

**Biochemische und genetische Charakterisierung der Thrombopoietin-
induzierten Signaltransduktion beim Thrombocytopenia-absent radii-Syndrom**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Janine Fiedler
aus Meerane

Berlin 2012

Die vorliegende Arbeit wurde von Juli 2008 bis Dezember 2011 unter der Leitung von PD Dr. Harald Schulze im Labor für Pädiatrische Molekularbiologie der Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Charité – Universitätsmedizin Berlin angefertigt.

Erstgutachterin: Prof. Dr. Petra Knaus
Zweitgutachter: PD Dr. Harald Schulze

Tag der Disputation: 24.09.2012

„Alles Wissen und alles Vermehren unseres Wissens endet nicht mit einem
Schlusspunkt, sondern mit einem Fragezeichen.“ Hermann Hesse (1877-1962)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer PD Dr. Harald Schulze, der mich sowohl wissenschaftlich als auch menschlich unterstützt hat. Die wissenschaftlichen Freiräume, die Teilnahme an nationalen sowie internationalen Konferenzen und der enge Kontakt zu anderen Wissenschaftlern haben sehr zu meiner persönlichen Entwicklung beigetragen. Die Bearbeitung meiner Dissertation hat mir große Freude bereitet. Vielen dank, für die lehrreiche und besondere Zeit!

Mein herzlichster Dank geht außerdem an meine Arbeitsgruppe. Dr. Kerstin Seidel danke ich für die technische Assistenz und Katja Henning für die Unterstützung bei der Durchflusszytometrie. Darüber hinaus hat die Zusammenarbeit mit Imke Meyer, Silke Schwiebert, Dr. Martin Wannack und Stefan Kunert viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ich danke euch allen von ganzem Herzen für die fachlichen Diskussionen und Gespräche, die ständige Hilfsbereitschaft und das offene Ohr in jeder Lebenslage. Mein Dank gilt außerdem allen Mitarbeitern des Labors für Pädiatrische Molekularbiologie von Prof. Dr. Dr. Christian Hagemeier für die fröhliche und offene Arbeitsatmosphäre.

Frau Dr. Gabriele Strauß danke ich für die kreative und nette Zusammenarbeit, wodurch die Verknüpfung von wissenschaftlicher Forschung und klinischer Relevanz möglich war.

Frau Prof. Heidemarie Neitzel und Traute Burmester möchte ich für die Anfertigung der von Patienten generierten Zelllinien sowie die Bereitstellung der S2-Laboratorien danken. Dr. Eva Klopocki danke ich für die Genomanalysen.

Ich danke allen Kooperationspartnern des globalen RBM8A-SNP-Projekts für die erfolgreiche Zusammenarbeit, insbesondere Dr. Kees Albers und Dirk Paul vom Sanger-Institut in Cambridge für die Sequenzanalysen.

Weiterhin sei DP Dr. Markus Schmutz vom Kinderspital Zürich für die gute Zusammenarbeit gedankt.

Frau Prof. Dr. Petra Knaus danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und die regelmäßige Organisation der „Symposien für externe Doktoranden“, die mir jedes Mal eine große Freude bereitet haben.

Bei allen TAR-Patienten möchte ich mich für die Mithilfe und Offenherzigkeit bedanken.

Imke Meyer und Sarah Kottnik danke ich für die Freundschaft und die kritischen Anmerkungen der vorliegenden Arbeit.

Der Sanitätsrat Dr. Emil Alexander Huebner und Gemahlin-Stiftung danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Ein ganz großer Dank geht an meine Familie, Susanne Otto, Yvonne Thoß und Elke Just und der größte Dank an Mario Habekost, der mich in allen Lebenslagen und zu jeder Zeit unterstützt hat.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Hämatopoese	1
1.2 Megakaryopoese und Thrombopoese	3
1.2.1 Differenzierung der HSC zum Thrombozyt	3
1.2.2 TPO-induzierte Megakaryopoese	5
1.2.2.1 TPO und sein Rezeptor c-Mpl	5
1.2.2.2 TPO-induzierte Signaltransduktion reguliert die Megakaryopoese	7
1.2.3 TPO-unabhängige Regulation der Megakaryopoese und Thrombopoese..	9
1.3 Angeborene Thrombozytopenien	10
1.4 TAR-Syndrom	11
1.4.1 Symptome, Phänotyp und Kenntnisstand.....	11
1.4.2 Genetische Ursachen	12
1.5 Zielsetzung der Arbeit	14
2 Material und Methoden	16
2.1 Material	16
2.1.1 Chemikalien.....	16
2.1.2 Antikörper (Ak).....	17
2.2 Häufig verwendete Puffer	18
2.3 Oligonukleotide der Mikrodeletionsgene	18
2.4 Zellkultur	19
2.4.1 Lymphoblastoide Zelllinien	19
2.4.2 Differenzierung von HSCs zu Megakaryozyten	20
2.5 Biochemische Untersuchungen	20
2.5.1 Analyse der TPO-induzierten Signaltransduktion	20
2.5.1.1 Probenaufbereitung: Isolation und Stimulation der Thrombozyten	20
2.5.1.2 Phosphorylierungsstudien der Signalmoleküle – Immunblot	22
2.5.1.3 <i>Electrophoretic mobility shift Assay</i> (EMSA).....	25
2.5.2 <i>Enzyme linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA)	27
2.6 Molekularbiologische Arbeiten	28
2.6.1 DNA-Isolation aus mononukleären Zellen	28

2.6.2 RNA-Isolation	29
2.6.3 Reverse Transkription der RNA in cDNA.....	29
2.6.4 Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR	30
2.6.4.1 Kinetik der qRT-PCR und Bestimmung des C _T -Werts.....	30
2.6.4.2 Reaktionsbedingungen der qRT-PCR	31
2.6.4.3 Bestimmung der Amplifikationseffizienz	32
2.6.4.4 Relative Quantifizierung mittels C _T -Methode	32
2.7 Durchflusszytometrie.....	34
2.8 Densitometrie	34
2.9 Statistische Auswertungen	34
3 Ergebnisse	35
3.1 Zeitliche Verläufe der Thrombozytenwerte bei TAR-Patienten	35
3.2 Zwei Muster TPO-induzierter Signaltransduktion in Thrombozyten von TAR-Patienten	37
3.2.1 Keine TPO-induzierte Phosphorylierung von Jak2 in Thrombozyten von TAR-Patienten unter 18 Jahren.....	37
3.2.2 Gestörter Jak/STAT-Signalweg bei TAR-Patienten mit Muster #1	41
3.2.3 Jak2 ist die Schlüsselkinase der TPO-abhängigen Signalweiterleitung....	45
3.2.4 Thrombozyten von TAR-Patienten mit Muster #1 weisen leicht reduziertes c-Mpl auf.....	48
3.3 Der prozentuale Anteil unreifer Thrombozyten (IPF%) ist bei TAR- Patienten mit Muster #2 nicht erhöht.....	50
3.4 Normale Plasmaspiegel von SDF-1 und FGF-4 bei TAR-Patienten.....	51
3.5 Beitrag der Mikrodeletion zur Thrombozytopenie im TAR-Syndrom.....	52
3.5.1 Unauffällige TPO-induzierte Signaltransduktion in Thrombozyten von Eltern mit und ohne Mikrodeletion	52
3.5.2 Unauffällige mRNA-Expression der Mikrodeletionsgene in LCLs	53
3.5.3 Hämojuvelin-Nachweis in Thrombozyten von TAR-Patienten	56
3.5.4 PIAS3-Nachweis in Thrombozyten von TAR-Patienten.....	58
3.6 „Modifier of TAR“ – Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) in RBM8A.....	60
3.6.1 SNP in RBM8A	60
3.6.2 <i>Ecotropic viral insertion-1</i> (Evi-1) bindet an RBM8A-Sequenz mit 5'-UTR-SNP	61
3.6.3 In Thrombozyten von TAR-Patienten wird eine reduzierte Proteinmenge von Y14 detektiert.....	63

4 Diskussion	65
4.1 Periphere Blutwerte der TAR-Patienten	66
4.2 Kopplung zwischen TPO-induzierter Signaltransduktion und Thrombozytenbiogenese	67
4.2.1 Zwei Muster TPO-induzierter Jak/STAT-Signaltransduktion in TAR- Patienten	68
4.2.2 Jak2 ist die Schlüsselkinase der TPO-induzierten Signaltransduktion	71
4.2.3 Trotz TPO-induzierter Signaltransduktion haben Patienten mit Muster #2 keine normalen Thrombozytenzahlen.....	72
4.2.4 TPO-Rezeptor c-Mpl.....	73
4.2.5 TPO-Reaktivität in Thrombozyten als Surrogat für das Maß der Megakaryopoese	74
4.2.6 TPO-unabhängige Thrombozytenbiogenese	75
4.3 Funktionsdefekt der Thrombozyten von TAR-Patienten	75
4.4 Mausmodelle für das TAR-Syndrom	78
4.5 Genetische Aspekte des TAR-Syndroms	80
4.5.1 Analyse von PIAS3 und Hämojuvelin in Thrombozyten.....	82
4.5.2 Analyse der Mikrodeletionsgene in LCLs	84
4.5.3 „ <i>Modifier of TAR</i> “ – SNP in RBM8A.....	85
4.6 Ausblick	89
5 Zusammenfassung	91
6 Abstract	93
7 Anhang – Charakteristika der TAR-Patienten und Übersicht der Phosphorylierungs- und SNP-Studien	95
8 Literaturverzeichnis	96
Eidesstattliche Erklärung	VIII
Lebenslauf	IX
Publikationen	X

Abkürzungsverzeichnis

Dieses Verzeichnis enthält keine Einheiten des internationalen Einheitensystems. Sekunden und Minuten werden im Text mit „sek“ bzw. „min“ abgekürzt. Außerdem werden die im Fachgebiet gebräuchlichen Abkürzungen nicht abgebildet. Im Text wird der Plural mit einem angehängten „s“ gekennzeichnet.

Die Nomenklaturen zur Protein- und Genangabe sind widersprüchlich. In dieser Arbeit wird eine gemischte Nomenklatur verwendet, Gene werden immer in Großbuchstaben angegeben. Aus dem Zusammenhang geht eindeutig hervor, ob das Protein oder das Gen gemeint ist.

-/-	<i>knockout</i>
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
ANKRD34	<i>Ankyrin repeat domain 34</i>
ANKRD35	<i>Ankyrin repeat domain 35</i>
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
BMFS	<i>Bone marrow failure</i> -Syndrom
BSA	fetales/bovines-Serum
bzw.	beziehungsweise
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CXCR4	<i>CXC-receptor 4</i>
d. h.	das heißt
del-Träger	Elternteil mit Mikrodeletion
ELISA	<i>Enzyme linked Immunosorbent Assay</i>
EMSA	<i>Electrophoretic mobility shift Assay</i>
EPO	Erythropoietin
Evi-1	<i>Ecotropic viral insertion-1</i>
FGF-4	<i>Fibroblast growth factor-4</i>
HFE2	<i>Hemochromatosis type 2 (juvenile)</i>
hNUDC	humanes <i>fungus nuclear migration</i> Protein
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
HTP	Hepes Tyrodes-Puffer
IDV	<i>Integrated density value</i>

IL	Interleukin
ITGA10	<i>Integrin alpha 10</i>
IPF%	prozentualer Anteil unreifer Thrombozyten
Jak	Januskinase
Jak2 inh.	<i>Jak2-Inhibitor</i>
LCL	lymphoblastoide Zelllinie
LT-HSC	<i>Long-term</i> Hämatopoetische Stammzelle
MK	Megakaryozyt
NUDT17	<i>nucleoside diphosphate linked moiety X type motif 17</i>
PI3K	<i>Phosphoinositol-3-Kinase</i>
PIAS3	<i>Protein inhibitor of activated STAT3</i>
p (pJak2)	phosphoryliert (phosphoryliertes Jak2)
PRP	plättchenreiches Plasma
qRT-PCR	quantitative <i>Real Time</i> -PCR
RBM8A	<i>RNA binding motif protein 8A</i>
rhTPO	rekombinantes humanes Thrombopoietin
RT	Raumtemperatur
SDF-1	<i>Stromal cell-derived factor-1</i>
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
ST-HSC	<i>Short-term</i> Hämatopoetische Stammzelle
TAR-Syndrom	<i>Thrombocytopenia-absent radii</i> -Syndrom
TF	Transkriptionsfaktor
TPO	Thrombopoietin
TRAP6	Thrombinrezeptor-Agonist-Peptid 6
TXNIP	<i>Thioredoxin interacting protein</i>
UTR	untranslatierter Bereich
vWFR	von-Willebrand-Faktor-Rezeptor (CD42)
z. B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Hämatopoese

Die Entstehung und Reifung der Blutzellen aus hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) bezeichnet man als Hämatopoese. Diese erfolgt im Kindesalter im Knochenmark des gesamten Skelettsystems. Die Blutbildung Erwachsener hingegen ist größtenteils auf flache Knochen, wie zum Beispiel (z. B.) Schädel, Becken und Wirbelkörper begrenzt. Da die Blutzellen nur eine begrenzte Lebensdauer haben, müssen sie kontinuierlich neu gebildet werden. Daher zeichnen sich die Vorläuferzellen durch eine sehr hohe Proliferationsrate aus.

