 1-Tubulin bindet. Es ist in zwei Kompartimenten im Plättchen lokalisiert und wird zum Teil nach Plättchenaktivierung sezerniert. Beides ist in Plättchen von  $\beta$ 1-Tubulin-knockout-Tieren stark reduziert. SLPI spielt eine wesentliche Rolle in

### 3. Diskussion

der Wundheilung [127] und zukünftige Experimente könnten zeigen, inwieweit die von aktivierten Blutplättchen sezernierten Faktoren oder gar die Blutplättchen direkt die Wundheilung beeinflussen. Leider konnten keine Tiere gezüchtet werden, welche sowohl kombinierten  $\beta$ 1-Tubulin- als auch SLPI-defizient sind, da beide Gene dicht benachbart auf demselben Chromosom lokalisiert sind.

Als weiteren  $\beta$ 1-Tubulin-Bindungspartner wurde **RanBP10** isoliert. Der Name beschreibt die Homologie zu RanBP9/RanBPM, ein Ran-bindendes Protein, das eine Rolle in der Nukleation von Mikrotubuli spielt [128, 129]. RanBP10 zeigt - im Gegensatz zu dem ubiquitär exprimierten RanBP9 - eine selektive Expression, in Leber, Milz und Knochenmark, also in Geweben, die eine essentielle Rolle in der Hämatopoese spielen. Es weist Homologie zur LisH-Domäne auf, die Bindung von Mikrotubuli vermittelt [130]. In weiteren Studien konnten wir zeigen, dass RanBP10 eine unerwartete enzymatische Aktivität aufweist: es fungiert als Guaninnukleotid-Austausch-Faktor für Ran. Da es im Zytoplasma lokalisiert ist und an polymerisierte Mikrotubuli bindet, kann es dort Ran-GDP in Ran-GTP überführen. Ran-GTP fungiert als Positionsmarker für nicht-centrosomale Mikrotubuli (wie bei der Spindelbildung in der Mitose) und kann so in der Zellperipherie neue Mikrotubuli nukleieren oder zumindest bündeln. Dies ist insofern ein elegantes Modell, da reife Mikrotubuli keinen  $\gamma$ -Tubulin-Ring-Komplex ( $\gamma$ -TuRC) aufweisen und es somit keine klassischen Mikrotubuli-organisierenden Center (MTOCs) in der Peripherie gibt, die die ausgedehnten Nukleationen in der Proplättchenbildung erklären können. Derzeit generieren wir RanBP10-defiziente Mäuse und hoffen, die weiteren Mechanismen durch Studien mittels eines genetischen Ansatzes lösen zu können.

Neben der Rolle von Mikrotubuli haben wir auch das Actin-Zytoskelett von reifen und Proplättchen-bildenden MKs untersucht. Dabei haben wir gezeigt, dass Zellgifte, wie Cytochalasin B oder D, die die Bindung von Actin-Monomeren an polymerisierte Filamente blockieren, die Verzweigung von Proplättchen inhibieren (Kapitel 2.3).

#### 3.2 Modelle der Thrombopoese *in vitro* und *in vivo*

Das detaillierte Verständnis der Thrombopoese *in vivo* ist eine wichtige Voraussetzung für eine mögliche *in vitro*-Generierung von Thrombozyten. Diese müssen alle Kriterien von *ex vivo*-isolierten Blutplättchen aufweisen: dieselbe Morphologie und Ultrastruktur wie ruhende Plättchen besitzen und durch Agonisten (z.B. ADP, Thrombin, Kollagen) aktivierbar sein (einschließlich morphologischer Veränderungen, Sekretion, Expression von Aktivierungsmarkern wie CD62P oder CD63). Ein Meilenstein bei diesen Untersuchungen war die Entwicklung eines *in vitro*-Assays mit hämatopoetischen Vorläuferzellen (aus Knochenmark oder fetaler Leber), die, werden sie in Gegenwart von TPO kultiviert, Thrombozyten generieren und somit das **Proplättchen-Modell** bestätigen. Dieser Assay erlaubte zum einen den Nachweis, dass die Partikel, die abgeschnürt werden auch tatsächlich Thrombozyten sind [131], zum anderen ermöglichte er auch die Untersuchung der zugrundeliegenden zellbiologischen Grundlagen der Thrombopoese [89].

Die Herausforderung bestand nun darin, den Nachweis zu erbringen, dass die verwendeten Modelle keine Artefakte der Zellkultur sind, sondern *in vivo* von Bedeutung sind. Die Untersuchung der Thrombopoese am lebenden Organismus konnte durch die Verbindung zweier

### 3. Diskussion

Techniken erreicht werden: 1. ein Mausmodell einer transgenen Maus mit fluoreszenten MKs und 2. die Technik der Intravitalmikroskopie im Rahmen der Zwei- oder Multi-Photonenmikroskopie. Im Labor von Thomas GRAF wurde eine Maus generiert, die das gelb-fluoreszierende Protein (eYFP) als cDNA zur Expression unter den Promoter von GPIIb (CD41) stellt [108]. Der C-Terminus wurde so verändert, dass eine Myristoylierungsstelle die posttranslationale Modifikation des Proteins bewirkt und es so - durch den Lipidanker - an die Zellmembran bindet. Da CD41 in der Expression auf frühe hämatopoetische Vorläuferzellen und dann die megakaryozytäre Reihe beschränkt ist, kommt es nur in reifen MKs zu einer signifikanten Expression von eYFP. Es wurden primär heterozygote Tiere untersucht, denn mit einem Wildtyp-Allel weisen die Tiere noch normale Plättchenzahl und -funktion auf. Mäuse, die für das Transgen homozygot sind, haben keinen funktionalen Fibrinogen-Rezeptor und entsprechen somit einem Tiermodell für das Krankheitsbild M. Glanzmann. Wie oben gezeigt (siehe Kapitel 2.3), lagert sich eYFP im wesentlichen in Membranen des Demarkationsmembransystems (DMS) ein und erlaubte so die Charakterisierung dieses Membransystems. Es konnte mit dieser Arbeit auch gezeigt werden, dass die aus den elektronenmikroskopischen Aufnahmen entwickelte Theorie der Plättchenfelder [80] unzutreffend ist und dass das DMS in der Tat ein unzutreffender Name ist wie von RADLEY 1982 hypothetisiert [87]. Das DMS entsteht während der Reifung durch Invagination der Zellmembran und wir haben durch unsere Techniken an dem Mausmodell zeigen können, dass während der Thrombopoese der Umkehrvorgang stattfindet. Die Membran für die neu gebildeten Proplättchen kommt aus dem Inneren des MKs ähnlich wie wenn man die Finger eines Handschuhs von innen nach außen kehrt.

Die Tatsache, dass das Transgen im verwendeten Mausmodell für ein gelb-fluoreszierendes Protein codiert, hatte weitere Vorteile: die Anregungswellenlänge für eYFP liegt im längerwelligen Bereich verglichen zu allen anderen Mitgliedern der Familie mit autofluoreszierenden Proteinen. Damit konnte es in der **Multi-Photonenmikroskopie** eingesetzt werden, wo es zu einer Fluoreszenz im roten Wellenlängenbereich führt. Bei der MPM handelt es sich um eine Technik, die die Auflösung von Strukturen im Tiefengewebe erlaubt. Das Prinzip ist vielfältig in Übersichtsartikeln beschrieben worden [132].

Die Untersuchung dieses Vorganges im Rahmen von **Intravitalmikroskopie** (IVM) setzt daher den Zugang zum Knochenmark voraus. Der Schädel der Maus besitzt ebenfalls ein Knochenmark, das im Gegensatz zum Mark im Femur oder Humerus deutlich leichter zugänglich für die Mikroskopie ist. Im Kapitel 2.4 dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass sich Thrombopoese an der lebenden Maus untersuchen lässt und dass wir grundsätzlich mit unserer Arbeit das Modell der Proplättchenbildung (das auch als "**flow model**" bezeichnet wird) als gültiges Modell der Thrombopoese bestätigen konnten. Die von uns beobachteten Abschnürungen von MKs in die Blutgefäße lassen sich nicht mit einem Modell von vorab strukturierten Plättchenfeldern (**platelet fields** oder **protoplatelets** wie bei YAMADA oder KOSAKI [23, 80] erklären. In allen Zeitraffer-Aufnahmen konnten wir eine sehr regulierte Abschnürung von Proplättchen sehen, die im Widerspruch zu der von Kosaki vorgeschlagenen "explosiven" Fragmentierung des Zytoplasmas steht. Die größte Überraschung unserer Arbeit war allerdings, dass sich die Abschnürungen *in vivo* von denen in der Lichtmikroskopie substantiell unterscheiden: die freigesetzten Fragmente

### 3. Diskussion

des Zytoplasmas waren mit 5-7  $\mu\text{m}$  deutlich größer als die tränenförmigen Strukturen *in vitro*. Das Volumen der abgeschnürten Partikel in der Maus liegt damit ca. 10-100-fach über dem vorher postulierten. Auf ein paar Probleme mit diesem Modell soll im folgenden näher eingegangen werden.

(1) Die Auflösungsgrenze: eYFP-Signale wurden in unserem Experiment zeit- und raum- aufgelöst aufgenommen und erlauben somit die Rekonstruktion in diesen Dimensionen. Ein Signal kann aber nur dort aufgenommen werden, wo eine ausreichende Menge an eYFP Fluoreszenz emittieren kann. In Kapitel 2.4 haben wir gezeigt, dass die Membranen von Proplättchen eYFP-positiv sind und dass dieses Membransystem auch den neu zu bildenden Thrombozyten umfasst. Diese Strukturen haben wir im Rahmen der Immunfluoreszenz von *in vitro*-stimulierten MKs der eYFP-Maus vermessen und konnten zeigen, dass die Strukturen der Proplättchen bei ca. 3  $\mu\text{m}$  liegen. Von besonderer Bedeutung ist hier, dass das Protein ausschließlich im Membransystem konzentriert und nicht zytoplasmatisch vorliegt. Dadurch wird nur das äußere des Proplättchenschafts angefärbt. Diese Signale lassen sich mittels **Dekonvolutionsmikroskopie** noch nachweisen, da hier das gesamte Fluoreszenzlicht durch die Aufnahme von vielen Schichten aufgenommen wird. Die einzelnen Aufnahmen sind hier unscharf, da Streulicht von Lichtpunkten anderer Ebenen das eigentliche Bild konvolutiert. Das tatsächliche Bild entsteht erst durch "Deconvolution", das heißt das Rückrechnen der einzelnen räumlichen Lichtpunkte auf den ursprünglichen Lichtpunkt mittels einer regressiven Fourier-Transformation. Der Vorteil zur verbreiteten **konfokalen Mikroskopie** besteht darin, dass hier das gesamte Emissionslicht zur Bildentstehung genutzt werden kann, während in der konfokalen Mikroskopie "realere" Bilder aufgenommen werden, Streulicht allerdings durch eine Lochblende physikalisch abgetrennt wird. Damit braucht man in der Regel eine stärkere Anregung (mit der Gefahr des Ausbleichens des Fluorophor) und darüberhinaus sind schwach-exprimierte Proteine kaum nachweisbar. Auch in der von uns verwendeten MPM liegt die Auflösungsgrenze im Bereich von 2-3  $\mu\text{m}$ , also gerade in dem Bereich, den wir untersuchen wollen. Es ist also grundsätzlich möglich, dass einige der von uns gesehenen eYFP-positiven Bereiche untereinander durch Proplättchenstrukturen zytoplasmatisch verbunden sind. Diese Frage kann in der Zukunft mit anderen Mausmodellen oder verbesserter Auflösung in der Mikroskopie weiter untersucht werden.