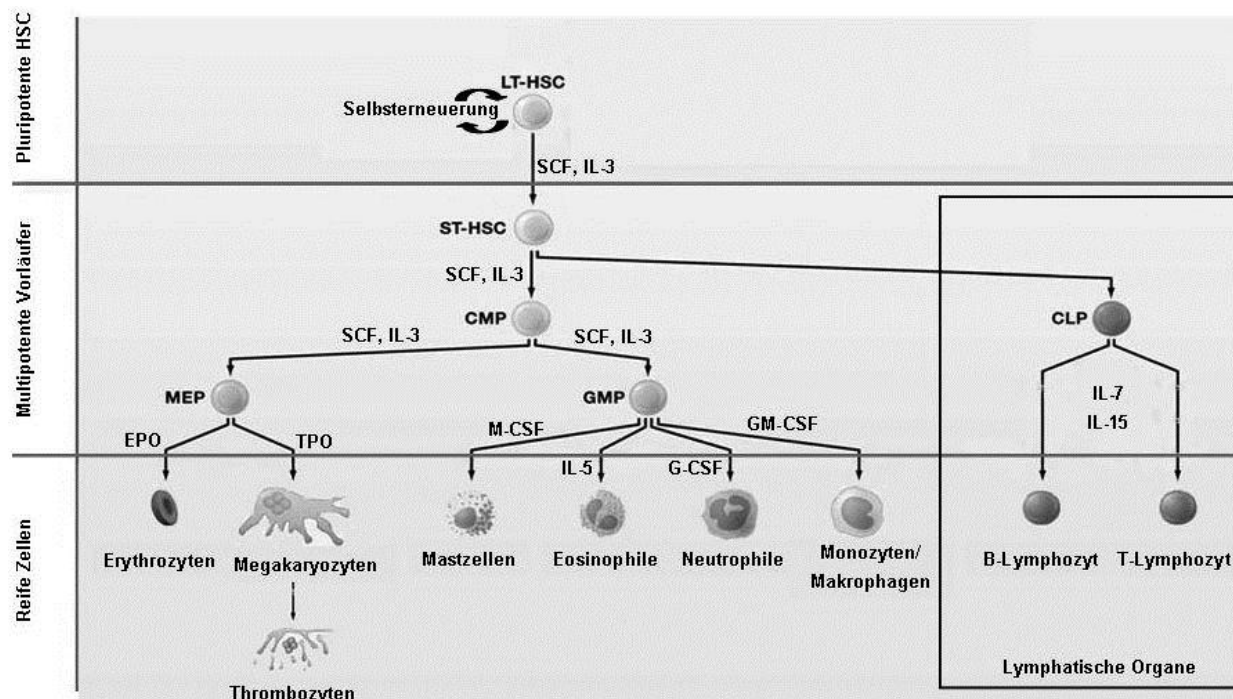


Abb. 1: Modell der Hämatopoese. Aus pluripotenten **LT-HSCs** entwickeln sich über multipotente **ST-HSCs**, gemeinsame myeloide Vorläufer (**CMP**), gemeinsame lymphoide Vorläufer (**CLP**), Megakaryozyten-Erythrozyten-Vorläufer (**MEP**) und Granulozyten-Monozyten-Vorläufer (**GMP**) alle reifen Blutzellen. Die Blutbildung erfolgt überwiegend im Knochenmark. Lymphozyten entwickeln sich hingegen in den peripheren lymphatischen Organen. Die Differenzierung unterliegt dem Einfluss von Zytokinen. In der Abbildung sind nur einige sehr wichtige auf die Hämatopoese wirkende Zytokine dargestellt: *Stem-cell-factor* (**SCF**), Interleukin-3,5,7,15 (**IL-3,5,7,15**), Erythropoietin (**EPO**), Thrombopoietin (**TPO**), *Macrophage-colony-stimulating-factor* (**M-CSF**), *Granulocyte-colony-stimulating-factor* (**G-CSF**), *Granulocyte-Macrophage-colony-stimulating-factor* (**GM-CSF**). Abb. nach [1].

Alle Blutzellen entstehen aus einer kleinen Population pluripotenter, so genannter *Long-term-HSCs* (LT-HSCs) (Abb. 1) [2, 3]. Diese Zellen befinden sich vorwiegend in der G_0 -Phase des Zellzyklus, weshalb sie sich sehr selten teilen [4]. Mit dem Eintritt einer LT-HSC in die G_1 -Phase entstehen eine LT-HSC und eine, zur weiteren Differenzierung bestimmte, unreife multipotente *Short-term-HSC* (ST-HSC). Letztere besitzt nicht mehr die Fähigkeit zur Selbsterneuerung. Aus dieser entstehen Vorläuferzellen der lymphoiden und der myeloiden Reihe. Der gemeinsame lymphoide Vorläufer differenziert sich zu B- und T-Lymphozyten, deren Aufgabe die Vermittlung der spezifischen Immunantwort ist. Der myeloide Vorläufer kann sich zum Granulozyten-Monozyten-Vorläufer entwickeln, zu Monozyten und Granulozyten differenzieren und die unspezifische Immunabwehr vermitteln. Aus dem myeloiden Vorläufer kann auch der Megakaryozyten-Erythrozyten-Vorläufer hervorgehen. Dieser entwickelt sich zu den Erythrozyten, die den Gastransport gewähren, sowie den Megakaryozyten (MKs), die sich weiter zu Thrombozyten differenzieren und an der Hämostase beteiligt sind.

Bei der Ausdifferenzierung der Blutzellen spielt die so genannte Stammzellnische, in der die HSCs eingebettet sind, eine entscheidende Rolle. Die Nische besteht aus der extrazellulären Matrix und den Stromazellen, jedoch ist die genaue zelluläre und molekulare Zusammensetzung bislang noch unzureichend aufgeklärt. An der Differenzierung von HSCs sind Kontakte zur extrazellulären Matrix, Zell-Zell-Kontakte und Zytokine aus den Stromazellen maßgeblich beteiligt. Man unterscheidet zwischen frühen, pleiotropen Zytokinen, wie dem *Stem-cell-factor* und Interleukin (IL)-3, die HSCs zum Megakaryozyten-Erythrozyten- und Granulozyten-Monozyten-Vorläufer differenzieren, und linienspezifischen Faktoren wie Erythropoietin (EPO), Thrombopoietin (TPO), *Granulocyte-colony-stimulating-factor*, IL-7 und IL-15. Die Zytokine regulieren die Hämatopoese, indem sie die Aktivierung diverser Transkriptionsfaktoren (TF) induzieren, die wiederum Gene zur Differenzierung der Blutzellen transkribieren.

1.2 Megakaryopoese und Thrombopoese

1.2.1 Differenzierung der HSC zum Thrombozyt

Die Gesamtheit der Proliferations- und Differenzierungsschritte von der HSC zum reifen MK bezeichnet man als Megakaryopoese. Dieser Prozess wird hauptsächlich durch TPO reguliert [5]. Im Gegensatz zur HSC, dem gemeinsamen myeloiden Vorläufer und dem Megakaryozyten-Erythrozyten-Vorläufer lassen sich die direkten MK-Vorläufer und der MK bezüglich ihrer Morphologie, der histochemischen Farbeigenschaften (Wright-Giemsa-Färbung), der Polyploidität und der immunphänotypischen Oberflächenmerkmale *Cluster of differentiation (CD)* unterscheiden (Abb.2).

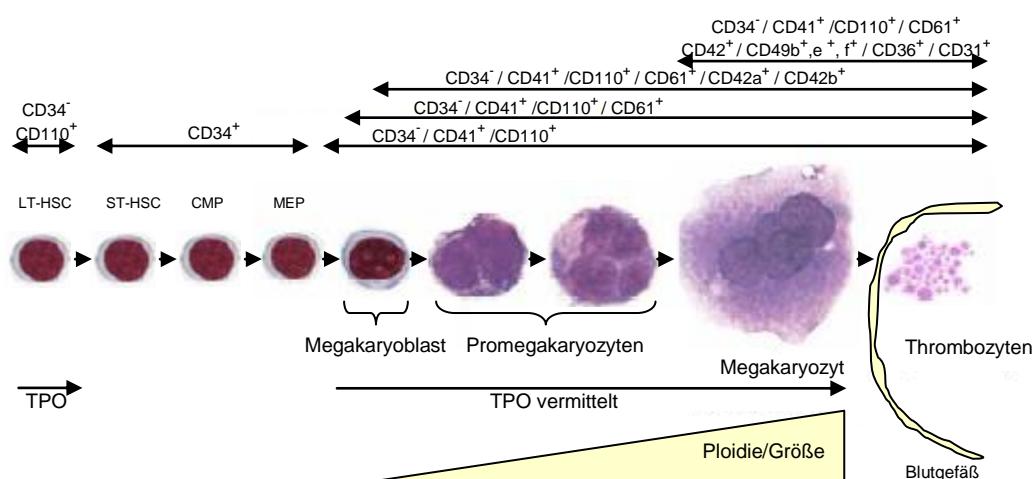


Abb. 2: Megakaryopoese und Thrombopoese. Aus der pluripotenten Stammzelle (LT-HSC) entwickelt sich die ST-HSC, die sich über den gemeinsamen myeloiden Vorläufer (CMP) zum Megakaryozyten-Erythrozyten-Vorläufer (MEP) differenziert. Aus diesem entstehen die MK-Vorläufer Megakaryoblast und Promegakaryozyt. Die TPO-vermittelte MK-Entwicklung geht mit der Zunahme des Ploidiegehalts und der Zellgröße einher. Der reife Megakaryozyt schnürt TPO-unabhängig Thrombozyten in den Blutstrom ab. Die CDs jeder Entwicklungsstufe sind angegeben (Abb. der MK-Reifestadien aus [6]).

In einem sehr frühen Entwicklungsstadium exprimiert der **Megakaryoblast** auf der Zelloberfläche die linienspezifischen MK-Marker CD41 und den Thrombopoietin-Rezeptor c-Mpl (CD110) [7]. Zeitlich versetzt werden CD61 und die zwei Untereinheiten des von-Willebrand-Faktor-Rezeptors (vWFR) CD42a und CD42b auf diesem präsentiert [8]. Der Megakaryoblast hat viele Ribosomen für eine intensive Proteinbiosynthese und ist daher basophil anfärbbar. Die Zellgröße nimmt durch den

verdoppelten Chromosomensatz (4N) zu. Dieser entsteht durch Endomitose, da während der Mitose die Anaphase II, die Telophase und die Zytokinese übersprungen werden und die Zellen nach der Anaphase I wieder in die G1-Phase des Zellzyklus übergehen.

Der **Promegakaryozyt** zeichnet sich infolge weiterer Endomitosen durch die Zunahme des Chromosomensatzes (16N) und die Reifung des Zytoplasmas aus. Durch die vermehrte Anzahl an Granula lässt sich der Promegakaryozyt azurophil anfärben. Aus den MKs entwickeln sich die kernlosen Thrombozyten. Diese enthalten nur residuale RNA-Mengen und in ihnen findet keine signifikante Neusynthese von Proteinen statt. Nahezu alle benötigten Proteine des späteren Thrombozyten werden während der MK-Entwicklung gebildet und in Granula gespeichert [9]. Man unterscheidet zwischen den häufigen α -Granula, elektronendichten Granula (δ -Granula) und Lysosomen (λ -Granula). α -Granula enthalten im Wesentlichen Proteine der Plättchenadhäsion (vWFR, Fibronectin, Chemokine wie z. B. Plättchen-Faktor-4), Gerinnungsfaktoren (Fibrinogen wird aus dem Blutplasma aufgenommen), Wachstumsfaktoren (*Platelet-derived growth factors*) und proangiogenetische Faktoren (Thromboglobulin). Die Membran der α -Granula weist P-Selectin (CD62P) auf. Es gelangt nach der Aktivierung von Thrombozyten durch Granula-Exocytose auf die Oberfläche und dient somit als Aktivierungsmarker. In den elektronendichten Granula sind Serotonin, Adrenalin, Calcium, Magnesium und Nukleotide wie ADP, ATP, GDP und GTP enthalten [10]. Lysosomale Granula beinhalten Hydrolasen und Cathepsine. Die Membran der λ -Granula weist den Aktivierungsmarker CD63 auf (Kapitel 4.3).

Der reife **Megakaryozyt** hat einen großen und gelappten Zellkern mit einem Chromosomensatz bis zu 128N, jedoch weist der Großteil der Zellen einen 16N bis 32N Chromosomensatz auf. Dadurch ist der MK mit circa 50-80 μm die größte Zelle des Knochenmarks. Durch die vielen Granula und kaum noch vorhandene Ribosomen ist der MK azidophil anfärbbar. Er exprimiert neben den oben genannten MK-spezifischen Rezeptoren den kompletten CD42-Komplex, den Kollagenrezeptor (CD29/CD49b), den Fibronectinrezeptor (CD29/CD49e), den Lamininrezeptor (CD29/CD49f) sowie CD36 und CD31 auf seiner Zellmembran.