(2) Ein weiterer grundsätzlicher Nachteil der *ex vivo*-Differenzierung von MKs besteht in der Statik der Zellkultur: Fetale Leberzellen der Maus werden zwischen Gestationstag 13,5 und 15,5 entnommen und als Einzelzellsuspension in der Gegenwart von TPO inkubiert [133]. Dabei setzen sich die im Laufe der Differenzierung größer werdenden Zellen auf dem Boden der Zellkulturschale ab und bilden ab Tag 4 Proplättchen aus. Dieser Prozess ist zellautonom und nicht von äußeren Faktoren abhängig [134], obwohl diese den Prozess sehr wohl modulieren können. Proplättchen können sich also in ruhendem Medium bilden, wo dementsprechend auch keinerlei Scherkräfte wirken. Die Situation sieht *in vivo* anders aus: die Daten von LICHTMAN haben gezeigt, dass die Proplättchenausläufer durch das Endothel in den Blutstrom reichen. In den Knochenmarksinusoiden herrschen nun Scherkräfte an der Gefäßwand. Es ist naheliegend, dass es hier nicht zu einer Ausbildung von Proplättchenschäften kommen kann, die in der Regel eine Länge von 0,5 mm aufweisen. Stattdessen haben wir eher sphärische oder elliptoide Strukturen nachgewiesen, die Ausläufer in das Blutgefäß hineinreichen. Wir haben dieses Problem nur durch

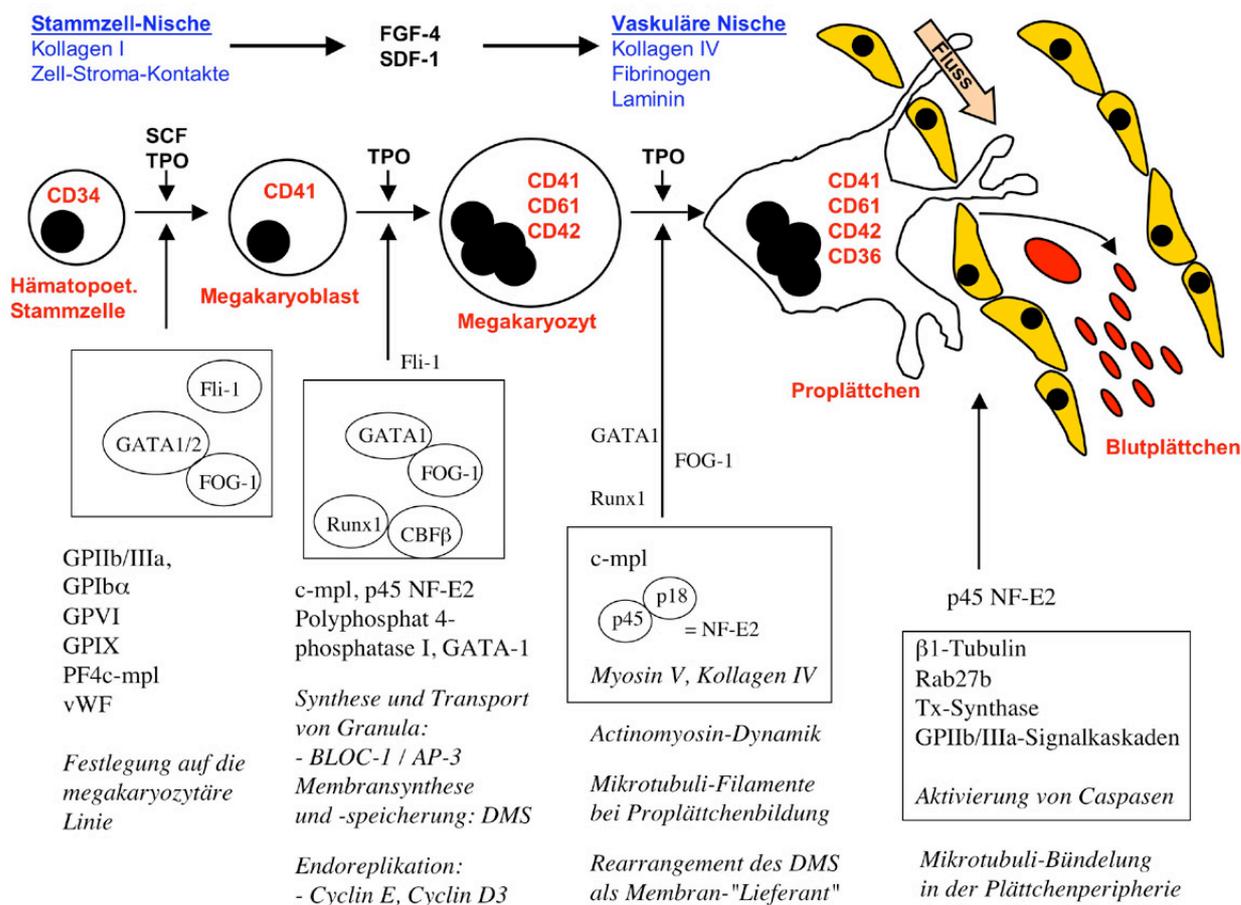
### 3. Diskussion

ein einfaches Experiment behandelt: wir haben die oben beschriebene Zellkulturschale auf einer Wippe einem definierten Scherstress ausgesetzt und nach Proplättchenbildung gezeigt, dass sich mehr Plättchen-artige Teilchen im Überstand nachweisen ließen (siehe Fig. 3B in Kapitel 2.4). Zukünftige Arbeiten sollten den Einfluß der Scherkräfte auf die Thrombopoese noch weiter herausarbeiten, insbesondere inwieweit die letzten Schritte der Thrombopoese im Blutstrom stattfinden [106].

(3) Von der hämatopoetischen Stammzelle (HSC) zum reifen Proplättchen-bildenden MKs durchläuft die Zelle *in vivo* verschiedene Kompartimente innerhalb des Knochenmarks: die HSC sitzt in der **osteoblastischen Nische**, während der reife Megakaryozyt an die Knochenmarksinusoiden zur **vaskulären Nische** wandert. Dabei hat er stets Kontakt zu Proteinen des Knochenmarkstroma und wandert dabei auf einem Gradienten der Chemokine SDF-1 und FGF-4 zu [21]. Der Kontakt mit dem Stroma beeinflusst die Thrombopoese. Untersuchungen zur Effizienz der Proplättchenbildung auf verschiedenen Substraten haben z.B. gezeigt, dass Fibrinogen und Kollagen IV Proplättchenformation unterstützt, während Kollagen I den Vorgang blockt [135]. Aus der Kenntnis der Lokalisation der Matrixproteine innerhalb des Knochenmarks (Kollagen I in der osteoblastischen Nische und Kollagen IV an den Sinusoiden) können Rückschlüsse auf die Funktion *in vivo* geschlossen werden, z.B. könnte so eine vorzeitige Thrombopoese mit einer Freisetzung von Thrombozyten in das Knochenmark statt in die Blutgefäße verhindert werden (siehe auch den Übersichtsartikel von LARSON und WATSON sowie von KOPP und RAFII [136, 137]). Eine Gesamtübersicht wesentlicher Faktoren der Megakaryozyto- und Thrombozytopoese ist in Abb. 6 dargestellt. Die Signale, die HSCs in der osteoblastischen oder vaskulären Nische erhalten müssten *in vitro* ebenfalls gegeben werden. Dies kann z.B. durch die Kultivierung auf Stromazelllinien erfolgen, die diese Faktoren sezernieren oder auf der Oberfläche exprimieren. Grundsätzlich lassen sich alle hämatopoetischen Stammzellen wie fetale Leberzellen, embryonale Stammzellen (ES) oder hämatopoetische Stammzellen (CD34+) zur Differenzierung in die megakaryozytären Linie auf solchen Stromazelllinien co-kultivieren. Insbesondere murine ES-Zellen wurden erfolgreich auf OP9-Zellen zur Differenzierung zu Proplättchen kultiviert [138], wobei die Feederlayer während der Kulturdauer regelmäßig gewechselt werden muss und die Stromazelllinie die weitere (biochemische oder durchflusszytometrische) Charakterisierung erschweren kann.

Trotz alledem lässt sich das Knochenmark mit seiner Vielzahl von differentiellen Signalen durch Konzentrationsgradienten von Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Kontakten zusammen mit den parakrin wirkenden humoralen Faktoren nur schlecht in der Zellkultur nachstellen. Hier wird man in der näheren Zukunft eher Fortschritte in der Erkenntnis der Thrombopoese durch weiteren Einsatz der Intravitalmikroskopie erwarten dürfen.

### 3. Diskussion



**Abb. 6:** Modell einiger Faktoren, die Megakaryopoese und Thrombopoese beeinflussen. In den Kästen sind für den Schritt bestimmende Transkriptionsfaktoren benannt, darunter sind einige Zielgene aufgeführt. Die zellbiologischen Mechanismen sind in Kursivschrift dargestellt. Die beiden Nischen des Knochenmarkstroma sind in blau, die Immunphänotypisierungsmarker in rot hervorgehoben.