Fibroblast growth factor-4 (FGF-4) und *Stromal cell-derived factor-1* (SDF-1) fördern die Migration der MKs aus der Stammzellnische an die Knochenmarksinsuloide (Kapitel 1.2.3). Dort findet der terminale Differenzierungsschritt, die so genannte Thrombopoese statt. Dabei entstehen aus dem kompletten Zytoplasma eines Megakaryozyten bis zu 1000 Thrombozyten, die in den Blutstrom abgegeben werden. Dazu bildet der ausgereifte MK mit Mikrotubulifilamenten ausgekleidete *Proplättchen*. An den Enden dieser Strukturen formen sich durch die Aufwicklung polymerisierter Mikrotubulifilamente tränenförmige Strukturen aus und bilden das *marginal band*. Dieses gibt den abgeschnürten Thrombozyten die charakteristische diskoide Form [11]. Die Thrombopoese erfolgt unabhängig von TPO.

Mit einer Größe von circa zwei bis vier μm sind die Thrombozyten die kleinsten zellulären Bestandteile des Blutes. Das ausgeprägte Membransystem, wozu das *Open canalicular system* und das *Dense tubular system* zählen, ist eine Besonderheit der Thrombozyten. Ersteres dient der Kommunikation mit dem Extrazellulärraum. Das *Dense tubular system* ist ein Calciumspeicher. Thrombozyten haben eine Lebensdauer von circa zehn Tagen und deren Aufgabe ist der Verschluss verletzter Gefäße (Hämostase). Darüber hinaus haben sie eine untergeordnete Funktion in der bisher noch wenig erforschten Immunantwort durch die Interaktion mit eingedrungenen Bakterien, Viren, Pilzen oder Parasiten [12].

1.2.2 TPO-induzierte Megakaryopoese

1.2.2.1 TPO und sein Rezeptor c-Mpl

TPO wurde 1994 von fünf unabhängigen Arbeitsgruppen als spezifischer Wachstumsfaktor für die Ausreifung von MKs identifiziert [13-17]. Das kodierende Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 3 lokalisiert und besitzt fünf kodierende Exons [18]. TPO ist aus 332 Aminosäuren (AS) aufgebaut und weist starke Glykosylierungen auf. Mit seinen 70 kDa (abhängig vom Glykosylierungsgrad) ist es im Vergleich zu anderen Zytokinen relativ groß. Im Protein können zwei Domänen unterschieden werden. Die aminoterminal Domäne besteht aus 135 AS, hat eine hohe Homologie zu EPO und enthält zwei Bindungsstellen für seinen Rezeptor. Die kohlenhydratreiche carboxyterminale Domäne verleiht TPO eine erhöhte Halbwertszeit von 20 bis 30 Stunden, beeinflusst die Affinität zum Rezeptor und wird für den Sekretionsprozess aus der Leber benötigt. Dort findet überwiegend

konstitutiv die Bildung von TPO statt. Darüber hinaus wird es in geringeren Mengen auch in der Niere, den glatten Gefäßmuskelzellen, den Stromazellen des Knochenmarks und der Milz produziert. Der Plasmaspiegel wird über die Anzahl der verfügbaren TPO-Rezeptoren c-Mpl und somit über die Anzahl der Thrombozyten und MKs reguliert. Sind durch einen Blutverlust wenige Thrombozyten im peripheren Blut, kann weniger TPO an c-Mpl binden, wodurch sich der Plasmaspiegel erhöht. Dann diffundiert es vermehrt ins Knochenmark und stimuliert die Proliferation von HSCs, was in gesteigerter Megakaryopoese und Thrombopoese resultiert [19].

Vigon *et al.* klonierten 1992 den TPO-Rezeptor c-Mpl [20]. Dieser ist auf LT-HSCs, MK-Vorläufern, reifen MKs sowie Thrombozyten exprimiert [8, 21]. Das Gen des Rezeptors ist auf Chromosom 1 lokalisiert und hat zwölf Exons [22]. Es sind mindestens vier Splicevarianten beschrieben [20, 23-25]. Das überwiegend vorliegende Vollängentranskript (Mpl-P) wird im Folgenden näher charakterisiert. Dessen Molekulargewicht beträgt 71 kDa. Der glykosylierte TPO-Rezeptor hat keine intrinsische Kinaseaktivität und weist eine strukturelle Homologie zum EPO-Rezeptor auf. c-Mpl ist ein so genannter *single chain*-Rezeptor und besteht aus einer einzigen transmembranen Polypeptidkette. Der 466 AS umfassende extrazytoplasmatische Bereich ist aus zwei gleichgroßen *Cytokine-receptor-homology*-Domänen aufgebaut. Vom aminoterminalen Ende ausgehend sind vier konservierte Cysteinreste, eine 41 AS große Insertsequenz, zwei Fibronectin Typ III-Domänen mit jeweils sieben antiparallelen β -Strängen sowie ein WSXWS-Motiv in jeder Domäne enthalten. Letzteres ist in vielen Wachstumsfaktorrezeptoren nachgewiesen und dient nicht wie bisher angenommen der Interaktion mit dem Liganden, sondern stabilisiert die Bindung zwischen Rezeptor und Ligand [26, 27]. Mittels der AS 235 und 239 der aminoterminalen *Cytokine-receptor-homology*-Domäne erfolgt die Interaktion mit TPO, die Rezeptoraktivierung wird durch die carboxyterminale *Cytokine-receptor-homology*-Domäne vermittelt [27]. Der transmembrane Bereich des Rezeptors besteht aus 22 AS. Der zytoplasmatische Bereich weist einen hohen Anteil an Prolin und Serin auf. Es sind mindestens vier Domänen beschrieben. Eine Mutation in Y₄₉₆RRL verursacht eine verlangsamte Rezeptorinternalisation und keinen Abbau des aufgenommenen TPO-c-Mpl-Komplexes in den Lysosomen. Die Domäne Y₅₆₆RRL ist unerlässlich für die Clathrin-abhängige Rezeptorinternalisation [28]. Weiterhin sind die bei Zytokinrezeptoren weit verbreiteten *Box-1* und *Box-2* Domänen vorhanden. Es wird vermutet, dass an die Box-1 Domäne die Januskinase 2 bindet [29].

1.2.2.2 TPO-induzierte Signaltransduktion reguliert die Megakaryopoese

c-Mpl verändert seine Konformation, wenn TPO am Rezeptor bindet [30]. Dadurch gelangt dieser in räumliche Nähe eines weiteren c-Mpl und ein Komplex aus zwei Rezeptoren und einem Molekül TPO liegt vor. Diese Konstellation begünstigt die Trans- bzw. Autophosphorylierung der Tyrosinreste von Januskinasen (Jaks), die am zytoplasmatischen Bereich von c-Mpl gebunden sind. Dadurch wird die TPO-induzierte Signaltransduktion initiiert [31].

Jak1, Jak2, Jak3 und Tyk2 bilden die Jak-Familie, wobei in Megakaryozyten nur Jak2 und Tyk2 exprimiert und aktiviert werden. Die TPO-induzierte Signaltransduktion benötigt funktionelles Jak2, Tyk2 hingegen ist nicht notwendig [32].

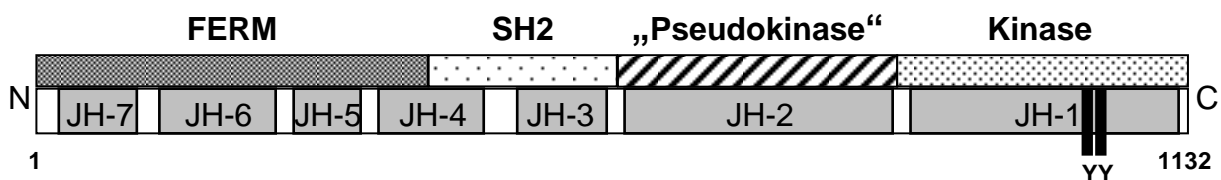


Abb. 3: Domänenstruktur der Jaks. Die Proteinstruktur der Jaks setzt sich aus sieben Janus-Homologie-Domänen (JH-1 bis JH-7) zusammen. Am carboxyterminalen Ende befindet sich die Kinase-Domäne (JH-1) mit der phosphorylierbaren Aktivierungsschleife (YY), gefolgt von der „Pseudokinase“-Domäne (JH-2), der *Src homology2*-Domäne (SH2, JH-3 und JH-4) und am aminoterminalen Ende die FERM-Domäne (JH-4 bis JH-7). Die Abbildung zeigt die AS 1 bis 1132 von Jak2.

Die Januskinasen sind 110 bis 140 kDa groß und weisen sieben hoch konservierte Janus-Homologie-Domänen auf (Abb. 3) [33]. Die Kinase-Domäne JH-1 hat eine Aktivierungsschleife an den Tyrosinresten Y1007 und Y1008 bei Jak2 und Y1054 und Y1055 bei Tyk2. Deren Phosphorylierung verleiht den Jaks die volle Kinaseaktivität [31]. Die „Pseudokinase“-Domäne JH-2 weist eine katalytische Aktivität auf, die zur negativen Regulation der Kinase-Domäne beiträgt [34, 35]. Der aminoterminalen Bereich (JH-3 bis JH-7) mit der *Src homology2*-Domäne und der FERM-Domäne ist an der Rezeptorbindung beteiligt.

Aktiviertes Jak2 überträgt Phosphat von ATP auf die Tyrosinreste von c-Mpl. Der aktivierte TPO-Rezeptor initiiert mindestens drei Signalwege: den *Jak/Signal transducer and activator of transcription* (STAT)-, den Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K)/Akt- und den Raf/Erk-Signalweg. Folgend wird ein vereinfachter Überblick über die innerhalb von Minuten einsetzende TPO-vermittelte Signaltransduktion gegeben (Abb.4) [36-38]:

- 1) Jak/STAT-Signalweg: Aktivierte STAT-Moleküle dimerisieren mittels der *Src homology2*-Domäne miteinander und wirken als TF, insbesondere das STAT3-Dimer, für Gene der Zellproliferation und -differenzierung [39, 40].
- 2) PI3K/Akt-Signalweg: Phosphorylierte PI3K aktiviert Akt. Dieses Molekül hat viele Substrate mit unterschiedlicher Wirkung, z. B. inhibiert die Interaktion mit Bax Apoptoseprozesse und die aktivierte S6K fördert die Proteintranslation. Der Abbau von FoxO begünstigt Endomitoseprozesse in MKs und HoxB4 dient dem Erhalt und der Proliferation von HSC [41].
- 3) Raf/Erk-Signalweg: Aktiviertes Ras induziert TFs zur Aktivierung von Genen für die Zellproliferation.