### 3.3 Angeborene Thrombozytopenien: CAMT und TAR-Syndrom

Bei der klinischen Diagnose von Thrombozytopenien wird zunächst die Zahl der Thrombozyten im peripheren Blut bestimmt, heutzutage immer mit automatisierten Blutzählgeräten. Erst wenn Abweichungen zu den Normwerten auftreten, die Thrombozytenzahlen sehr niedrig sind oder Ausstriche für Differentialblutbilder vorliegen, können manuelle Zählungen und Morphologie die nackte Zahl aus der Zählmaschine ergänzen. Klinisch relevant ist die Abwägung eines Blutungsrisikos des Patienten, die oft durch eine Zahl unterhalb des Normbereichs (150000-400000/ $\mu$ l) angezeigt wird; zumeist wenn die "Thrombos" unter 50000/ $\mu$ l fallen. Interessanterweise können Patienten mit jeweils 30000/ $\mu$ l ganz unterschiedliche Blutungsneigungen aufweisen: Während der eine mit einer CAMT eine schwere Bildungsstörung der Vorläuferzellen im Knochenmark zeigt und leicht durch Epistaxis oder Petechien auffällt, hat ein Kind mit ITP oft kaum Blutungszeichen. Wodurch unterscheiden sich also Thrombozyten bei verschiedenen Erkrankungen und wie kann man für die Zukunft Diagnose und Therapie verbessern?

Aus der Gruppe der Thrombozytopenien im Kindesalter sind in dieser Arbeit zwei Publikationen zum TAR-Syndrom und eine Arbeit zur CAMT als Originalarbeiten beigefügt (Kapitel

### 3. Diskussion

2.5-2.7), auf die im folgenden näher eingegangen werden soll, ehe die **Thrombozytendiagnostik** besprochen werden soll.

Durch die grundlegenden Arbeiten zu Thrombopoietin und seinem Rezeptor c-Mpl in der ersten Hälfte der 90'er Jahre wurde die Basis geschaffen, die Rolle dieser Moleküle und der mit ihnen interagierenden Proteine (z.B. im Rahmen der Signaltransduktion) in der gesunden und pathologischen Megakaryopoese und Thrombopoese zu untersuchen. Wir und andere haben dabei Labortechniken entwickelt, die nicht nur den unmittelbaren Nachweis eines Moleküls ermöglichen (z.B. die Expression von c-Mpl in Thrombozyten), sondern auch funktionale Tests erlauben. Insbesondere die Durchflußzytometrie (FACS) stand aus mehreren Gründen im Zentrum dieser Arbeiten:

(1) Wenige  $\mu$ l Vollblut reichen schon aus, um die Expression von Oberflächenrezeptoren wie GPIIb/IIIa oder GPIb/IX/V nachzuweisen. Dies ist vor allem dann essentiell, wenn die Patienten hoch thrombopenisch sind und zudem bei Kleinkindern und Säuglingen keine großen Mengen abgenommen werden können. Gerade im Vergleich mit molekularbiologischen und proteinbiochemischen Techniken wie dem Immunblotting kann bei diesen Patienten noch eine Untersuchung erfolgen. Bei einem Kind unter 20000/ $\mu$ l können zudem auch keine Standard-Laboruntersuchungen zur Thrombozytenaktivität (z.B. Aggregometrie oder PFA-100) durchgeführt werden, da die Plättchenzahl nicht ausreicht.

(2) Die FACS-Technik erlaubt den Nachweis auf Einzelzellebene. Von jeder Zelle können außer den Lichtstreuungseigenschaften auch die Fluoreszenz-Intensitäten nach Antikörper-Bindung gemessen werden kann. Mit dieser Technik lassen sich grundsätzlich auch Subpopulationen detektieren wie sie bei Konduktorinnen X-chromosomaler Erkrankungen (XLT, WAS) auftreten können, wenn es zu einer unausgewogenen Lyonisierung kommt. Bei gepoolten Zellen bekommt man hingegen nur den Durchschnitt der eingesetzten Thrombozyten. Wegweisend für die Zukunft sind neben den Messungen von Oberflächenantigenen auch die Färbung und Detektion intrazellulärer Antigene (z.B. das Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein WASp [139]).

(3) Auch funktionelle Fragestellungen wie die Reaktivität auf Thrombopoietin lassen sich so einfach messen, Zeit- und Kostenaufwand sind verglichen mit anderen Techniken minimal. Für die **CAMT** haben wir so einen Defekt im Thrombopoietin-Rezeptor c-Mpl zeigen können, neben dem Fehlen des Rezeptors auf der Oberfläche auch einen fehlerhaften Synergismus von TPO mit Plättchenagonisten. Trotzdem waren die proteinchemischen Daten hilfreich, um zu sehen, dass es zu keinerlei Tyrosinphosphorylierung von Signalmolekülen bei den Patienten kommt. Basierend auf einer Einzelfallbeschreibung von zwei heterozygoten Mutationen im Gen für c-mpl von IHARA [140] haben wir zeitgleich mit einer niederländischen Gruppe den genetischen Defekt, der zu CAMT führt, aufklären können. Durch die Korrelation von klinischen Daten mit Mutationsanalysen konnte die Genotyp-Phänotyp-Hypothese, die wir in der Originalbeschreibung postuliert haben (siehe Kapitel 2.5 und [141]) inzwischen bestätigt werden. Der komplette Verlust bzw. Mutationen (insbesondere in der zytoplasmatischen Domäne) des TPO-Rezeptors führen mit der Zeit auch zur Erschöpfung aller hämatopoetischen Stammzellen. So geht die isolierte amegakaryozytäre Thrombozytopenie bei CAMT nach 4 bis 6 Jahren oft in eine aplastische Anämie über, die alle Zelllinien des Knochenmarks betrifft [142, 143]. Leider liegen die bislang beschriebenen Mutationen ohne "hot-spot" über verschiedene Exone verteilt, so dass bei einer Verdachts-

### 3. Diskussion

diagnose von CAMT noch das gesamte Gen auf genomischer Ebene untersucht werden muss. Bislang ist die einzige kurative Maßnahme die Knochenmarktransplantation, wobei zukünftig auch die Option einer Stammzelltransplantation nach retroviraler Korrektur in Erwägung gezogen werden kann. Dabei kann funktionales c-Mpl dann im Immunsystem als Neo-Antigen wirken. Insbesondere für Patienten, die ein oder zwei Aminosäureaustausche aufweisen, die in der extrazellulären Domäne eine verminderte Bindung von Thrombopoietin bewirken, kann der Einsatz von Thrombopoietin-Mimetika erwogen werden, die durch Stabilisierung der Transmembrandomäne agieren [144].

Das TAR-Syndrom ist inzwischen eine der wenigen congenitalen Thrombozytopenien, deren genetische Ursache unbekannt geblieben ist (siehe Tabelle 1). Durch die oben beschriebene CGH-Analyse konnte die Mikrodeletion auf Chromosom 1q21 als notwendig erkannt werden. Überraschenderweise wurde die Mikrodeletion bei mindestens 50% der untersuchten Patienten von einem Elternteil ererbt. Da diese klinisch unauffällig sind, muss also ein weiteres Gen an der Erkrankung beteiligt sein. Das TAR-Syndrom kann damit zu den di- oder multigenetischen Erkrankungen gerechnet werden, eine Hypothese, die bereits früher diskutiert worden ist [113]. Der deletierte Locus auf Chromosom 1q21 umfasst bei den meisten Patienten ca. 350 kb. Da wir bei einer Patientin mit voller Ausprägung von Skelettanomalie und Thrombozytopenie nur eine Deletion von ca. 200 kb nachweisen konnten, können wir die minimal-deletierte Region auf diesen Bereich eingrenzen. Er umfasst ca. 12 annotierte Gene. Leider ist unter den Genen kein "heißer Kandidat", so dass wir von einer molekularen oder genetischen Erklärung noch weit entfernt sind. Die beiden auffälligsten Gene sind **Lix1L** und **PIAS3**. **Lix1L** ist ein Gen, dessen abgeleitete Aminosäure-Struktur eine Homologie zu Lix1 (Limb expression 1) aufweist. Lix1 ist in den hinteren Gliedmaßenknospen während der Embryonalentwicklung des Huhns exprimiert. Leider ist Lix1 ansonsten nicht weiter untersucht worden, so dass weitere Aussagen über eine mögliche Rolle von Lix1L im TAR-Syndrom rein spekulativ sind.

**PIAS3** ist ein Gen, das einen "Protein Inhibitor of Activated STAT3" codiert. Dies scheint zunächst ein interessantes Kandidatengen zu sein, da STAT3 als Substrat von Jak2 unmittelbar in der Signaltransduktion von Thrombopoietin beteiligt ist. PIAS3 bindet insbesondere in Zellsystemen, die reaktiv auf Interleukin-6 sind, an phosphoryliertes STAT3 und fungiert somit als negativer Regulator [145]. PIAS3 bindet auch an **Gfi-1**, einen Transkriptionsfaktor, der in der Hämatopoese für myeloide Zellen wichtig ist [146]. Bei näherer Betrachtung ergibt sich aber ein Modell, bei dem Haploinsuffizienz von PIAS3 eher zu einem verlängerten STAT3-Signal führen sollte, während wir bei Patienten mit TAR-Syndrom keine Induktion von Tyrosinphosphorylierungen nach TPO-Stimulation nachweisen konnten [147] und auch die "Schlüssel"-Tyrosinkinase Jak2 wird nicht aktiviert [122]. Daher scheint die Beteiligung von Gfi-1 an der Pathogenese des TAR-Syndrom noch sehr unklar. Unter den weiteren Genen im deletierten Locus codieren ANKRD34 und ANKRD35 für Proteine mit Ankyrin-Domänen, HFE2 für Hämojuvelin sowie bekannte und nicht-annotierte Genprodukte. Hier kann man sicherlich eine Reihe von Hypothesen aufstellen, die sich jedoch nicht leicht überprüfen ließen. Zu den spannenden Fragen gehört: welches ist das zweite Ereignis, das zusammen mit der Mikrodeletion zur Ausprägung des TAR-Syndroms führt und wieso gibt es trotz gleicher Mikrodeletion noch eine breite Spannweite der

### 3. Diskussion

Symptom-Ausprägung, z.B. die Radiusaplasie bzw. die assoziierten Skelettveränderungen. Als Beispiel sei hier auf die Abbildung 2 in Kapitel 2.7 verwiesen.