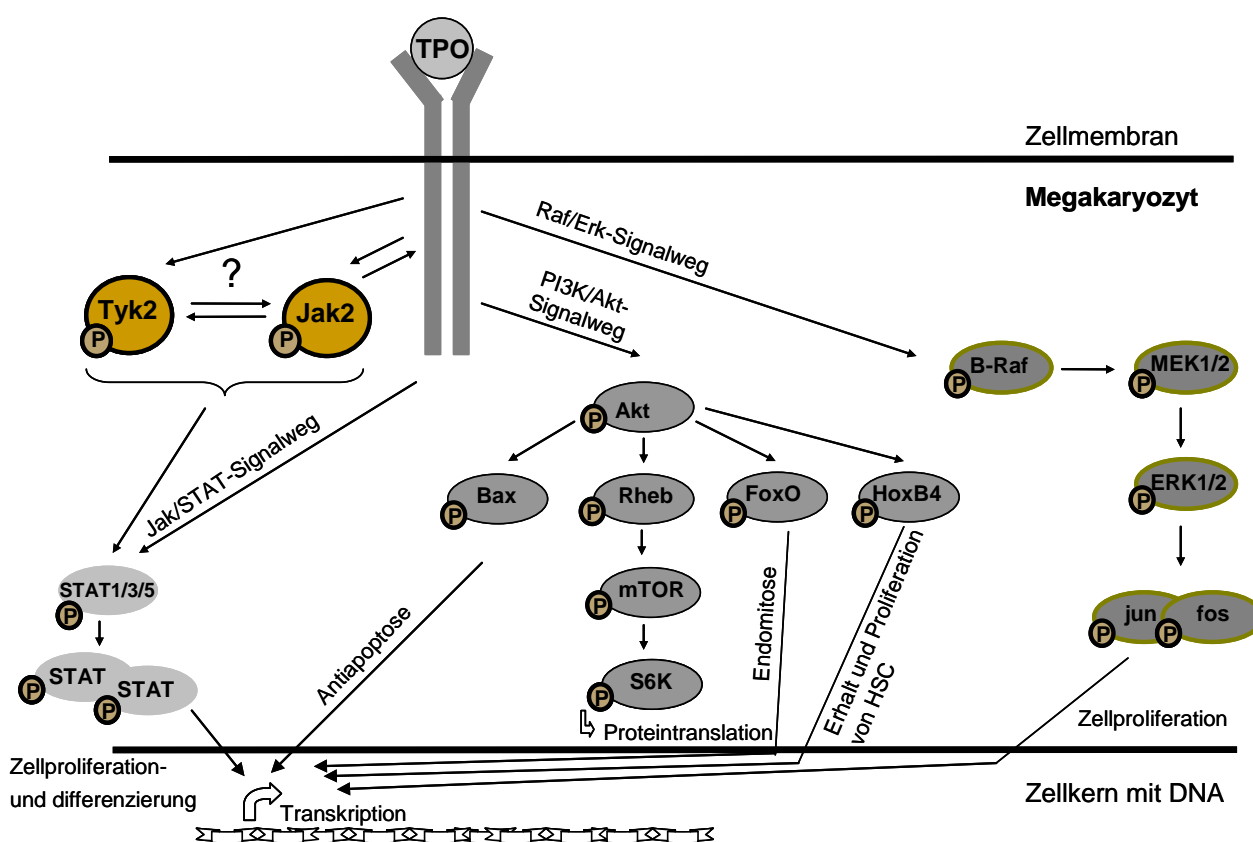


Abb. 4: Überblick der TPO-induzierten Signaltransduktion. Bindet TPO an c-Mpl wird Jak2 phosphoryliert und die TPO-induzierte Signaltransduktion initiiert. Tyk2 kann ebenfalls TPO-abhängig aktiviert werden. Der JAK-STAT-Signalweg induziert die Transkription differenzierungs- und proliferationspezifischer Gene. Akt im PI3K-Signalweg hat Substrate mit unterschiedlicher Wirkung: aktiviertes Bax inhibiert Apoptoseprozesse, pS6K fördert Proteintranslation, der Abbau von FoxO begünstigt Endomitoseprozesse und aktiviertes HoxB4 dient dem Erhalt und der Proliferation von HSC. Der Raf/Erk-Signalweg induziert über B-Raf, MEK1/2, ERK1/2, jun und fos Gene der Zellproliferation.

Es gibt weitere TPO-induzierte Signalwege, wie z. B. die zur Zellproliferation beitragende serinphosphorylierte Proteinkinase C [42]. Diese sind nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit und werden hier nicht erläutert. Die beschriebenen Signalwege sind stark miteinander vernetzt, noch lange nicht vollkommen verstanden

und deswegen Gegenstand aktueller Forschungen vieler Arbeitsgruppen. Die TPO-induzierten Signalwege werden in HSCs, MKs und deren Vorläufern, sowie auch in den kernlosen Thrombozyten aktiviert [40, 43].

Die permanente Proliferation der Thrombozyten kann durch Rückkopplungsmechanismen vermieden werden. Dazu hemmen unter anderem *Suppressor of cytokine signaling*-Proteine phosphorylierte Jaks [44]. Protein-Tyrosinphosphatasen (z. B. SHP2, PTP1B, CD45 und SHP1) dephosphorylieren tyrosinphosphorylierte Proteine und c-Mpl [45-48]. Ebenso tragen negative Regulatoren wie *Focal adhesion kinase*, Adaptorprotein Lnk, die Tyrosinkinase Lyn und der *Protein inhibitor of activated STAT3* (PIAS3) zur Unterdrückung TPO-induzierter Signaltransduktion bei [49-52]. c-Mpl-Internalisierung und -degradierung sind die effektivsten Kontrollmechanismen, da die schnell vermittelte Regulation ohne Proteinexpression verläuft [28].

Die TPO-induzierten Signalwege sind hochsensitive komplexe Vorgänge in Zellen. Bei einigen Erkrankungen tragen Defekte der Signaltransduktion zur Produktionsstörung von Thrombozyten bei (Kapitel 1.3).

1.2.3 TPO-unabhängige Regulation der Megakaryopoese und Thrombopoese

TPO *knockout* ($^{-/-}$)- und c-Mpl $^{-/-}$ -Mäuse sind lebensfähig trotz der reduzierten Anzahl an MKs (30%), einem geringeren MK-Ploidielevel und nur 10-15% der normalen Thrombozytenzahl [53-56]. Die gebildeten Thrombozyten sind morphologisch unauffällig und funktionell. Dies deutet darauf hin, dass an der Megakaryopoese auch TPO-unabhängige Mechanismen beteiligt sind [57]. IL-3, IL-6, IL-11 und *Leukemia inhibitory factor* können zur Entstehung von Thrombozyten beitragen. Diese Zytokine induzieren aber in c-Mpl $^{-/-}$ -Mäusen keine weitere Thrombozytenbiogenese [58, 59]. Im Gegensatz dazu zeigen mit 5-Fluorouracil behandelte c-Mpl $^{-/-}$ -Mäuse, einhergehend mit einem erhöhten SDF-1 Plasmaspiegel, temporär Thrombozytenzahlen im Normbereich [60, 61]. SDF-1 und FGF-4 vermitteln die Migration von MKs aus der Stammzellnische zur Blutbahn, deren Reifung sowie die Abschnürung der Thrombozyten [62]. Die Applikation beider Zytokine in TPO $^{-/-}$ - und c-Mpl $^{-/-}$ -Mäusen resultiert in einem temporären Anstieg der Thrombozytenzahlen [61]. Der Rezeptor von SDF-1, *CXC-receptor 4* (CXCR4), ist

auf MKs hoch exprimiert. Die umgebenden Stromazellen tragen ebenfalls zur MK-Reifung bei, da zerstörtes Mikromilieu die Megakaryopoese inhibiert. Es wird angenommen, dass SDF-1, FGF-4 sowie das umgebende Mikromilieu vorwiegend die Reifung von MKs und TPO die Zellzahl reguliert [57].

Neben TPO sind mindestens zwei weitere Liganden von c-Mpl bekannt: humanes *fungal nuclear migration* Protein (hNUDC) und Tensin [63, 64]. Alle drei Liganden wirken über ähnliche Signaltransduktionskaskaden (Kapitel 1.2.2.2) [65, 66]. Die Herunterregulation des uncharakterisierten Proteins Tensin in der Zelllinie UT7-TPO führt zur Inhibition der Signaltransduktion [64]. Der c-Mpl Ligand hNUDC induziert in hämatopoetischen CD34⁺ Zellen die MK-Entwicklung. Die Applikation von hNUDC in Mäusen führt zu einer erhöhten Anzahl zirkulierender Thrombozyten [67]. TPO wirkt auf frühe, hNUDC auf spätere Stadien der MK-Entwicklung ein [27].

1.3 Angeborene Thrombozytopenien

Angeborene *Bone marrow failure*-Syndrome (BMFSs) sind seltene Erkrankungen und zeichnen sich durch ein zunehmendes Knochenmarkversagen aus. BMFSs unterteilen sich in Panzytopenien, bei denen alle drei Zellreihen der Blutbildung betroffen sind, und Zytopenien mit nur einer betroffenen Zellreihe [68]. Liegt ein Mangel von Thrombozyten vor, spricht man allgemein von einer Thrombozytopenie. Die normalen Thrombozytenwerte von Erwachsenen liegen zwischen 150 bis 400 Thrombozyten/nL, Säuglinge haben höhere Thrombozytenwerte von 250 bis 550 Thrombozyten/nL [69].

Im folgenden sind die Ursachen der bekannten, sehr seltenen angeborenen Thrombozytopenien dargestellt, in denen nur die megakaryozytäre Reihe betroffen ist, während alle anderen Linien primär normozellulär sind. In Patienten mit Autosomal-dominanter Thrombozytopenie wurden Mutationen auf Chromosom 10, in Patienten mit Radio-ulnärer Synostose mit amegakaryozytärer Thrombozytopenie in HOXA11 und in Patienten mit Congenitaler amegakaryozytärer Thrombozytopenie im Thrombopoietinrezeptor nachgewiesen [68, 70]. Letztere weisen bedingt durch die c-Mpl-Mutationen keine TPO-induzierte Signaltransduktion in Thrombozyten auf [71, 72]. Auch bei Patienten mit dem *Thrombocytopenia-absent radii*-Syndrom (TAR-Syndrom) wurde eine defekte TPO-induzierte Signaltransduktion in den Thrombozyten nachgewiesen [73, 74]. Diese Patienten haben eine Thrombozytopenie, jedoch

sind die molekularen Ursachen der Erkrankung bislang sehr wenig verstanden. Die Charakterisierung der Thrombozytopenie bei TAR-Patienten kann neue Aspekte der Thrombozytenbiogenese hervorbringen.

1.4 TAR-Syndrom

1.4.1 Symptome, Phänotyp und Kenntnisstand

1929 beschreibt Greenwald erstmals Patienten mit einer Thrombozytopenie und beidseitiger Radiusaplasie [75]. Diese Symptome werden von Hall 1969 als *Thrombocytopenia-absent-radii* (TAR)-Syndrom zusammengefasst [76]. Mit einer Prävalenz von 1-2:1.000.000 tritt diese Erkrankung selten auf. Die bei Geburt stark ausgeprägte Thrombozytopenie mit Thrombozytenwerten von $<100/nL$ kann mit einer erhöhten Blutungsneigung einhergehen, die nach den ersten Lebensjahren abnimmt und mit einer Verbesserung der Thrombozytenwerte korreliert [76-78]. Neben der Thrombozytopenie sind bei einigen Patienten in den ersten Lebenswochen weitere hämatologische Veränderungen beschrieben worden: Leukozytose, Eosinophilie und Anämie [76, 78].

Die Ursache des TAR-Syndroms ist bislang unbekannt, jedoch gibt es folgende Kenntnisse zur Megakaryopoese und Thrombopoese der Erkrankung:

- 1) TAR-Patienten haben wenige MKs, besitzen aber ansonsten ein normozelluläres Knochenmark [79]. Die MKs weisen eine reduzierte Expression von CD42 auf der Zelloberfläche auf [80].
- 2) In Thrombozyten von TAR-Patienten werden keine bzw. kaum TPO-induzierte Tyrosinphosphorylierungen von Proteinen der intrazellulären Signalkaskaden nachgewiesen [73]. Eine Studie bestimmt bei einem Patienten nicht phosphorylierbares Jak2 nach TPO-Stimulation [74].
- 3) Das körpereigene TPO ist biologisch aktiv [73, 81]. TAR-Patienten weisen erhöhte Plasmaspiegel von TPO und IL-11 auf [73, 82].
- 4) Die Rolle von c-Mpl beim TAR-Syndrom wird in der Literatur kontrovers eingeschätzt. Eine Arbeitsgruppe beschreibt in Thrombozyten und MKs von TAR-Patienten reduzierte mRNA- und Proteinmengen vom TPO-Rezeptor [80]. Eine andere Studie bestimmt in TAR-Patienten und Kontrollen eine vergleichbare c-Mpl-Expression auf der Thrombozytenoberfläche [73]. Das Molekulargewicht des Rezeptors ist bei Patient und Kontrollperson vergleichbar [73].

5) Im Gegensatz zu Kontrollspendern wirkt TPO nicht synergistisch mit ADP auf die Aktivierung von Thrombozyten von TAR-Patienten ein [73].

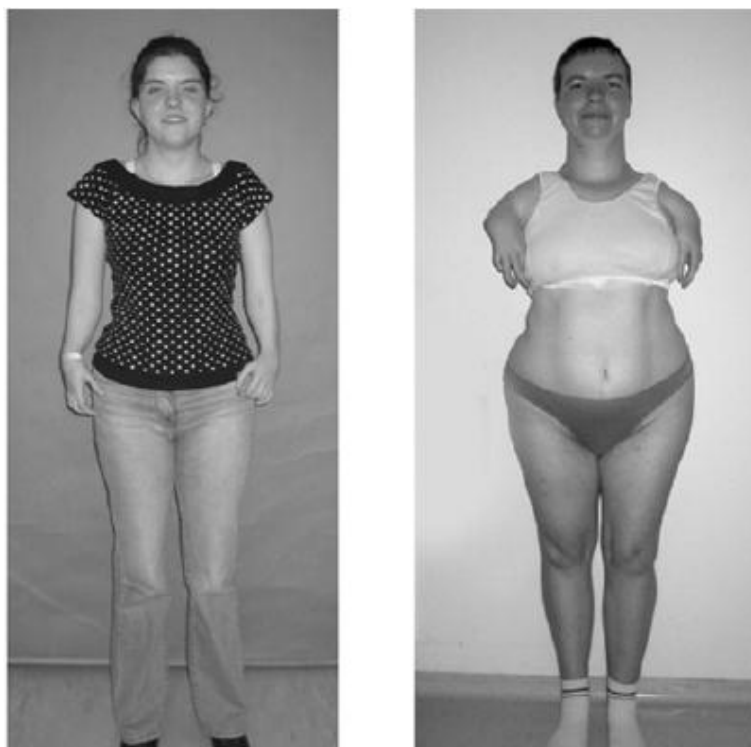


Abb. 5: Der Phänotyp von TAR-Patienten kann sehr unterschiedlich sein. Die unteren Extremitäten beider TAR-Patienten sind nur gering betroffen. Die TAR-Patientin der rechten Abbildung weist eine ausgeprägte Phacomelie auf. Die linke Abbildung zeigt eine TAR-Patientin mit einem eher unauffälligen Erscheinungsbild. (Abb. aus [83].)