Trotz aller Ernüchterung, was die molekulare Aufklärung des TAR-Syndroms betrifft, ist die Kenntnis der Mikrodeletion im TAR-Syndrom ein großer Schritt vorwärts. Zum einen bedeutet es für die Patienten, dass sie endlich Kenntnis eines zugrundeliegenden genetischen Defektes für ihre Erkrankung haben und zum anderen kann der Nachweis als differentialdiagnostischer und in der Zukunft sicherlich auch als pränatal-diagnostischer Marker verwendet werden. Bereits jetzt konnte so bei einer Patientin mit eher unauffälligem Blutbild (milde Thrombozytopenie ohne Blutungsneigung) durch den Nachweis der Mikrodeletion endgültig die Diagnose TAR-Syndrom gestellt werden, was die Patientin positiv beurteilt hat. Bei Familien mit TAR-Syndrom und Trägern bzw. Trägerinnen der Mikrodeletion kann bei Schwangerschaften eine genetische Beratung erfolgen.

So bleibt zuletzt die Frage, was die Thrombozytopenie mit der Radiusaplasie beim TAR-Syndrom verbindet? Gibt es ein Schlüsselgen, das für die Thrombozytopenie und für die Ausbildung der Gliedmaßenknospen zuständig ist oder sind es zwei oder mehrere Gene, die zufällig benachbart auf Chromosom 1 lokalisiert sind? Hierfür spräche, dass in der 8.-12. Schwangerschaftswoche Hämatopoese und Gliedmaßenbildung zeitgleich angelegt werden. Unabhängig davon ist zu berücksichtigen, dass sich die Thrombozytenzahlen ab dem 3. Lebensjahr bei den meisten Patienten verbessern, wobei auch dieser Mechanismus ungeklärt ist. TPO-Serumspiegel sind trotz niedriger Thrombozytenzahlen nur mäßig erhöht, während TAR-Patienten zusätzlich erhöhte IL-11-Spiegel aufweisen [51, 147]. Diese Fragen werden das TAR-Syndrom auch weiterhin zu einem interessanten Forschungsgebiet machen.

#### 3.4 Forschung in der Thrombopoese: Quo vadis?

Abschließend seien ein paar Aspekte hervorgehoben, in welche Richtung der Autor sich die Zukunft der Megakaryozytenforschung vorstellen kann:

##### 1. Manipulation von Megakaryozyten:

Die Manipulation von MKs steckt technisch noch in den Kinderschuhen verglichen mit anderen hämatopoetischen Zelllinien. In den letzten Jahren haben einige Gruppen erfolgreich virale Strategien zur Infektion von megakaryozytären Vorläuferzellen eingesetzt. Ein grundsätzliches Problem bleibt allerdings bestehen: was wird beobachtet? Zumeist ist es die Morphologie oder die Ausbildung von Proplättchen. Hier stellt sich die Frage, welcher Zeitraum bleibt zwischen Infektion und der "Messung". Genetische Mausmodelle werden wohl weiterhin essentiell bleiben, um Thrombopoese *in vivo* zu untersuchen. Noch problematischer gestaltet sich der Einsatz von RNAi, insbesondere durch den Einsatz von Retro- oder Lentiviren, die small hairpin RNAs codieren. Hier besteht selten genügend Zeit, um das gewünschte Protein ausreichend herunterzuregulieren. Der Einsatz von "stabilen" Klonen führt oft dazu, dass die Antibiotikaselektion die Proplättchenbildung hemmt. Hier liegen eine Reihe von technischen Problemen, die sich nicht einfach lösen lassen werden [79].

### 3. Diskussion

#### 2. Generierung von normalen und transgenen Plättchen *in vitro*

Der Proplättchenassay erlaubt die Differenzierung von fetalen Leberzellen der Maus zu proplättchenbildenden MKs. Die abgeschnürten Fragmente unterscheiden sich nicht von Thrombozyten aus dem peripheren Blut. Eine wichtige Frage ist: Wie kann man diesen Prozess zum einen so ausdehnen, dass man eine größere Menge an Thrombozyten generieren kann und wie kann man sie von zellulärem Debris abtrennen. Wenn man das System für den Menschen überträgt, wird man CD34+ Zellen als Ausgangsmaterial verwenden. Damit sind längere Inkubationszeiten verbunden und der Peak an Proplättchen erfolgt noch weniger synchronisiert als im Maussystem. Parallel zu diesen Systemen kann man dann auch Plättchen von transgenen MKs isolieren und studieren. Letztlich könnten transgene Plättchen patientenspezifisch transfundiert werden [79, 148].

#### 3. Thrombozytendiagnostik und Stammzelltransplantation

Neuartige Thrombozytenparameter stehen durch den Einsatz von modernen automatisierten Blutzählgeräten zur Verfügung. Zu ihnen gehört neben dem Größenparameter *Mean Platelet Volume MPV* auch die Fraktion reaktiv gebildeter, sogenannter "unreifer" Plättchen (*Immature Platelet Fraction IPF*), die sich durch einen hohen RNA-Gehalt auszeichnet. Der Einsatz dieser Parameter in der Diagnostik und Prognose sollte bei Fragen des Plättchen-*Engraftments* bei Stammzelltransplantationen helfen und können die Knochenmarkpunktion in diesem Aspekt ersetzen. Das späte Ansteigen der Plättchenzahl nach einer Transplantation kann durch den Einsatz von zum Teil *in vitro*-ausdifferenzierter CD34-positiver Zellen zu CD41-positiven Zellen verkürzt werden [149].

#### 4. Andere Aspekte

Thrombozyten werden klinisch oft ausschließlich als ein Parameter betrachtet, der etwas über die Blutungswahrscheinlichkeit eines Patienten sagt. Zunehmend erkennt man auch weitere Funktionen von Thrombozyten, insbesondere in der Immunologie. So vermittelt das Plättchen- und Endothel-spezifische  $\beta$ 3-Integrin (CD61) einen wichtigen Rezeptor für das Hantavirus [150] und eröffnet neue Sichtweisen, ob Virus-induzierte Hämorrhagien als Folge der Thrombozytopenie reaktiv sind oder durch Infektion von MKs erfolgen. Aktivierte Thrombozyten sezernieren wichtige Wachstumsfaktoren wie *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF) oder SLPI, aber auch pro- und anti-angiogenetische Faktoren, die differenziell sezerniert werden können [102]. Auch die miRNAs werden für die Thrombopoese untersucht [151]. Sicherlich bleiben die Thrombozyten und die Thrombozytopenie ein spannendes Thema für die molekulare Medizin im 21. Jahrhundert.

## 4. Zusammenfassung

### **4. Zusammenfassung**

Der schnelle Verschluß verletzter Blutgefäße ist essentiell, um größere Blutverluste zu vermeiden. Thrombozyten sind kernlose Abschnürungen von Megakaryozyten, die im peripheren Blut diese Aufgabe wahrnehmen. Diese Arbeit stellt verschiedene Aspekte der Ausreifung von Megakaryozyten zu Thrombozyten dar.

Im ersten Abschnitt wurden die zellbiologischen Grundlagen für die Transformation vom Megakaryozyt zum Thrombozyt dargestellt. Dabei stand das Zytoskelett und insbesondere die Ausbildung von Mikrotubuli-Filamenten im Vordergrund. Während der Megakaryozyt ein verzweigtes Netzwerk von Mikrotubuli-Filamenten aufweist, ist der Thrombozyt durch ein Bündel von Mikrotubuli charakterisiert, das sich in der Peripherie des Blutplättchens findet und das essentiell für die Ausbildung seiner diskoiden Form ist. Diese Ausbildung geschieht über die Zwischenstufe der Proplättchen-Bildung, wobei in der Zellperipherie neue Mikrotubuli nukleiert werden müssen. Da sich Blutplättchen nur an den freien Enden der Proplättchen abschnüren können, sind die Proplättchen weit verzweigte Strukturen. Die Ausbildung und Probleme der Verzweigung sind im ersten Teil dieser Arbeit beschrieben und diskutiert worden.

Im zweiten Abschnitt wurde das Membransystem des Megakaryozyt charakterisiert. Beim Übergang einer großen Zelle von bis zu 80 µm im Knochenmark zu ca. 1000 Blutplättchen mit einem Durchmesser von ca. 2-3 µm entsteht eine Vervielfachung der Zelloberfläche. Diese Membranen werden vom reifen Megakaryozyten im Inneren als Demarkationsmembransystem bereitgehalten, um es während der Thrombopoese zur Verfügung zu stellen. Mittels retroviraler Infektion von primären Megakaryozyten konnte gezeigt werden, dass reife Zellen Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat im inneren Membransystem (DMS) anreichern, während die äußere Zellmembran dieses Lipid nicht anreichert. Während der Thrombopoese dient dieses Lipid als Anker für einen Signalweg, indem Wiskott-Aldrich-Syndrom (WASp)-vermittelte Polymerisierung von Actin-Filamenten über den Arp2/3-Komplex gesteuert wird. Das Membransystem wurde insbesondere mit einem transgenen Tiermodell weiter charakterisiert, in dem ein fluoreszentes Protein in die Membranen integriert. Mit Hilfe dieses Mausmodells und Zwei-Photonen-Mikroskopie konnte der Vorgang der Thrombopoese zum ersten Mal *in vivo* beobachtet werden. Dabei konnte zunächst die Lage reifer Megakaryozyten im Knochenmark an den Sinusoiden aufgezeigt werden, sowie die Ausbildung von zytoplasmatischen Ausläufern und letztlich der Übergang vom Knochenmark in die Blutgefäße. Dabei wurde die interessante Beobachtung gemacht, dass die *in vivo* freigesetzten Strukturen größer sind als Thrombozyten und der allerletzte Schritt der Thrombozytopoese wohl im Blutstrom stattfindet.

Im dritten und letzten Abschnitt wurden molekulare Mechanismen untersucht, deren Störung zu angeborenen Thrombozytopenien aufgrund von Bildungsstörungen im Knochenmark führen. Im Zentrum stehen dabei die isolierte congenitale amegakaryozytäre Thrombozytopenie (CAMT), die durch extrem niedrige Thrombozytenzahlen im peripheren Blut mit ebenfalls niedrigen

#### 4. Zusammenfassung

Megakaryozyten im Knochenmark charakterisiert ist. Ursächlich konnten Mutationen im Gen für den Thrombopoietin-Rezeptor c-mpl identifiziert werden, die zur autosomal-rezessiven Erkrankung führen. Dabei konnte eine Genotyp-Phänotyp-Hypothese aufgestellt werden, die den klinischen Verlauf, insbesondere den Übergang in eine aplastische Anämie, voraussagen soll. Diese These konnte später von anderen bestätigt werden. Die zweite Erkrankung ist eine Thrombozytopenie, die mit einer bilateralen Radiusaplasie assoziiert ist. Dieses sogenannte Thrombozytopenie-absent-radius (TAR)-Syndrom hat eine Inzidenz von ca. 1-2 pro Million. In dieser Arbeit konnte zunächst die Thrombozytopenie mit einer unzureichenden Signaltransduktion von Thrombopoietin beschrieben werden. Dabei wird die Januskinase Jak2 trotz Expression nicht nach Stimulation mit Thrombopoietin phosphoryliert und insgesamt kommt es zu einer minimalen Aktivierung der Thrombopoietin-abhängigen Signalkaskaden. Mit Hilfe der hochauflösenden komparativen Genomhybridisierungsanalyse (CGH) konnte bei über 30 Patienten mit TAR-Syndrom eine Mikrodeletion auf Chromosom 1q21 nachgewiesen werden, die somit als differentialdiagnostischer Marker dienen kann. Interessanterweise tritt diese Mikrodeletion in der Normalbevölkerung nicht als Polymorphismus auf, wird aber bei den TAR-Patienten zur Hälfte von einem unbetroffenen Elternteil vererbt. Diese Befunde legen zum einen nahe, dass die Mikrodeletion notwendig, aber nicht hinreichend zur Ausbildung des TAR-Syndroms ist und dass das TAR-Syndrom als mindestens di-genetische Erkrankung gelten kann, dessen zweiter Faktor bislang noch unbekannt ist. Darüberhinaus bietet das von uns vorgeschlagene Modell eine Möglichkeit, den oft unklaren Erbgang zu erklären: dieser ähnelt zwar oft einem autosomal-rezessivem Erbgang, kann aber auch dominante Elemente aufweisen, die sich mit einem di-genetischen Bild besser erklären lassen.

Insgesamt stellen die hier zusammengefassten Original- und Übersichtsarbeiten eine Momentaufnahme der Megakaryozytenbiologie dar, in der zellbiologische Grundlagen mit den klinischen Aspekten unklarer angeborener Thrombozytopenien aufgrund einer Bildungsstörung zusammengefasst sind. Letztlich eröffnen die in der Diskussion diskutierten Thesen mehr Fragen als Antworten, deren Beantwortung in der Zukunft den Übergang von Megakaryozyten zu Thrombozyten nicht allein in der Ästhetik zeitaufgelöster Videofilme, sondern auch in der Prognose und Therapie von congenitalen Erkrankungen dazu führen mag, die Lebensqualität von betroffenen Kindern und deren Eltern zu verbessern.

## 5. Danksagung

### **5. Danksagung**

Diese Arbeit wäre nicht möglich gewesen, ohne Menschen an meiner Seite, die mich beruflich wie privat gefordert und gefördert haben:

Ein Teil dieser Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (SCHU1421/2-1 und SCHU1421/3-1) gefördert.

Prof. Dr. Gerhard Gaedicke danke ich für die freundliche Aufnahme in seine Abteilung, seine Unterstützung und Interesse an meiner Arbeit sowie das Einrichten des "Thrombozyten-Clubs".

Prof. Dr. Christian Hagemeyer sei gedankt für die Aufnahme in sein Labor für Pädiatrische Molekularbiologie (LPMB), seine Unterstützung für meine Gruppe und sein immer offenes Ohr für alle Belange.

Frau Dr. Gabriele Strauß danke ich für die lange Zusammenarbeit und Freundschaft. Ohne ihren Brückenschlag zwischen Klinik und Labor wäre ein wesentlicher Teil dieser Arbeit nicht entstanden. Weiterhin danke ich der Familie Strauß für die Aufnahme unter ihrem Dach nach meiner Rückkehr aus den USA.

Allen Patienten, Eltern und Gesundspendern sei herzlichst gedankt für ihre Bereitschaft, Blut zu spenden.

Diese Arbeit wäre nicht möglich gewesen, ohne die Hilfe im Labor. Hier möchte ich zunächst Silke Fleischhauer danken, die meine Arbeitsgruppe in Berlin mit aufgebaut hat und deren Einsatz weit über das übliche Maß hinausgeht. Stefan Kunert, Imke Meyer, Cora Vollert und Martin Wannack seien gedankt für Anregungen und ihren Einsatz.

Ein herzliches Dankeschön gilt Prof. Dr. Wolfgang Bergmeier, Dr. Gabriele Strauß, Julia Polansky, Imke Meyer und Martin Schulze für das kritische Lesen und Kommentare zum Manuskript.

Meiner Familie sei gedankt für die bedingungslose Unterstützung in all den Jahren.

Abschließend möchte ich Dr. Cees Schaar für die gemeinsame Zeit danken sowie den nahezu unbegrenzten Nachschub an Schoolkrijtjes.

## 6. Referenzen

### **6. Referenzen**

1. Tocantins, L.M., Historical notes on blood platelets. *Blood*, 1948. 3: 1073-1082.
2. Robb-Smith, A.H., Why the platelets were discovered. *Br J Haematol*, 1967. 13(4): 618-637.
3. Tavassoli, M., Megakaryocyte--platelet axis and the process of platelet formation and release. *Blood*, 1980. 55(4): 537-545.
4. Aschoff, L., Über capilläre Embolie riesenkernhaltiger Zellen. *Arch Path Anat Physiol*, 1893. 134: 11.
5. Howell, W.H., Donahue, D.D., The production of blood platelets in the lung. *J Exp Med*, 1937. 65: 177.
6. Kaufman, R.M., Airo, R., Pollack, S., Crosby, W.H., Circulating megakaryocytes and platelet release in the lung. *Blood*, 1965. 26(6): 720-731.
7. Kaufman, R.M., Airo, R., Pollack, S., Crosby, W.H., Doberneck, R., Origin of Pulmonary Megakaryocytes. *Blood*, 1965. 25: 767-775.
8. Pedersen, N.T., The pulmonary vessels as a filter for circulating megakaryocytes in rats. *Scand J Haematol*, 1974. 13(3): 225-231.
9. Pedersen, N.T., Occurrence of megakaryocytes in various vessels and their retention in the pulmonary capillaries in man. *Scand J Haematol*, 1978. 21(5): 369-375.
10. Trowbridge, E.A., Martin, J.F., Slater, D.N., Evidence for a theory of physical fragmentation of megakaryocytes, implying that all platelets are produced in the pulmonary circulation. *Thromb Res*, 1982. 28(4): 461-475.
11. Martin, J.F., Slater, D.N., Trowbridge, E.A., Evidence that platelets are produced in the pulmonary circulation by a physical process. *Prog Clin Biol Res*, 1986. 215: 405-416.
12. Levine, R.F., Eldor, A., Shoff, P.K., Kirwin, S., Tenza, D., Cramer, E.M., Circulating megakaryocytes: delivery of large numbers of intact, mature megakaryocytes to the lungs. *Eur J Haematol*, 1993. 51(4): 233-246.
13. Zucker-Franklin, D., Philipp, C.S., Platelet production in the pulmonary capillary bed: new ultrastructural evidence for an old concept. *Am J Pathol*, 2000. 157(1): 69-74.
14. Kuter, D.J., Hunt, P., Sheridan, W., Zucker-Franklin, D., *Thrombopoiesis and Thrombopoietins*. 1997, Totowa, New Jersey: Humana Press.
15. Michelson, A.D., *Platelets*. 2nd Edition ed. 2006: Academic Press.
16. Jackson, C.W., Cholinesterase as a possible marker for early cells of the megakaryocytic series. *Blood*, 1973. 42(3): 413-421.
17. Paulus, J.M., Maigne, J., Keyhani, E., Mouse megakaryocytes secrete acetylcholinesterase. *Blood*, 1981. 58(6): 1100-1106.
18. Levine, R.F., Bunn, P.A., Jr., Hazzard, K.C., Schlam, M.L., Flow cytometric analysis of megakaryocyte ploidy. Comparison with Feulgen microdensitometry and discovery that 8N is the predominant ploidy class in guinea pig and monkey marrow. *Blood*, 1980. 56(2): 210-217.
19. Ciurea, S.O., Hoffman, R., Cytokines for the treatment of thrombocytopenia. *Semin Hematol*, 2007. 44(3): 166-182.
20. Chesterman, C.N., Penington, G.D., Platelet Production and Turnover: Thrombocytopenia and Thrombocytosis, in *Blood and its disorders*, Hardisty, R.M., Weatherall, D.J., Editors. 1993, Blackwell: Oxford. 971-1030.

## 6. Referenzen

21. Avecilla, S.T., Hattori, K., Heissig, B., Tejada, R., Liao, F., Shido, K., Jin, D.K., Dias, S., Zhang, F., Hartman, T.E., Hackett, N.R., Crystal, R.G., Witte, L., Hicklin, D.J., Bohlen, P., Eaton, D., Lyden, D., de Sauvage, F., Rafii, S., Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat Med*, 2004. 10(1): 64-71.
22. Patel, S.R., Hartwig, J.H., Italiano, J.E., Jr., The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J Clin Invest*, 2005. 115(12): 3348-3354.
23. Kosaki, G., In vivo platelet production from mature megakaryocytes: does platelet release occur via proplatelets? *Int J Hematol*, 2005. 81(3): 208-219.
24. Deutsch, V.R., Tomer, A., Megakaryocyte development and platelet production. *Br J Haematol*, 2006. 134(5): 453-466.
25. Szalai, G., LaRue, A.C., Watson, D.K., Molecular mechanisms of megakaryopoiesis. *Cell Mol Life Sci*, 2006. 63(21): 2460-2476.
26. Chang, Y., Bluteau, D., Debili, N., Vainchenker, W., From hematopoietic stem cells to platelets. *J Thromb Haemost*, 2007. 5 Suppl 1: 318-327.
27. Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., Weissman, I.L., A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*, 2000. 404(6774): 193-197.
28. Debili, N., Coulombel, L., Croisille, L., Katz, A., Guichard, J., Breton-Gorius, J., Vainchenker, W., Characterization of a bipotent erythro-megakaryocytic progenitor in human bone marrow. *Blood*, 1996. 88(4): 1284-1296.
29. Adolfsson, J., Mansson, R., Buza-Vidas, N., Hultquist, A., Liuba, K., Jensen, C.T., Bryder, D., Yang, L., Borge, O.J., Thoren, L.A., Anderson, K., Sitnicka, E., Sasaki, Y., Sigvardsson, M., Jacobsen, S.E., Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell*, 2005. 121(2): 295-306.
30. Forsberg, E.C., Serwold, T., Kogan, S., Weissman, I.L., Passegue, E., New evidence supporting megakaryocyte-erythrocyte potential of flk2/flt3+ multipotent hematopoietic progenitors. *Cell*, 2006. 126(2): 415-426.
31. Kaushansky, K., Thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. *Blood*, 1995. 86(2): 419-431.
32. Kaushansky, K., The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J Clin Invest*, 2005. 115(12): 3339-3347.
33. Lepage, A., Leboeuf, M., Cazenave, J.P., de la Salle, C., Lanza, F., Uzan, G., The alpha(IIb)beta(3) integrin and GPIb-V-IX complex identify distinct stages in the maturation of CD34(+) cord blood cells to megakaryocytes. *Blood*, 2000. 96(13): 4169-4177.
34. Dhanjal, T.S., Pendaries, C., Ross, E.A., Larson, M.K., Prottly, M.B., Buckley, C.D., Watson, S.P., A novel role for PECAM-1 in megakaryocytokinesis and recovery of platelet counts in thrombocytopenic mice. *Blood*, 2007. 109(10): 4237-4244.
35. Wu, Y., Welte, T., Michaud, M., Madri, J.A., PECAM-1: a multifaceted regulator of megakaryocytogenesis. *Blood*, 2007. 110(3): 851-859.
36. Tomer, A., Human marrow megakaryocyte differentiation: multiparameter correlative analysis identifies von Willebrand factor as a sensitive and distinctive marker for early (2N and 4N) megakaryocytes. *Blood*, 2004. 104(9): 2722-2727.
37. Sivaprasad, U., Machida, Y.J., Dutta, A., APC/C--the master controller of origin licensing? *Cell Div*, 2007. 2: 8.