Der skelettale Phänotyp der TAR-Patienten kann sehr unterschiedlich sein (Abb. 5) [83]. Viele Patienten weisen eine schwächliche und kleine Statur auf. Zusätzlich zur Radiusaplasie können weitere Skelettfehlbildungen auftreten: Ulnahypoplasie, Humerushypoplasie, Hüftdysplasie, Coxa vara und Klumpfüße. Ebenfalls sind angeborene Herzfehler, Hufeisennieren, Uterusaplasie, vermindertes Hörvermögen und Laktoseunverträglichkeit beschrieben [83].

1.4.2 Genetische Ursachen

Bei Patienten mit TAR-Syndrom liegt sowohl eine Störung der Osteogenese als auch der Megakaryopoese vor. Im Embryo werden Gliedmaßen und HSCs zeitgleich zwischen der 8. und 12. Schwangerschaftswoche angelegt. Die gestörte Megakaryopoese wird nicht durch eine Mutation in c-Mpl verursacht [81], obwohl erhöhte TPO-Plasmaspiegel und keine TPO-induzierte Signaltransduktion in Thrombozyten von TAR-Patienten den Verdacht eines Rezeptordefektes nahelegen.

HOX-Gene regulieren die Morphogenese eines Organismus während der Embryonalentwicklung. $HOXD11^{-/-}$, $HOXA11^{-/-}$ und $HOXA10^{-/-}$ -Mäuse sind durch fehlende Radien und Ulnae charakterisiert [84]. In der DNA von TAR-Patienten wurde keine Mutation in den kodierenden Sequenzen dieser drei HOX-Gene nachgewiesen [85].

2007 konnte auf einem der beiden Chromosomen 1 in 30 untersuchten TAR-Patienten jeweils eine Mikrodeletion detektiert werden [83]. Sie umfasst einen zentromernahen Bereich von minimal zwölf bis maximal 18 deletierten Genen (Abb. 6).

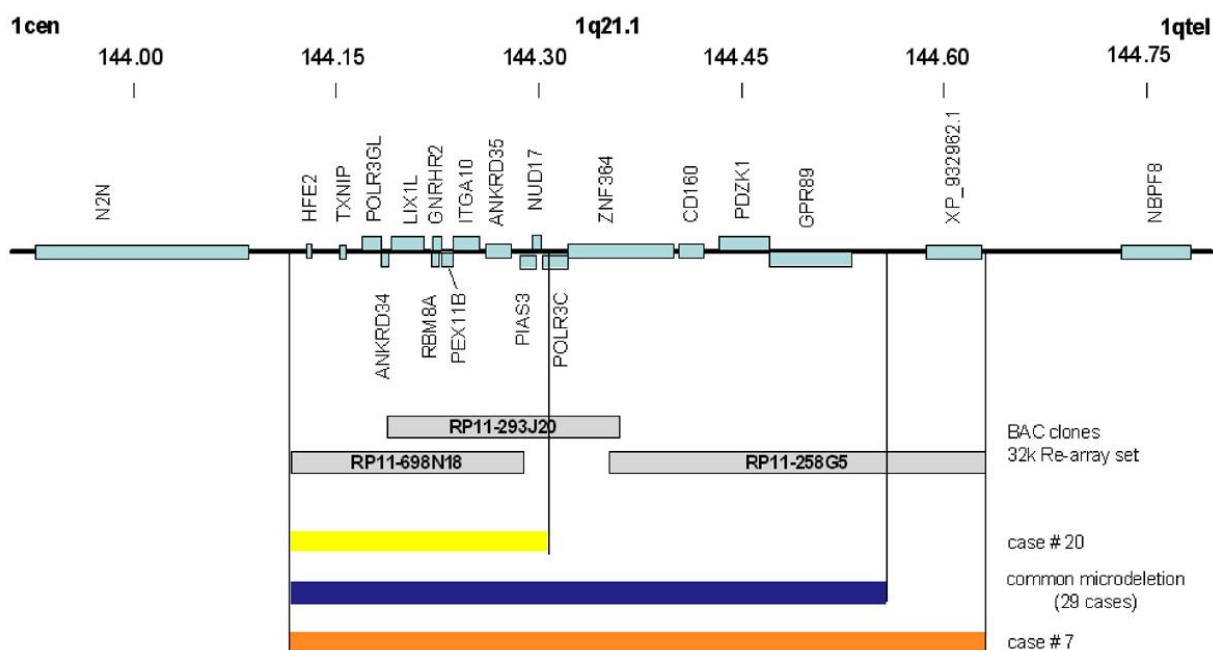


Abb. 6: Darstellung des Mikrodeletionsbereichs 1q21.1 auf Chromosom 1. In allen TAR-Patienten wird eine Mikrodeletion auf Chromosom 1 nachgewiesen. In der Mehrzahl der Patienten sind 17 Gene (blauer Balken), bei einem 18 Gene (oranger Balken) und bei einem zwölf Gene (gelber Balken) auf Chromosom 1 deletiert. Die Positionen der Gene und der BAC-Klone sind eingezeichnet. (Abb. aus [83]. Das dort bezeichnete NUD17 wird in dieser Arbeit einheitlich als NUDT17 angegeben.)

Drei Mikrodeletionsgene könnten gemäß der beschriebenen Proteinfunktionen bevorzugt zur Ausprägung des TAR-Syndroms beitragen:

- 1) Viele TAR-Patienten sind in den ersten Lebenswochen anämisch. *Hemochromatosis type 2 (juvenile)* (HFE2) kodiert für Hämajuvelin, das den Eisensensor Heparin reguliert. Eine reduzierte Menge an Hämajuvelin könnte die Eisenaufnahme ins Gewebe stören und eine Anämie fördern.
- 2) *RNA binding motif protein 8A* (RBM8A) kodiert für das Protein Y14. Dessen Depletion geht mit einer reduzierten STAT3-Phosphorylierung in IL-6 stimulierten

Hep3B-Zellen einher [86]. Eine reduzierte Proteinmenge von Y14 könnte die TPO-induzierte Signaltransduktion inhibieren.

3) PIAS3 ist ein negativer Regulator von pSTAT3 innerhalb der IL-6-induzierten Signaltransduktion. PIAS3 blockt die Bindung von pSTAT3 an DNA und damit die pSTAT3-vermittelte Genexpression [52]. Eine reduzierte Proteinmenge von PIAS3 könnte die TPO-induzierte Signaltransduktion beeinflussen.

Die zwölf Gene aus der Minimaldeletion weisen in den kodierenden Bereichen des nicht betroffenen Allels keine Mutationen auf, die Gene *Ankyrin repeat domain 34* (ANKRD34) und *Nucleoside diphosphate linked moiety X type motif 17* (NUDT17) wurden allerdings nicht sequenziert [83].

In 75% der Patienten wird die Mikrodeletion von einem gesunden Elternteil ohne TAR-Syndrom (in der Arbeit als del-Träger bezeichnet) vererbt, bei 25% der Patienten entsteht sie *de novo*. Da die del-Träger zwar die Mikrodeletion, aber kein TAR-Syndrom aufweisen, ist diese zur Ausprägung des TAR-Syndroms notwendig, aber nicht hinreichend. Das Vererbungsmuster scheint komplex und ist unzureichend verstanden. Vermutlich trägt ein weiterer unbekannter Faktor, ein so bezeichneter „*Modifier of TAR*“, zur Ausprägung des TAR-Syndroms bei. Dieser kann entweder *de novo* entstehen oder aber vom Elternteil ohne Mikrodeletion stammen [83].

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Das TAR-Syndrom ist eine angeborene Erkrankung und kennzeichnet sich durch Thrombozytopenie und Radiusaplasie. Alle TAR-Patienten weisen eine circa 200 kb umfassende Mikrodeletion auf Chromosom 1 auf. Da diese zu 75% von einem nicht betroffenen Elternteil vererbt wird, ist die Mikrodeletion zur Ausprägung des TAR-Syndroms notwendig, aber nicht hinreichend.

Möglicherweise verursacht eine defekte TPO-induzierte Signaltransduktion die Thrombozytopenie in den TAR-Patienten. Jak2 ist die initiale Kinase im TPO-abhängigen Signalweg. Bisher konnte in den Thrombozyten von einem Patienten mit TAR-Syndrom nicht phosphorylierbares Jak2 nachgewiesen werden. Die molekularen Ursachen der Erkrankung sind bislang sehr wenig verstanden. Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Charakterisierung des hämatologischen Defekts in TAR-Patienten, für ein besseres Verständnis der Signaltransduktion von TPO im Rahmen

der Thrombozytenbiogenese. Daher sollen die folgenden drei Themen bearbeitet werden:

I. Bindet TPO an c-Mpl, wird im Gesundspender Jak2 aktiviert, das wiederum c-Mpl phosphoryliert und mindestens drei Signalwege initiiert, die zur Thrombozytenbiogenese beitragen: den Jak/STAT-, den PI3K/Akt- und den Raf/Erk-Signalweg. Es soll eine umfangreiche Analyse der beteiligten Signalmoleküle in Thrombozyten von einer großen Anzahl von TAR-Patienten im Kindes- und Erwachsenenalter (bis 40 Jahre) durchgeführt werden. Die Ergebnisse sollen mit denen von beiden Elternteilen (mit und ohne Mikrodeletion) und Kontrollpersonen verglichen werden. Darüber hinaus soll die Rolle von c-Mpl bei der Ausprägung des TAR-Syndroms geklärt werden, indem dessen Proteinmenge in Thrombozyten und die Expression auf der Thrombozytenoberfläche in TAR-Patienten und Kontrollpersonen bestimmt wird.

Zur Thrombozytenbiogenese tragen auch TPO-unabhängige Mechanismen bei. Dabei vermitteln SDF-1 und FGF-4 die Migration von MKs aus der Stammzellnische zur Blutbahn, deren Reifung sowie die Abschnürung der Thrombozyten. Es sollen die Plasmaspiegel beider Zytokine in TAR-Patienten und Kontrollspendern verglichen werden.

II. Es ist naheliegend, dass eines der annotierten Gene im Chromosom 1 zur Ausprägung des TAR-Syndroms beiträgt. Das Anlegen von spezifischen Zelllinien (immortalisierte B-Lymphozyten) von TAR-Patienten, Elternteilen (mit und ohne Mikrodeletion) und Kontrollpersonen erlaubt den Vergleich des Expressionsprofils dieser Gene auf RNA-Ebene. Darüber hinaus soll die Proteinexpression der Mikrodeletionsgene in Thrombozyten von TAR-Patienten, Elternteilen (mit und ohne Mikrodeletion) und Kontrollspendern bestimmt werden.

III. Die Mikrodeletion auf Chromosom 1 ist zur Ausprägung des TAR-Syndroms notwendig, aber nicht hinreichend. Im Rahmen einer internationalen Kooperation soll mittels *Next generation sequencing* genomweit der Faktor bzw. die Mutation identifiziert werden, die zur Ausprägung des TAR-Syndroms beiträgt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Sigma Aldrich, Carl Roth oder Merck bezogen.

Chemikalie	Vertrieb
ADP	DiaMed
<i>destilliertes Wasser (Aqua dest.)</i>	Aqua B. Braun
Bradfordlösung	Biorad
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	GIBCO
Fetales/bovines-Serum (BSA)	Biochrom AG
Ficoll-Paque	GE Healthcare
Glutamatlösung	Biochrom AG
Jak2-Inhibitor (Jak2 inh.)	Calbiochem
Natriumstibogluconat	Calbiochem
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Biochrom AG
Poly (dl;dC)	Roche
Polynukleotidkinase-Puffer	Roche
Rekombinantes humanes Thrombopoietin (rhTPO)	R&D Systems®
Super Signal®West Dura – Detektionskit	Thermo Scientific
T4 Polynukleotidkinase	Roche
Trizol	Invitrogen
Tween-20	Calbiochem
³² P-γATP	PerkinElmer

2.1.2 Antikörper (Ak)

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

Tabelle 1: Verwendete Aks. Alle Aks sind unter Angabe der Herstellerfirma, optimierter Blocklösung und eingesetzter Verdünnung aufgelistet. Kaninchen (K), Maus (M) und Ziege (Z) geben Auskunft über die Spezies, in der die Aks generiert wurden.

Antikörper	Vertrieb	Blocklösung	Ak-Verdünnung
K – α -c-Mpl (C167639)	R&D Systems	5% Milch	1:500 in 5% Milch
K – α -Akt (C67E7)	Cell Signaling	5% Milch	1:1000 in 5% BSA
K – α -Erk (K23)	Santa Cruz Biotechnology	5% BSA	1:250 in 5% BSA
K – α -Hämöjuvelin	generiert aus Hämöjuvelin Ak-produzierenden Zellen	3% BSA	1:2000 in 3% BSA
K – α -JAK2 (D2E12)	Cell Signaling	5% Milch	1:500 in 5% Milch
K – α -mTOR (2972)	Cell Signaling	5% BSA	1:1000 in 5% BSA
K – α -S6K (AB-241)	Advanced Targeting Systems	5% Milch	1:1000 in 5% Milch
K – α -phosphoAkt (D9E)	Cell Signaling	5% Milch	1:500 in 5% BSA
K – α -phosphoErk2 (E-14)	Santa Cruz Biotechnology	5% BSA	1:250 in 5% BSA
K – α -phosphoJak2 (C80C3)	Cell Signaling	5% Milch	1:500 in 5% Milch
K – α -phosphoSTAT1 (58D6)	Cell Signaling	5% BSA	1:500 in 5% BSA
K – α -phosphoSTAT3 (#9131)	Cell Signaling	5% Milch	1:200 in 5% BSA
K – α -phosphoTyk2 (#9321)	Cell Signaling	5% Milch	1:250 in 5% BSA
K – α -PIAS3 (C-12)	Santa Cruz Biotechnology	3% BSA	1:50 in 5% Milch
K – α -pS6K (AB-207)	Advanced Targeting Systems	5% Milch	1:1000 in 5% Milch
K – α -STAT1 (p84/91)	Santa Cruz Biotechnology	5% Milch	1:500 in 5% Milch
K – α -STAT3 (#9132)	New England Biolabs	5% Milch	1:500 in 5% Milch
K – α -STAT5 (C-17)	Santa Cruz Biotechnology	5% Milch	1:500 in 5% Milch
K – α -Tyk2 (#9312)	Cell Signaling	5% Milch	1:500 in 5% BSA
M – α -CXCR4 (C12G5)	R&D Systems	5% Milch	1:250 in 5% Milch
M – α -GAPDH (6C5)	Abcam	5% Milch	1:2500 in 5% Milch
M – α -phosphoSTAT5 (14H2)	New England Biolabs	5% BSA	1:500 in 5% Milch
Z – α -K Ig, HRP-konjugiert	Santa Cruz Biotechnology	/	1:2000 in TBST
Z – α -M Ig, HRP-konjugiert	Santa Cruz Biotechnology	/	1:2000 in TBST
Z – α -M IgG, Alexa Flour 488	Invitrogen	/	/

2.2 Häufig verwendete Puffer

Hepes Tyrodes-Puffer (HTP):

10 mM	HEPES
129 mM	NaCl
8,9 mM	NaHCO ₃
0,8 mM	KH ₂ PO ₄
5,6 mM	Glucose
	pH 7,4 partikelfrei filtriert

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS):

137 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
10 mM	Na ₂ HPO ₄
85 mM	KH ₂ PO ₄
	pH 7,2

TBE-Puffer:

89 mM	Tris-HCl
89 mM	Borsäure
2,5 mM	EDTA

TBST (pH 8):

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

2.3 Oligonukleotide der Mikrodeletionsgene

Alle Oligonukleotide liegen innerhalb der jeweiligen kodierenden Gensequenz (Tabelle 2). Es wurden bevorzugt Primer gewählt, die ein exon-übergreifendes Produkt amplifizieren, um mögliche Verunreinigungen mit genomischer DNA auszuschließen (Primer für HFE2 und ANKRD34 sind nicht exon-übergreifend).

Tabelle 2: Verwendete Oligonukleotide. Es sind die NM-Nummer der Gensequenzen vom *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) und die Sequenzen der jeweiligen Primer angegeben.

Gen	Primer-Sequenz vorwärts 5' → 3'	Primer-Sequenz rückwärts 5' → 3'
HFE2 (NM_202004.3)	CTGGGGGATCCAGTTTGTC	CAGCTGTCTGCCGAATGAT
TXNIP (NM_006472)	ACGCTTCTTCTGGAAGACCA	AGGAAGCTCAAAGCCGAACCT
POLR3GL (NM_032305.1)	GGGGCCAGTTGACCTTCA	AACTCCAAGGGAGGGAAGAG
ANKRD34 (NM_001039888.2)	TGGGTCAGGGTAAGCTACG	CTGCCATTAGCGCAGTCTC
LIX1L (NM_153713.1)	GCTATGGCCGAGTGAATGTG	AACCACTAGAGCCCCATTCTT
RBM8A (NM_005105)	CTCGACAGGCGAACAGGATA	ATCAAATCCTGGCCATTGAG
PEX11B (NM_003846)	GGTCCGCTTCAGTGCTCA	ACTGGCTCCATGCCTCTG
ITGA10 (NM_003637.3)	AACATGTTGGGGGTGGAC	TACAGGGCAGCGATAAACG
ANKRD35 (NM_144698.3)	CCACCAAGCTTGACTCGAA	TTGATGTCAGCCCCATTTG
PIAS3 (NM_006099.3)	GGAGCTGGGCGAATTAAG	TTCCGTCCACTCTTGTTCC
NUDT17 (NM_001012758.2)	TGGAAGCTTGAGGAGGAGCTG	GAGGGACCCAAGAGAAGCTGG
GAPDH (NM_002046)	AAGGTGAAGGTCGGAGTCAA	AATGAAGGGGTCATTGATGG

2.4 Zellkultur

2.4.1 Lymphoblastoide Zelllinien

Lymphoblastoide Zelllinien (LCLs) sind durch in vitro-Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus generierte immortalisierte B-Lymphozyten. Das Anlegen der LCLs erfolgte im Institut für Humangenetik der Charité Berlin unter Leitung von Frau Prof. Dr. Heidemarie Neitzel. LCLs können grundsätzlich aus den B-Zellen von jedem Menschen angelegt werden und repräsentieren dessen genetischen Status. Kernhaltige B-Zellen begünstigen Genexpressionsanalysen im Gegensatz zu kernlosen Thrombozyten. In den lymphoiden Zellen können allerdings keine MK-spezifischen Defekte nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde mit LCLs von sechs Patienten, drei Trägern, zwei nicht betroffenen Elternteilen sowie zwei Gesundspendern gearbeitet. Alle Arbeiten mit LCLs erfolgten im Labor mit Sicherheitsstufe 2. LCLs werden in DMEM-Medium mit 10% Fetalem/bovinem-Serum, 50 U/mL Penicillin, 50 µg/mL Streptomycin und 1% (v/v) 100x Glutamatlösung bei 37°C, 5% CO₂-Gehalt und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert (Suspensionskultur).

2.4.2 Differenzierung von HSCs zu Megakaryozyten

CD34⁺ HSC (aus mobilisierten peripheren Stammzellen einer allogenen Stammzellspende) werden im Kulturmedium STEM Span von Stem Cell Technologies mit folgenden Zusätzen für sieben Tage bei 37°C, 5% CO₂-Gehalt und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert: 10 ng/mL rhTPO, 10 ng/mL IL-1 β , 1mM NaHCO₃ und 1% (v/v) 100x nicht essentielle AS. Nach einem Mediumwechsel werden die Zellen für weitere drei Tage im Kulturmedium STEM Span kultiviert (Suspensionskultur). Die CD34⁺ HSCs differenzieren unter diesen Bedingungen zu MKs.

2.5 Biochemische Untersuchungen

2.5.1 Analyse der TPO-induzierten Signaltransduktion

2.5.1.1 Probenaufbereitung: Isolation und Stimulation der Thrombozyten

Die Probenaufbereitung zur Analyse der TPO-induzierten Signaltransduktion in Thrombozyten erfolgt nach dem Protokoll von Miyakawa *et al.* [87]. Das Vollblut wird mittels Zentrifugation (20 min bei 80 g ohne Bremse und Raumtemperatur (RT)) separiert. Das plättchenreiche Plasma (PRP) im Überstand wird vorsichtig abgenommen (Abb. 7).

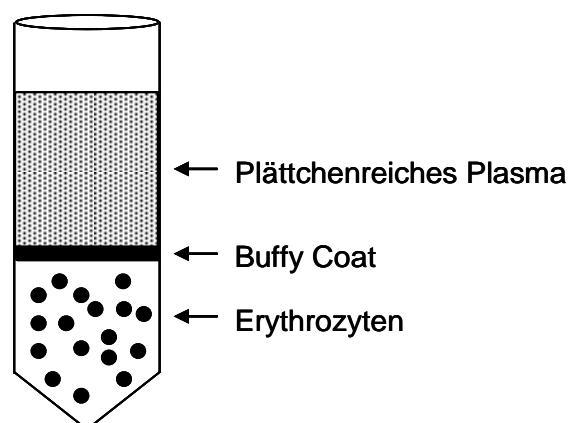


Abb. 7: Blutbestandteile nach Zentrifugation. Schematische Darstellung der Blutbestandteile von Vollblut nach Zentrifugation. Zu unterscheiden sind PRP, der Buffy Coat (Monozyten, Lymphozyten) und Erythrozyten.

Dem PRP wird 2 μM Acetylsalicylsäure zugesetzt. Eine 30-minütige Inkubation bei RT verhindert die Aggregation und Degranulation der Blutplättchen. Nach Zugabe von 1 μM Prostaglandin E_1 werden die Thrombozyten bei RT für 8 min und 400 g zentrifugiert. Das weiche Pellet wird in 1 Volumen HTP (Kapitel 2.2) resuspendiert und erneut bei RT für 10 min und 400 g zentrifugiert. Anschließend wird das Pellet in 0,5 Volumen HTP aufgenommen und mit 1 mM CaCl_2 versetzt. Die finale Plättchenkonzentration der Suspension beträgt 1×10^8 - 1×10^9 /mL.

Die TPO-Stimulation der Thrombozyten erfolgt unmittelbar nach der Isolation der Thrombozyten aus Vollblut. Dazu wird das gewaschene PRP gedrittelt, ein Ansatz bleibt TPO-unstimuliert, die anderen beiden Ansätze werden für 10 bzw. 30 min mit 50 ng/mL rhTPO stimuliert. Bei den Experimenten in denen die Jak2-Kinaseaktivität inhibiert wird, werden die Thrombozyten vor der TPO-Stimulation mit WP1066, Jak2 inh. oder AG490 mit der angegebenen Konzentration und Zeit inkubiert.

Für Immunblot-Analysen wird die TPO-Stimulation durch Zugabe von 1 Volumen 2x-Probenpuffer abgestoppt und die Proben anschließend für 5 min bei 95°C erhitzt. Die Proteinlysate werden bei -20°C aufbewahrt.

2x-Probenpuffer:

20% (v/v)	Glycerol
2% (w/v)	SDS
10% (v/v)	Mercaptoethanol
0,002% (w/v)	Bromphenolblau
100 mM	Tris pH 6,8
20 mM	EGTA
2 mM	Na_3VO_4

Für einen *Electrophoretic mobility shift Assay* (EMSA) werden die TPO-stimulierten Thrombozyten 30 Sekunden bei 650 g und RT zentrifugiert, das Pellet in 50 μL EMSA-Lysepuffer aufgenommen, 20 min auf Eis lysiert und anschließend für 15 min bei 10.000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird bei -20°C aufbewahrt.

EMSA-Lysepuffer:

10 mM	Tris-HCl pH 7,05
50 mM	NaCl
30 mM	Na ₄ P ₂ O ₇
50 mM	NaF
5 µM	ZnCl ₂
100 µM	Na ₃ VO ₄
1% (v/v)	Triton-X100
1 mM	Phenylmethylsulfonylfluorid
je 2,5 µg/mL	Leupeptin, Pepstatin A, Aprotinin
0,15 mM	Benzamidin

2.5.1.2 Phosphorylierungsstudien der Signalmoleküle – Immunblot**SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Proteingemische werden mittels SDS-PAGE ihrer Größe nach aufgetrennt. Dabei werden Proteine mit einem Molekulargewicht von 17 bis 170 kDa mit 10- oder 12%-igen Trenngelen separiert (Tabelle 3). Zur Bestimmung des Molekulargewichts der Proteine wird zusätzlich ein Standard (PageRuler Prestained Protein Ladder bzw. PageRuler Plus Prestained Protein Ladder von Fermentas) auf das Gel aufgetragen.

Tabelle 3: Trenn- und Sammelgele. Die Zusammensetzung eines 10- bzw. 12%-igen Trenngels und eines Sammelgels sind der Aufzählung zu entnehmen.

Trenngel	10%	12%
<i>Aqua dest.</i>	1,9 mL	1,6 mL
30% Acrylamid Mix	1,7 mL	2,0 mL
1,5 M Tris (pH 8,8)	1,3 mL	1,3 mL
10% SDS	0,05 mL	0,05 mL
10% Ammoniumpersulfat	0,05 mL	0,05 mL
TEMED	0,002 mL	0,002 mL

Sammelgel	5%
<i>Aqua dest.</i>	1,4 mL
30% Acrylamid Mix	0,33 mL
1,0 M Tris (pH 6,8)	0,25 mL
10% SDS	0,02 mL
10% Ammoniumpersulfat	0,02 mL
TEMED	0,002 mL

Die Gelkammer wird mit 1x-SDS-PAGE-Laufpuffer befüllt. Vorerst wird für 10 min ein konstanter Strom von 15 mA pro Gel angelegt. Dadurch konzentrieren sich die Proben zu einer Front, die durch den zugesetzten Bromphenolblau-Farbstoff im 2x-Probenpuffer (Kapitel 2.5.1.1) gut erkennbar ist. Erreicht diese Front das Trenngel, wird die Stromstärke auf 30 mA pro Gel erhöht. Die Proteine sind mit dem Erreichen der Lauffront an der Gel-Unterkante ausreichend aufgetrennt.