## 6. Referenzen

38. Cavalier-Smith, T., Nuclear volume control by nucleoskeletal DNA, selection for cell volume and cell growth rate, and the solution of the DNA C-value paradox. *J Cell Sci*, 1978. 34: 247-278.
39. Olmo, E., Nucleotype and cell size in vertebrates: a review. *Basic Appl Histochem*, 1983. 27(4): 227-256.
40. Odell, T.T., Murphy, J.R., Jackson, C.W., Stimulation of megakaryocytopoiesis by acute thrombocytopenia in rats. *Blood*, 1976. 48(5): 765-775.
41. Ravid, K., Lu, J., Zimmet, J.M., Jones, M.R., Roads to polyploidy: the megakaryocyte example. *J Cell Physiol*, 2002. 190(1): 7-20.
42. Nagata, Y., Muro, Y., Todokoro, K., Thrombopoietin-induced polyploidization of bone marrow megakaryocytes is due to a unique regulatory mechanism in late mitosis. *J Cell Biol*, 1997. 139(2): 449-457.
43. Geng, Y., Yu, Q., Sicinska, E., Das, M., Schneider, J.E., Bhattacharya, S., Rideout, W.M., Bronson, R.T., Gardner, H., Sicinski, P., Cyclin E ablation in the mouse. *Cell*, 2003. 114(4): 431-443.
44. Raslova, H., Roy, L., Vourc'h, C., Le Couedic, J.P., Brison, O., Metivier, D., Feunteun, J., Kroemer, G., Debili, N., Vainchenker, W., Megakaryocyte polyploidization is associated with a functional gene amplification. *Blood*, 2003. 101(2): 541-544.
45. Raslova, H., Baccini, V., Loussaief, L., Comba, B., Larghero, J., Debili, N., Vainchenker, W., Mammalian target of rapamycin (mTOR) regulates both proliferation of megakaryocyte progenitors and late stages of megakaryocyte differentiation. *Blood*, 2006. 107(6): 2303-2310.
46. Junt, T., Schulze, H., Chen, Z., Massberg, S., Goerge, T., Krueger, A., Wagner, D.D., Graf, T., Italiano, J.E., Jr., Shivdasani, R.A., von Andrian, U.H., Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science*, 2007. 317(5845): 1767-1770.
47. Foster, D.C., Sprecher, C.A., Grant, F.J., Kramer, J.M., Kuijper, J.L., Holly, R.D., Whitmore, T.E., Heipel, M.D., Bell, L.A., Ching, A.F., et al., Human thrombopoietin: gene structure, cDNA sequence, expression, and chromosomal localization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(26): 13023-13027.
48. Nagahisa, H., Nagata, Y., Ohnuki, T., Osada, M., Nagasawa, T., Abe, T., Todokoro, K., Bone marrow stromal cells produce thrombopoietin and stimulate megakaryocyte growth and maturation but suppress proplatelet formation. *Blood*, 1996. 87(4): 1309-1316.
49. Kuter, D.J., Rosenberg, R.D., The reciprocal relationship of thrombopoietin (c-Mpl ligand) to changes in the platelet mass during busulfan-induced thrombocytopenia in the rabbit. *Blood*, 1995. 85(10): 2720-2730.
50. Dame, C., Gaedicke, G., Schulze, H., Physiologie der Megakaryopoese und des Thrombozyten. *Monatsschrift Kinderheilkunde*, 2006(154): 502-509.
51. Cremer, M., Schulze, H., Linthorst, G., Folman, C.C., Wehnert, S., Strauss, G., von dem Borne, A.E., Welte, K., Ballmaier, M., Serum levels of thrombopoietin, IL-11, and IL-6 in pediatric thrombocytopenias. *Ann Hematol*, 1999. 78(9): 401-407.
52. Wickrema, A., Crispino, J.D., Erythroid and megakaryocytic transformation. *Oncogene*, 2007. 26(47): 6803-6815.
53. Goldfarb, A.N., Transcriptional control of megakaryocyte development. *Oncogene*, 2007. 26(47): 6795-6802.

## 6. Referenzen

54. Chang, A.N., Cantor, A.B., Fujiwara, Y., Lodish, M.B., Droho, S., Crispino, J.D., Orkin, S.H., GATA-factor dependence of the multitype zinc-finger protein FOG-1 for its essential role in megakaryopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(14): 9237-9242.
55. Shivdasani, R.A., Fujiwara, Y., McDevitt, M.A., Orkin, S.H., A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development. *Embo J*, 1997. 16(13): 3965-3973.
56. Breton-Gorius, J., Favier, R., Guichard, J., Cherif, D., Berger, R., Debili, N., Vainchenker, W., Douay, L., A new congenital dysmegakaryopoietic thrombocytopenia (Paris-Trousseau) associated with giant platelet alpha-granules and chromosome 11 deletion at 11q23. *Blood*, 1995. 85(7): 1805-1814.
57. Raslova, H., Komura, E., Le Couedic, J.P., Larbret, F., Debili, N., Feunteun, J., Danos, O., Albagli, O., Vainchenker, W., Favier, R., FLI1 monoallelic expression combined with its hemizygous loss underlies Paris-Trousseau/Jacobsen thrombopenia. *J Clin Invest*, 2004. 114(1): 77-84.
58. Deschler, B., Lubbert, M., Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer*, 2006. 107(9): 2099-2107.
59. Shivdasani, R.A., Rosenblatt, M.F., Zucker-Franklin, D., Jackson, C.W., Hunt, P., Saris, C.J., Orkin, S.H., Transcription factor NF-E2 is required for platelet formation independent of the actions of thrombopoietin/MGDF in megakaryocyte development. *Cell*, 1995. 81(5): 695-704.
60. Onodera, K., Shavit, J.A., Motohashi, H., Yamamoto, M., Engel, J.D., Perinatal synthetic lethality and hematopoietic defects in compound mafG::mafK mutant mice. *Embo J*, 2000. 19(6): 1335-1345.
61. Schwer, H.D., Lecine, P., Tiwari, S., Italiano, J.E., Jr., Hartwig, J.H., Shivdasani, R.A., A lineage-restricted and divergent beta-tubulin isoform is essential for the biogenesis, structure and function of blood platelets. *Curr Biol*, 2001. 11(8): 579-586.
62. Tiwari, S., Italiano, J.E., Jr., Barral, D.C., Mules, E.H., Novak, E.K., Swank, R.T., Seabra, M.C., Shivdasani, R.A., A role for Rab27b in NF-E2-dependent pathways of platelet formation. *Blood*, 2003. 102(12): 3970-3979.
63. Drachman, J.G., Millett, K.M., Kaushansky, K., Thrombopoietin signal transduction requires functional JAK2, not TYK2. *J Biol Chem*, 1999. 274(19): 13480-13484.
64. Bacon, C.M., Tortolani, P.J., Shimosaka, A., Rees, R.C., Longo, D.L., O'Shea, J.J., Thrombopoietin (TPO) induces tyrosine phosphorylation and activation of STAT5 and STAT3. *FEBS Lett*, 1995. 370(1-2): 63-68.
65. Sattler, M., Durstin, M.A., Frank, D.A., Okuda, K., Kaushansky, K., Salgia, R., Griffin, J.D., The thrombopoietin receptor c-MPL activates JAK2 and TYK2 tyrosine kinases. *Exp Hematol*, 1995. 23(9): 1040-1048.
66. Schulze, H., Biochemische Untersuchungen zur Signaltransduktion des Thrombopoietin-Rezeptors c-Mpl in Thrombozyten, Dissertation, Fachbereich Chemie. 1999, Universität Hannover.
67. 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. *Exp Hematol*, 2000. 28(3): 294-304.
68. Wang, Q., Miyakawa, Y., Fox, N., Kaushansky, K., Interferon-alpha directly represses megakaryopoiesis by inhibiting thrombopoietin-induced signaling through induction of SOCS-1. *Blood*, 2000. 96(6): 2093-2099.