SDS-PAGE-Laufpuffer (10x) (pH 8,3-8,5):

25 mM	Tris
250 mM	Glycin
0,1% (v/v)	SDS

Immunblot und Immunologische Färbung

Eine PVDF-Membran (0,45 µm, Roche Diagnostics) wird zunächst für 1 min mit Methanol gewaschen. In einem 1x-Transferpuffer befüllten *Tank-Blotting* System (Biorad) werden die im Gel aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen und dort immobilisiert.

Transferpuffer (5x):

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

Beim Zusammenbau des Immunblots ist darauf zu achten, dass keine Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten entstehen. Der Proteintransfer vom SDS-PAGE-Gel auf die PVDF-Membran erfolgt innerhalb einer Stunde bei konstanter Spannung von 100 Volt bei einer maximalen Stromstärke von 300 mA. Der Aufbau des Immunblots ist in Abb. 8 dargestellt.

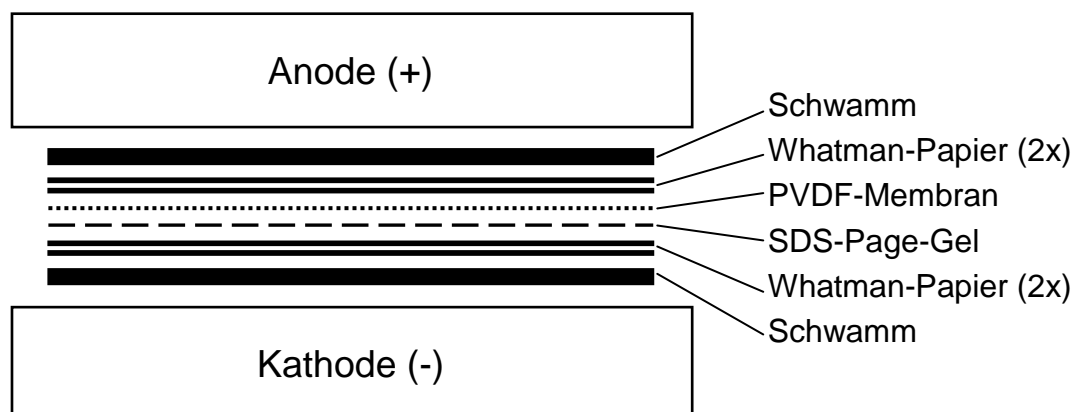


Abb. 8: Aufbau des Immunblots. Zwischen den Schwämmen befinden sich jeweils zwei *Whatman*-Papiere, sowie das SDS-Page-Gel mit den aufgetrennten Proteinen, die auf eine PVDF-Membran übertragen werden.

Anschließend verhindert eine einstündige Inkubation der Membran in Blockpuffer bei RT unspezifische Bindungen zwischen dem eingesetzten Primärantikörper und den membranfixierten Proteinen. Im Anschluss wird die Membran dreimal für 5 min in TBST gewaschen und über Nacht bei 4°C im Schwenkinkubator mit dem Primärantikörper inkubiert. In Kapitel 2.1.2 sind die optimalen Blockbedingungen sowie die Verdünnungen der Aks angegeben, damit ein spezifischer Nachweis von Antigenen möglich ist.

Blockpuffer:

3 bzw. 5% (w/v) BSA in TBST

oder

5% (w/v) Milchpulver in TBST

Ein dreimaliges Waschen der Membran für 5 min in TBST löst unspezifische Bindungen. Anschließend wird die Membran in der entsprechenden Sekundärantikörperlösung (Kapitel 2.1.2) eine Stunde bei RT inkubiert. Danach wird die Membran erneut dreimal für 5 min mit TBST gewaschen. Eine an den sekundären Antikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase katalysiert die Umsetzung des Luminol-enthaltenen Substrats von Super Signal[®]West Dura. Die Oxidation des Substrats resultiert in Chemilumineszenz (Lichtemission), die zu einer Schwärzung des aufgelegten licht-sensitiven Röntgenfilms (CL-XPosure X-Ray Film von Thermo Scientific) an entsprechender Stelle führt. Dabei korreliert die Intensität der Schwärzung (vor der Sättigung) in einem bestimmten Rahmen linear mit der auf der Membran gebundenen Menge an Aks. Die wiederum korrelieren mit der Menge immobilisierter Proteine auf der Membran. Eine Mengen- sowie Größenbestimmung der Proteine erfolgt im Vergleich zum Standard.

Mehrfaches Inkubieren von Aks

Will man immobilisierte Proteine mit dem gleichen Molekulargewicht nacheinander auf derselben PVDF-Membran nachweisen, müssen die gebundenen Aks entfernt werden. Diesen Vorgang bezeichnet man als *Stripping*. Dazu wird die Membran im *Stripping*-Puffer mit reduzierenden Bedingungen für 15 min bei 45°C gespült. Im Anschluss wird die Membran dreimal für jeweils 5 min in TBST gewaschen. Nach der Inkubation im Blockpuffer wird die Membran erneut dreimal für jeweils 5 min in TBST gewaschen und anschließend über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper inkubiert.

Stripping-Puffer (pH 6,7):

62,5 mM	Tris
2% (w/v)	SDS
100 mM	2-β-Mercaptoethanol (erst vor Gebrauch frisch zugeben)

2.5.1.3 Electrophoretic mobility shift Assay (EMSA)**Herstellung der radioaktiv markierten Sonden**

Mittels EMSA können DNA-gebundene Proteine nachgewiesen werden. Dazu wird eine radioaktiv markierte Sonde (^{32}P) hergestellt, indem die unten aufgelisteten Komponenten vereint und für zehn min bei 37°C inkubiert werden. Anschließend erfolgt die Deaktivierung des Enzyms für fünf min bei 95°C. Der Ansatz wird langsam auf RT abgekühlt, wodurch die Hybridisierung der komplementären Oligonukleotide gewährt wird.

Ansatz zur Herstellung der radioaktiv markierten Sonde:

1 µL	Polynukleotidkinase-Puffer
10 Unit	T4-Polynukleotidkinase
100 ng	Oligonukleotid vorwärts 5'→3' (siehe unten)
100 ng	Oligonukleotid rückwärts 5'→3' (siehe unten)
50 µCi	^{32}P -γATP (spezifische Aktivität: 3000 Ci/mmol)
ad 5 µL	<i>Aqua dest.</i>

responsive DNA-Elemente:

m67: 5' TTCATTTCCCGTAAATCCCTA 3'
 5' TAGGGATTTACGGGAAATGAA 3'

RBM8A (Wildtyp): 5' CAGACGAGATCTCGATC 3'
 5' GATCGAGATCTCGTCTG 3'

RBM8A (5'-UTR-SNP): 5' CAGACAAGATCTCGATC 3'
 5' GATCGAGATCTTGTCTG 3'

Evi-1 (Consensus): 5' CAGACCAAGATAAAGATCTCGATC 3'
 5' GATCGAGATCTTTATCTTGGTCTG 3'

Die Trennung der radioaktiv markierten Sonde von freiem ^{32}P - γATP erfolgt mittels der Entsalzungssäulen *illustra Nick Columns* der Firma GE Healthcare. Dazu wird die enthaltene Säulenflüssigkeit abgegossen und die Säule mit 800 μL 1xTE-Puffer gespült. Anschließend wird die radioaktiv markierte Sonde mit 20 μL 1xTE-Puffer versetzt und auf die Säule pipettiert. Die Säule wird mit 400 μL 1xTE-Puffer gespült und der Durchfluss verworfen. Erneut werden 400 μL 1xTE-Puffer auf die Säule gegeben. Der Durchfluss enthält die gereinigte radioaktiv markierte Sonde.

Zur Detektion der Bindung von STAT1 und STAT3 an DNA wird ein Bereich aus dem Promoter von *c-fos* gewählt (hSIE: **h**uman **c-Sis** inducible **e**lement). Dieser Promoterbereich ist durch eine Mutation (m67) noch affiner für die STAT-Moleküle.

10xTE-Puffer:

10 mM	Tris-HCl pH 7,5
1 mM	EDTA

Bindereaktion

Es werden jeweils 10 μg Protein der hergestellten Thrombozytenlysate (Kapitel 2.5.1.1) mit Bindepuffer, Ak oder BSA und *Aqua dest.* für 30 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wird die radioaktiv markierte Sonde (circa 25000 cpm der 5'- ^{32}P -Phosphat-markierten Oligonukleotide) zugegeben und der Ansatz für 30 min bei RT stehen gelassen (Tabelle 4). Durch den Zusatz von Aks können die beteiligten Proteine spezifiziert werden (*Supershift*-Experimente). Der Negativkontrolle wird anstatt Lysat EMSA-Lysepuffer hinzugegeben.

Tabelle 4: Bindereaktion. Die Reagenzien der Bindereaktion mit und ohne Ak sind aufgeführt.

Reagenz	freie Sonde	ohne Ak	mit Ak
Lysat	10 μg	10 μg	10 μg
Bindepuffer	10 μL	10 μL	10 μL
BSA	1 μg	1 μg	/
Ak	/	/	1 μg
<i>Aqua dest.</i>	ad 19 μL	ad 19 μL	ad 19 μL
Sonde	1 μL	1 μL	1 μL

EMSA-Bindepuffer:

20 mM	Tris-HCl pH 7,5
100 mM	NaCl
2 mM	EDTA
10% (v/v)	Glycerol

frisch vor Gebrauch (ein Ansatz):

0,05% (w/v)	Milchpulver gelöst in <i>Aqua dest.</i>
1 mM	Dithiothreitol (DTT)
40 µg/mL	Poly (dl;dC)
ad 10 µL	Bindepuffer (d. h. finaler Einsatz von 18 mM Tris-HCl pH 7,5; 90 mM NaCl; 1,8 mM EDTA und 9% Glycerol)

Komplexauftrennung und Detektion

Die Protein/DNA-Komplexe werden in einem 5%-igen nicht denaturierenden Polyacrylamidgel in 0,5xTBE-Puffer innerhalb von 80 min bei 250 V aufgetrennt.

5% Polyacrylamidgel:

29 mL	<i>Aqua dest.</i>
6,7 µL	30% Polyacrylamid
4 mL	10xTBE-Puffer
300 µL	10% Ammoniumpersulfat
30 µL	TEMED

Das Gel wird für eine halbe Stunde in einem Gelrockner bei 80°C und einem Ölrotationspumpenvakuum getrocknet. Die am radioaktiv-markierten responsiven DNA-Element gebundenen Proteine werden durch Autoradiographie auf Kodakfilmen (Biomax MS) nach Inkubation bei -80°C visualisiert.

2.5.2 Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Mittels ELISA ist eine quantitative Bestimmung von Proteinen, hier des Plasmaspiegels von SDF-1 und FGF-4 im Blutplasma, möglich. Das Blutplasma wird von den festen Blutbestandteilen durch eine Zentrifugation für 5 min bei 80 g getrennt. Eine weitere Zentrifugation (15 min, 10.000 g) entfernt Thrombozyten im Blutplasma. Damit wird verhindert, dass SDF-1 und FGF-4 an Thrombozyten binden und nicht nachgewiesen werden können. Die Bestimmung der Zytokinspiegel erfolgt

mit dem FGF-4-ELISA-Kit von Biocat bzw. dem SDF-1-ELISA-Kit von R&D Systems nach Herstellerangaben.

Dabei ist der spezifische Antikörper gegen FGF-4 bzw. SDF-1 bereits an die Matrix der ELISA-Platten gebunden. Standards und Proben werden in die *wells* der Platte gegeben und für zweieinhalb Stunden inkubiert. Nicht gebundene Substanzen werden durch Waschvorgänge entfernt. Anschließend wird der spezifische, biotinylierte Sekundärantikörper im Überschuss für eine Stunde zugegeben. Waschvorgänge entfernen ungebundene Aks. Danach wird Streptavidin-Lösung zugegeben. Streptavidin geht mit Biotin eine der höchst-affinen biologischen nichtkovalenten Bindungen ein und koppelt das Nachweis-Enzym (Meerrettichperoxidase) an den Sekundärantikörper. Anschließend wird Substrat-Reagenz jedem well zugegeben. Dieses wandelt sich innerhalb von 30 min einhergehend mit einem Farbumschlag nach gelb in das Endprodukt um. Dabei korreliert die Intensität der Gelbfärbung mit der Konzentration der gemessenen Zytokine. Die optische Dichte wird im Photometer bei 570 nm gemessen. Von den Messwerten des Standards wird eine Eichgerade erstellt. Diese dient als Grundlage zur Ermittlung der unbekanntenen Zytokinkonzentrationen. Jeder Standard und jede Probe wird in Duplikaten gemessen.