## 6. Referenzen

69. Ezumi, Y., Uchiyama, T., Takayama, H., Thrombopoietin potentiates the protein-kinase-C-mediated activation of mitogen-activated protein kinase/ERK kinases and extracellular signal-regulated kinases in human platelets. *Eur J Biochem*, 1998. 258(3): 976-985.
70. Rojnuckarin, P., Miyakawa, Y., Fox, N.E., Deou, J., Daum, G., Kaushansky, K., The roles of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase C $\zeta$  for thrombopoietin-induced mitogen-activated protein kinase activation in primary murine megakaryocytes. *J Biol Chem*, 2001. 276(44): 41014-41022.
71. Geddis, A.E., Fox, N.E., Kaushansky, K., Phosphatidylinositol 3-kinase is necessary but not sufficient for thrombopoietin-induced proliferation in engineered Mpl-bearing cell lines as well as in primary megakaryocytic progenitors. *J Biol Chem*, 2001. 276(37): 34473-34479.
72. Tanaka, M., Kirito, K., Kashii, Y., Uchida, M., Watanabe, T., Endo, H., Endoh, T., Sawada, K., Ozawa, K., Komatsu, N., Forkhead family transcription factor FKHRL1 is expressed in human megakaryocytes. Regulation of cell cycling as a downstream molecule of thrombopoietin signaling. *J Biol Chem*, 2001. 276(18): 15082-15089.
73. Kirito, K., Fox, N., Kaushansky, K., Thrombopoietin stimulates Hoxb4 expression: an explanation for the favorable effects of TPO on hematopoietic stem cells. *Blood*, 2003. 102(9): 3172-3178.
74. Rojnuckarin, P., Kaushansky, K., Actin reorganization and proplatelet formation in murine megakaryocytes: the role of protein kinase calpha. *Blood*, 2001. 97(1): 154-161.
75. Shiroshita, N., Musashi, M., Sakurada, K., Kimura, K., Tsuda, Y., Ota, S., Iwasaki, H., Miyazaki, T., Kato, T., Miyazaki, H., Shimosaka, A., Asaka, M., Involvement of protein kinase C-epsilon in signal transduction of thrombopoietin in enhancement of interleukin-3-dependent proliferation of primitive hematopoietic progenitors. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001. 297(3): 868-875.
76. Green, A.R., Rockman, S., DeLuca, E., Begley, C.G., Induced myeloid differentiation of K562 cells with downregulation of erythroid and megakaryocytic transcription factors: a novel experimental model for hemopoietic lineage restriction. *Exp Hematol*, 1993. 21(4): 525-531.
77. Drayer, A.L., Olthof, S.G., Vellenga, E., Mammalian target of rapamycin is required for thrombopoietin-induced proliferation of megakaryocyte progenitors. *Stem Cells*, 2006. 24(1): 105-114.
78. Guerriero, R., Parolini, I., Testa, U., Samoggia, P., Petrucci, E., Sargiacomo, M., Chelucci, C., Gabbianelli, M., Peschle, C., Inhibition of TPO-induced MEK or mTOR activity induces opposite effects on the ploidy of human differentiating megakaryocytes. *J Cell Sci*, 2006. 119(Pt 4): 744-752.
79. Pendaries, C., Watson, S.P., Spalton, J.C., Methods for genetic modification of megakaryocytes and platelets. *Platelets*, 2007. 18(6): 393-408.
80. Yamada, E., The fine structure of the megakaryocyte in the mouse spleen. *Acta Anat (Basel)*, 1957. 29(3): 267-290.
81. Behnke, O., An electron microscope study of the megakaryocyte of the rat bone marrow. I. The development of the demarcation membrane system and the platelet surface coat. *J Ultrastruct Res*, 1968. 24(5): 412-433.
82. Zucker-Franklin, D., Petursson, S., Thrombocytopoiesis--analysis by membrane tracer and freeze-fracture studies on fresh human and cultured mouse megakaryocytes. *J Cell Biol*, 1984. 99(2): 390-402.

## 6. Referenzen

83. Stahl, C.P., Zucker-Franklin, D., McDonald, T.P., Incomplete antigenic cross-reactivity between platelets and megakaryocytes: relevance to ITP. *Blood*, 1986. 67(2): 421-428.
84. Hyde, P., Zucker-Franklin, D., Antigenic differences between human platelets and megakaryocytes. *Am J Pathol*, 1987. 127(2): 349-357.
85. Zucker-Franklin, D., ed. *Atlas of Blood Cells: Function and Pathology*. 2nd edition ed. 1988, Lea & Febiger: Philadelphia.
86. Radley, J.M., Scurfield, G., The mechanism of platelet release. *Blood*, 1980. 56(6): 996-999.
87. Radley, J.M., Haller, C.J., The demarcation membrane system of the megakaryocyte: a misnomer? *Blood*, 1982. 60(1): 213-219.
88. Haller, C.J., Radley, J.M., Time-lapse cinemicrography and scanning electron microscopy of platelet formation by megakaryocytes. *Blood Cells*, 1983. 9(3): 407-418.
89. Italiano, J.E., Jr., Lecine, P., Shivdasani, R.A., Hartwig, J.H., Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J Cell Biol*, 1999. 147(6): 1299-1312.
90. Hartwig, J., Italiano, J., Jr., The birth of the platelet. *J Thromb Haemost*, 2003. 1(7): 1580-1586.
91. Italiano, J.E., Jr., Shivdasani, R.A., Megakaryocytes and beyond: the birth of platelets. *J Thromb Haemost*, 2003. 1(6): 1174-1182.
92. Hartwig, J.H., Italiano, J.E., Jr., Cytoskeletal mechanisms for platelet production. *Blood Cells Mol Dis*, 2006. 36(2): 99-103.
93. Handagama, P.J., Jain, N.C., Feldman, B.F., Farver, T.B., Kono, C.S., In vitro platelet release by rat megakaryocytes: effect of heterologous antiplatelet serum. *Am J Vet Res*, 1987. 48(7): 1147-1149.
94. Tablin, F., Castro, M., Leven, R.M., Blood platelet formation in vitro. The role of the cytoskeleton in megakaryocyte fragmentation. *J Cell Sci*, 1990. 97 ( Pt 1): 59-70.
95. Italiano, J.E., Jr., Bergmeier, W., Tiwari, S., Falet, H., Hartwig, J.H., Hoffmeister, K.M., Andre, P., Wagner, D.D., Shivdasani, R.A., Mechanisms and implications of platelet discoid shape. *Blood*, 2003. 101(12): 4789-4796.
96. Nogales, E., Structural insight into microtubule function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2001. 30: 397-420.
97. Harrison, P., Wilbourn, B., Debili, N., Vainchenker, W., Breton-Gorius, J., Lawrie, A.S., Masse, J.M., Savidge, G.F., Cramer, E.M., Uptake of plasma fibrinogen into the alpha granules of human megakaryocytes and platelets. *J Clin Invest*, 1989. 84(4): 1320-1324.
98. Camire, R.M., Pollak, E.S., Kaushansky, K., Tracy, P.B., Secretable human platelet-derived factor V originates from the plasma pool. *Blood*, 1998. 92(9): 3035-3041.
99. Heijnen, H.F., Debili, N., Vainchenker, W., Breton-Gorius, J., Geuze, H.J., Sixma, J.J., Multivesicular bodies are an intermediate stage in the formation of platelet alpha-granules. *Blood*, 1998. 91(7): 2313-2325.
100. Youssefian, T., Cramer, E.M., Megakaryocyte dense granule components are sorted in multivesicular bodies. *Blood*, 2000. 95(12): 4004-4007.
101. Flaumenhaft, R., Dilks, J.R., Rozenvayn, N., Monahan-Earley, R.A., Feng, D., Dvorak, A.M., The actin cytoskeleton differentially regulates platelet alpha-granule and dense-granule secretion. *Blood*, 2005. 105(10): 3879-3887.
102. Italiano, J.E., Jr., Richardson, J.L., Patel-Hett, S., Battinelli, E., Zaslavsky, A., Short, S., Ryeom, S., Folkman, J., Klement, G.L., Angiogenesis is regulated by a novel mechanism:

## 6. Referenzen

- Pro- and anti-angiogenic proteins are organized into separate platelet {alpha}-granules and differentially released. *Blood*, 2008, in press.
103. Richardson, J.L., Shivdasani, R.A., Boers, C., Hartwig, J.H., Italiano, J.E., Jr., Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production. *Blood*, 2005. 106(13): 4066-4075.
  104. Lichtman, M.A., Chamberlain, J.K., Simon, W., Santillo, P.A., Parasinusoidal location of megakaryocytes in marrow: a determinant of platelet release. *Am J Hematol*, 1978. 4(4): 303-312.
  105. Becker, R.P., De Bruyn, P.P., The transmural passage of blood cells into myeloid sinusoids and the entry of platelets into the sinusoidal circulation; a scanning electron microscopic investigation. *Am J Anat*, 1976. 145(2): 183-205.
  106. Behnke, O., Forer, A., From megakaryocytes to platelets: platelet morphogenesis takes place in the bloodstream. *Eur J Haematol Suppl*, 1998. 61: 3-23.
  107. Schulze, H., Korpál, M., Hurov, J., Kim, S.W., Zhang, J., Cantley, L.C., Graf, T., Shivdasani, R.A., Characterization of the megakaryocyte demarcation membrane system and its role in thrombopoiesis. *Blood*, 2006. 107(10): 3868-3875.
  108. Zhang, J., Varas, F., Stadtfeld, M., Heck, S., Faust, N., Graf, T., CD41-YFP mice allow in vivo labeling of megakaryocytic cells and reveal a subset of platelets hyperreactive to thrombin stimulation. *Exp Hematol*, 2007. 35(3): 490-499.
  109. Drachman, J.G., Inherited thrombocytopenia: when a low platelet count does not mean ITP. *Blood*, 2004. 103(2): 390-398.
  110. Balduini, C.L., Cattaneo, M., Fabris, F., Gresele, P., Iolascon, A., Pulcinelli, F.M., Savoia, A., Inherited thrombocytopenias: a proposed diagnostic algorithm from the Italian Gruppo di Studio delle Piastrine. *Haematologica*, 2003. 88(5): 582-592.
  111. Noris, P., Pecci, A., Di Bari, F., Di Stazio, M.T., Di Pumpo, M., Ceresa, I.F., Arezzi, N., Ambaglio, C., Savoia, A., Balduini, C.L., Application of a diagnostic algorithm for inherited thrombocytopenias to 46 consecutive patients. *Haematologica*, 2004. 89(10): 1219-1225.
  112. Hall, J.G., Levin, J., Kuhn, J.P., Ottenheimer, E.J., van Berkum, K.A., McKusick, V.A., Thrombocytopenia with absent radius (TAR). *Medicine (Baltimore)*, 1969. 48(6): 411-439.
  113. Hall, J.G., Thrombocytopenia and absent radius (TAR) syndrome. *J Med Genet*, 1987. 24(2): 79-83.
  114. Hedberg, V.A., Lipton, J.M., Thrombocytopenia with absent radii. A review of 100 cases. *Am J Pediatr Hematol Oncol*, 1988. 10(1): 51-64.
  115. Bagby, G.C., Alter, B.P., Fanconi anemia. *Semin Hematol*, 2006. 43(3): 147-156.
  116. Bergmeier, W., Goerge, T., Wang, H.W., Crittenden, J.R., Baldwin, A.C., Cifuni, S.M., Housman, D.E., Graybiel, A.M., Wagner, D.D., Mice lacking the signaling molecule CalDAG-GEFI represent a model for leukocyte adhesion deficiency type III. *J Clin Invest*, 2007. 117(6): 1699-1707.
  117. Li, Q.Y., Newbury-Ecob, R.A., Terrett, J.A., Wilson, D.I., Curtis, A.R., Yi, C.H., Gebuhr, T., Bullen, P.J., Robson, S.C., Strachan, T., Bonnet, D., Lyonnet, S., Young, I.D., Raeburn, J.A., Buckler, A.J., Law, D.J., Brook, J.D., Holt-Oram syndrome is caused by mutations in TBX5, a member of the Brachyury (T) gene family. *Nat Genet*, 1997. 15(1): 21-29.

## 6. Referenzen

118. Basson, C.T., Bachinsky, D.R., Lin, R.C., Levi, T., Elkins, J.A., Soultz, J., Grayzel, D., Kroumpouzou, E., Traill, T.A., Leblanc-Straceski, J., Renault, B., Kucherlapati, R., Seidman, J.G., Seidman, C.E., Mutations in human TBX5 [corrected] cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. *Nat Genet*, 1997. 15(1): 30-35.
119. Thompson, A.A., Nguyen, L.T., Amegakaryocytic thrombocytopenia and radio-ulnar synostosis are associated with HOXA11 mutation. *Nat Genet*, 2000. 26(4): 397-398.
120. Homans, A.C., Cohen, J.L., Mazur, E.M., Defective megakaryocytopoiesis in the syndrome of thrombocytopenia with absent radii. *Br J Haematol*, 1988. 70(2): 205-210.
121. de Alarcon, P.A., Graeve, J.A., Levine, R.F., McDonald, T.P., Beal, D.W., Thrombocytopenia and absent radii syndrome: defective megakaryocytopoiesis-thrombocytopenia. *Am J Pediatr Hematol Oncol*, 1991. 13(1): 77-83.
122. Ballmaier, M., Schulze, H., Cremer, M., Folman, C.C., Strauss, G., Weite, K., Defective c-Mpl signaling in the syndrome of thrombocytopenia with absent radii. *Stem Cells*, 1998. 16 Suppl 2: 177-184.
123. Letestu, R., Vitrat, N., Masse, A., Le Couedic, J.P., Lazar, V., Rameau, P., Wendling, F., Vuillier, J., Boutard, P., Plouvier, E., Plasse, M., Favier, R., Vainchenker, W., Debili, N., Existence of a differentiation blockage at the stage of a megakaryocyte precursor in the thrombocytopenia and absent radii (TAR) syndrome. *Blood*, 2000. 95(5): 1633-1641.
124. Strippoli, P., Savoia, A., Iolascon, A., Tonelli, R., Savino, M., Giordano, P., D'Avanzo, M., Massolo, F., Locatelli, F., Borgna, C., De Mattia, D., Zelante, L., Paolucci, G., Bagnara, G.P., Mutational screening of thrombopoietin receptor gene (c-mpl) in patients with congenital thrombocytopenia and absent radii (TAR). *Br J Haematol*, 1998. 103(2): 311-314.
125. Fleischman, R.A., Letestu, R., Mi, X., Stevens, D., Winters, J., Debili, N., Vainchenker, W., Absence of mutations in the HoxA10, HoxA11 and HoxD11 nucleotide coding sequences in thrombocytopenia with absent radius syndrome. *Br J Haematol*, 2002. 116(2): 367-375.
126. Cremer, M., Dame, C., Schaeffer, H.J., Giers, G., Bartmann, P., Bald, R., Longitudinal thrombopoietin plasma concentrations in fetuses with alloimmune thrombocytopenia treated with intrauterine PLT transfusions. *Transfusion*, 2003. 43(9): 1216-1222.
127. Ashcroft, G.S., Lei, K., Jin, W., Longenecker, G., Kulkarni, A.B., Greenwell-Wild, T., Hale-Donze, H., McGrady, G., Song, X.Y., Wahl, S.M., Secretory leukocyte protease inhibitor mediates non-redundant functions necessary for normal wound healing. *Nat Med*, 2000. 6(10): 1147-1153.
128. Nakamura, M., Masuda, H., Horii, J., Kuma, K., Yokoyama, N., Ohba, T., Nishitani, H., Miyata, T., Tanaka, M., Nishimoto, T., When overexpressed, a novel centrosomal protein, RanBPM, causes ectopic microtubule nucleation similar to gamma-tubulin. *J Cell Biol*, 1998. 143(4): 1041-1052.
129. Nishitani, H., Hirose, E., Uchimura, Y., Nakamura, M., Umeda, M., Nishii, K., Mori, N., Nishimoto, T., Full-sized RanBPM cDNA encodes a protein possessing a long stretch of proline and glutamine within the N-terminal region, comprising a large protein complex. *Gene*, 2001. 272(1-2): 25-33.
130. Emes, R.D., Ponting, C.P., A new sequence motif linking lissencephaly, Treacher Collins and oral-facial-digital type 1 syndromes, microtubule dynamics and cell migration. *Hum Mol Genet*, 2001. 10(24): 2813-2820.

## 6. Referenzen

131. Choi, E.S., Nichol, J.L., Hokom, M.M., Hornkohl, A.C., Hunt, P., Platelets generated in vitro from proplatelet-displaying human megakaryocytes are functional. *Blood*, 1995. 85(2): 402-413.
132. Sumen, C., Mempel, T.R., Mazo, I.B., von Andrian, U.H., Intravital microscopy: visualizing immunity in context. *Immunity*, 2004. 21(3): 315-329.
133. Shivdasani, R., Schulze, H., Culture, Expansion and Differentiation of Murine Megakaryocytes., in *Current Protocols in Immunology*. 2005, John Wiley & Sons, Inc. p. 22F.6.1-22F.6.12.
134. Lecine, P., Villeval, J.L., Vyas, P., Swencki, B., Xu, Y., Shivdasani, R.A., Mice lacking transcription factor NF-E2 provide in vivo validation of the proplatelet model of thrombocytopoiesis and show a platelet production defect that is intrinsic to megakaryocytes. *Blood*, 1998. 92(5): 1608-1616.
135. Sabri, S., Jandrot-Perrus, M., Bertoglio, J., Farndale, R.W., Mas, V.M., Debili, N., Vainchenker, W., Differential regulation of actin stress fiber assembly and proplatelet formation by alpha2beta1 integrin and GPVI in human megakaryocytes. *Blood*, 2004. 104(10): 3117-3125.
136. Larson, M.K., Watson, S.P., A product of their environment: do megakaryocytes rely on extracellular cues for proplatelet formation? *Platelets*, 2006. 17(7): 435-440.
137. Kopp, H.G., Rafii, S., Thrombopoietic cells and the bone marrow vascular niche. *Ann N Y Acad Sci*, 2007. 1106: 175-179.
138. Chen, Z., Naveiras, O., Balduini, A., Mammoto, A., Conti, M.A., Adelstein, R.S., Ingber, D., Daley, G.Q., Shivdasani, R.A., The May-Hegglin anomaly gene MYH9 is a negative regulator of platelet biogenesis modulated by the Rho-ROCK pathway. *Blood*, 2007. 110(1): 171-179.
139. Boztug, K., Baumann, U., Ballmaier, M., Webster, D., Sandrock, I., Jacobs, R., Lion, T., Preuner, S., Germeshausen, M., Hansen, G., Welte, K., Klein, C., Large granular lymphocyte proliferation and revertant mosaicism: two rare events in a Wiskott-Aldrich syndrome patient. *Haematologica*, 2007. 92: ECR18.
140. Ihara, K., Ishii, E., Eguchi, M., Takada, H., Suminoe, A., Good, R.A., Hara, T., Identification of mutations in the c-mpl gene in congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(6): 3132-3136.
141. van den Oudenrijn, S., Bruin, M., Folman, C.C., Peters, M., Faulkner, L.B., de Haas, M., von dem Borne, A.E., Mutations in the thrombopoietin receptor, Mpl, in children with congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Br J Haematol*, 2000. 110(2): 441-448.
142. King, S., Germeshausen, M., Strauss, G., Welte, K., Ballmaier, M., Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia: a retrospective clinical analysis of 20 patients. *Br J Haematol*, 2005. 131(5): 636-644.
143. Germeshausen, M., Ballmaier, M., Welte, K., MPL mutations in 23 patients suffering from congenital amegakaryocytic thrombocytopenia: the type of mutation predicts the course of the disease. *Hum Mutat*, 2006. 27(3): 296.
144. Kuter, D.J., New thrombopoietic growth factors. *Blood*, 2007. 109(11): 4607-4616.
145. Chung, C.D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P., Shuai, K., Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science*, 1997. 278(5344): 1803-1805.
146. Rodel, B., Tavassoli, K., Karsunky, H., Schmidt, T., Bachmann, M., Schaper, F., Heinrich, P., Shuai, K., Elsasser, H.P., Moroy, T., The zinc finger protein Gfi-1 can enhance STAT3 signaling by interacting with the STAT3 inhibitor PIAS3. *EMBO J*, 2000. 19(21): 5845-5855.

## 6. Referenzen

147. Ballmaier, M., Schulze, H., Strauss, G., Cherkaoui, K., Wittner, N., Lynen, S., Wolters, S., Bogenberger, J., Welte, K., Thrombopoietin in patients with congenital thrombocytopenia and absent radii: elevated serum levels, normal receptor expression, but defective reactivity to thrombopoietin. *Blood*, 1997. 90(2): 612-619.
148. Liu, J., DeNofrio, J., Yuan, W., Wang, Z., McFadden, A.W., Parise, L.V., Genetic manipulation of megakaryocytes to study platelet function. *Curr Top Dev Biol*, 2008. 80: 311-335.
149. Tijssen, M.R., van Hennik, P.B., di Summa, F., Zwaginga, J.J., van der Schoot, C.E., Voermans, C., Transplantation of human peripheral blood CD34-positive cells in combination with ex vivo generated megakaryocytes results in fast platelet formation in NOD/SCID mice. *Leukemia*, 2008. 22(1): 203-208.
150. Gavrilovskaya, I.N., Shepley, M., Shaw, R., Ginsberg, M.H., Mackow, E.R., beta3 Integrins mediate the cellular entry of hantaviruses that cause respiratory failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(12): 7074-7079.
151. Garzon, R., Pichiorri, F., Palumbo, T., Iuliano, R., Cimmino, A., Aqeilan, R., Volinia, S., Bhatt, D., Alder, H., Marcucci, G., Calin, G.A., Liu, C.G., Bloomfield, C.D., Andreeff, M., Croce, C.M., MicroRNA fingerprints during human megakaryocytopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(13): 5078-5083.

## ERKLÄRUNG

§4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....

Datum

.....

Unterschrift