2.6 Molekularbiologische Arbeiten

2.6.1 DNA-Isolation aus mononukleären Zellen

5 mL EDTA-Blut und 5 mL PBS werden vorsichtig über Ficoll-Paque geschichtet und bei 400 g für 20 min zentrifugiert (ohne Bremse). Die mononukleären Zellen werden isoliert und zweimal mit PBS gewaschen. Das Pellet der Zellen wird in 1 mL Lösung B, 200 µL Lösung C und 1 Volumen Chloroform gelöst und anschließend für 6 min bei 1400 g zentrifugiert. Zum Überstand wird 600 µL Isopropanol zugegeben und es erfolgt eine Zentrifugation für 10 min bei 15.000 g. Das Pellet wird mit Ethanol gewaschen und für weitere 8 min bei 8400 g zentrifugiert, luftgetrocknet und in *Aqua dest.* gelöst.

Lösung B:

400 mM	Tris-HCl pH 8,0
60 mM	Na-EDTA
150 mM	NaCl
1% (w/v)	SDS

Lösung C:

100 g	Na-Perchlorat in 142 mL <i>Aqua dest.</i> gelöst
-------	--

2.6.2 RNA-Isolation

Die Zellen werden zentrifugiert (5 min, 200 g) und in einem Volumen PBS-Puffer gewaschen. Nach Zentrifugation (für 5 min bei 200 g) wird den Zellen 500 µL Trizol zugegeben und die Zellen lysieren innerhalb von 30 min bei RT. Anschließend erfolgt die Zugabe von 100 µL Chloroform und eine Zentrifugation (20 min bei 10.000 g und 4°C). Die obere wässrige Phase enthält die RNA. Diese wird vorsichtig abgenommen und mit 500 µL Isopropanol mindestens 10 min auf Eis präzipitiert. Nach Zentrifugation (15 min bei 10.000 g und 4°C) wird das Pellet in 750 µL 4°C kaltem 70%-igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (8 min bei 10.000 g und 4°C). Anschließend wird der Überstand abpipettiert und das Pellet in 25 µL RNase-freiem *Aqua dest.* gelöst. Die Konzentration der Lösung wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt, wobei 40 µg/mL RNA einem Wert der optischen Dichte von 1 entspricht.

2.6.3 Reverse Transkription der RNA in cDNA

Das Umschreiben von RNA in cDNA erfolgt mit dem *Quanti Tect Reverse* Transkriptionskit von Quiagen nach Herstellerangaben. Der reversen Transkription ist ein Verdau genomischer DNA vorangeschaltet, um falsch-positive Ergebnisse durch Verunreinigung mit genomischer DNA in der anschließenden quantitativen Real Time-PCR (qRT-PCR) zu vermeiden. Dazu wird 1 µg RNA mit 2 µL Wipeout-Puffer und *Aqua dest.* in einem 12 µL Totalansatz zwei min bei 42°C vorinkubiert. Die reverse Transkription erfolgt durch Zugabe von 1 µL Primer-Mix, 4 µL Transkriptase-Puffer und 1 µL reverser Transkriptase bei 42°C für 20 min. Anschließend folgt eine Inkubation bei 95°C für 3 min zur Denaturierung von RNA/cDNA-Hybriden. Dem

Ansatz wird 47,5 μL *Aqua dest.* zugegeben. Die Stammlösung hat bei vollständiger reverser Transkription eine Konzentration von 20 ng/ μL .

2.6.4 Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR

Mittels qRT-PCR kann die Amplifikation von Doppelstrang-DNA verfolgt werden. Es wird der fluoreszierende Farbstoff *SYBR® Green I* unspezifisch in die neu gebildete DNA eingelagert. Nach jedem PCR-Zyklus wird das vom Farbstoff emittierte Licht (durch Anregung bei 488 nm) der Amplifikate gemessen und als Funktion über die Zeit ausgegeben. Dabei korreliert die Fluoreszenzmenge des Farbstoffs direkt linear mit der Menge an DNA im Reaktionsgefäß.

2.6.4.1 Kinetik der qRT-PCR und Bestimmung des C_T -Werts

Bei einer herkömmlichen PCR wird nur die absolute Menge an PCR-Produkt bestimmt. Die qRT-PCR hingegen nutzt zur Quantifizierung die Kinetik der PCR-Reaktion aus. Am Anfang der Reaktion findet eine weitgehend lineare Vermehrung der DNA-Fragmente statt, die in eine exponentielle Amplifikation übergeht (Abb. 9). Die PCR-Zykluszahl, bei der sich das Fluoreszenzsignal deutlich vom Hintergrund abhebt, d. h. der Übergang von der linearen zur exponentiellen Amplifikationsphase stattfindet, bezeichnet man als C_T -Wert. In den späteren PCR-Zyklen (ab Zyklus 30) nimmt die Amplifikationsrate und somit der Anstieg der Kurve sukzessiv ab, wird vorerst linear und nähert sich dann der Plateaugrenze an. Ursachen hierfür sind die Anhäufung von inhibierenden Reaktionsprodukten, wie z. B. Pyrophosphat, die Limitierung von Primern sowie die hitzelabile Taq-Polymerase. Die Abbildung 9 zeigt, dass die Höhe des Plateaus in zwei unterschiedlich konzentrierten Proben (Probe eins und zwei) gleich ist. Demzufolge kann man aus der Menge des PCR-Produkts nicht direkt auf die Ausgangsmenge der eingesetzten DNA schließen. Je mehr Matrizen-DNA in der Probe vorhanden ist, desto weniger PCR-Zyklen sind notwendig um einen bestimmtem C_T -Wert zu erreichen. Es werden nur C_T -Werte ≤ 30 ausgewertet.

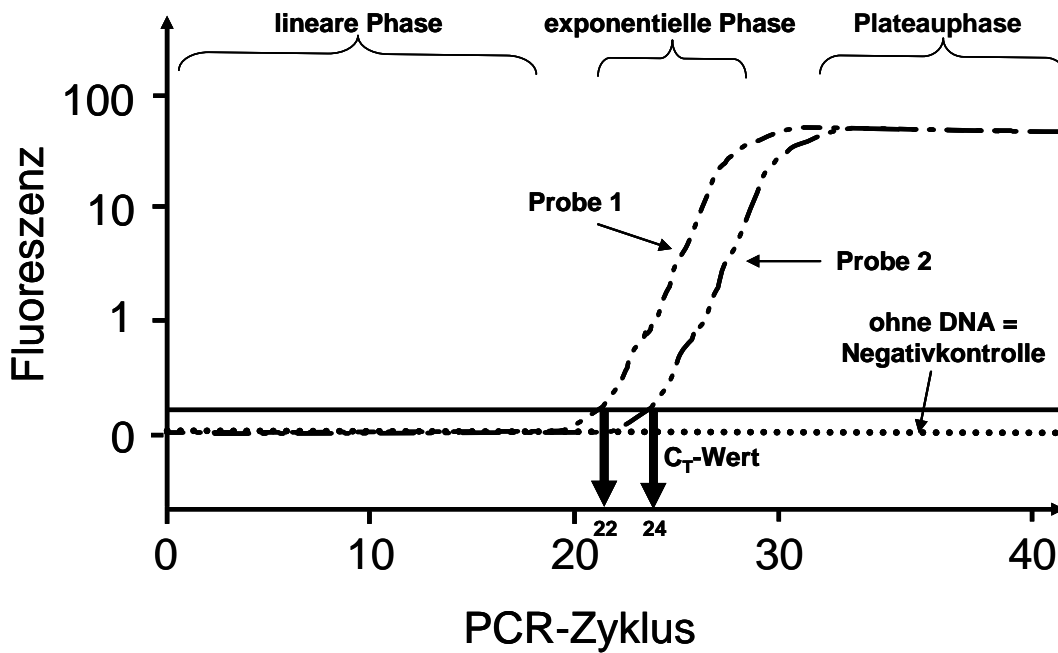


Abb. 9: PCR-Kinetik. In der Abbildung ist die PCR-Kinetik von zwei Reaktionen mit unterschiedlicher Ausgangskonzentration und einer Negativkontrolle dargestellt. Die eingesetzte DNA-Menge von Probe eins ist höher als die von Probe zwei. Letztere benötigt zwei PCR-Zyklen mehr vom Übergang von der linearen- zur exponentiellen Amplifikationsphase. Die PCR-Zykluszahl, bei der sich das Fluoreszenzsignal deutlich vom Hintergrund abhebt bezeichnet man als C_T-Wert. Ab PCR-Zyklus 30 findet unabhängig von der Ausgangskonzentration keine Amplifikation mehr statt (Plateauphase).

2.6.4.2 Reaktionsbedingungen der qRT-PCR

Die qRT-PCR erfolgt nach Herstellerangaben mit dem *Power SYBR Green, PCR-Master-Mix* von Applied Biosystems. Es wird jeder Ansatz in Triplikaten gemessen. Die verwendeten Oligonukleotide sind dem Kapitel 2.3 zu entnehmen.

qRT-PCR Ansatz:

20 ng	cDNA
5 µL	<i>Power SYBR Green, PCR-Master-Mix</i>
4 pmol	Vorwärts-Primer
4 pmol	Rückwärts-Primer
ad 10 µL	<i>Aqua dest.</i>

Temperaturprogramm:

Initiale Denaturierung	10 min		
Denaturierung	15 sek	95°C	} 40 x
Annealing	15 sek	60°C	
Extension	30 sek	72°C	

Die PCR-Reaktion wird im *7500 Fast Real-Time PCR System* von Applied Biosystems durchgeführt. Eine Spezifitätskontrolle jedes PCR-Produkts erfolgt durch die Beurteilung der Schmelzkurve. Dazu wird das PCR-Produkt nach dem letzten PCR-Zyklus in 0,5°C-Schritten (50-90°C) erhitzt und die Fluoreszenzintensität dokumentiert. Die Schmelzkurve ergibt sich aus der ersten Ableitung der Fluoreszenzintensität. Die Auswertung der Rohdaten erfolgt mit der Software 7500 v.2.0.1.

2.6.4.3 Bestimmung der Amplifikationseffizienz

Für die Auswertung der qRT-PCR mittels der abgewandelten Pfaffl-Methode sind für die eingesetzten Primer gleiche Amplifikationseffizienzen (95-100%) notwendig [88]. Extreme Effizienzabweichungen zweier zu vergleichender Oligonukleotide werden vor allem durch unterschiedliche Bindeeigenschaften an DNA hervorgerufen.

Für die Bestimmung der Amplifikationseffizienzen der Primer wird von einer Probe eine serielle Verdünnungsreihe (1:4, 1:16, 1:64, 1:256 und 1:1024) hergestellt und die C_T -Werte bestimmt. Dabei spielen absolute Konzentrationsangaben an eingesetzter DNA keine Rolle. Durch das Auftragen der entsprechenden C_T -Werte über den Logarithmus der Verdünnungen erhält man eine Kurve. Die lineare Regression dieser ergibt eine Geradengleichung. Deren Anstieg m wird für die Effizienzberechnung verwendet.

Effizienzberechnung:

$$\text{Effizienz } E = 10^{\frac{1}{m} - 1}$$

Eine Steigung von $m = -3,32$ entspricht dabei einer Effizienz von 100%, d. h. pro PCR-Zyklus verdoppeln sich die Amplifikate. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wiesen eine Amplifikations-Effizienz von 96-100% auf.

2.6.4.4 Relative Quantifizierung mittels C_T -Methode

Die relative Quantifizierung von der DNA-Konzentration nach einer Abwandlung der Pfaffl-Methode bestimmt nicht die absolute Kopienzahl einer *Template*-DNA. Es wird eine Aussage getroffen, in welchem Verhältnis sich zwei Proben hinsichtlich der Expression einer bestimmten cDNA eines Gens unterscheiden. Zum besseren

Verständnis der $\Delta\Delta C_T$ -Methode erfolgt die Erklärung an einem Patienten (stellvertretend für TAR-Patient) und einer Kontrollperson an einem beliebigen Mikrodeletionsgen. Man macht sich zunutze, dass GAPDH als metabolisches Enzym in Patienten und Kontrollen unabhängig von äußeren Einflüssen weitgehend gleich stark transkribiert wird (Haushaltsgen).

1) Erhebung der C_T -Werte: Es werden bei Patienten und Kontrollspendern mittels qRT-PCR die C_T -Werte des Mikrodeletionsgens und von GAPDH bestimmt.

2) Bestimmung der ΔC_T -Werte des Mikrodeletionsgens und von GAPDH durch die C_T -Werte:

Formel I:

$$\Delta C_T \text{ Mikrodeletionsgen} = C_T \text{ Mikrodeletionsgen}_{\text{Kontrolle}} - C_T \text{ Mikrodeletionsgen}_{\text{Patient}}$$

Formel II:

$$\Delta C_T \text{ GAPDH} = C_T \text{ GAPDH}_{\text{Kontrolle}} - C_T \text{ GAPDH}_{\text{Patient}}$$

3) Bestimmung vom Expressionsverhältnis des Mikrodeletionsgens zwischen Patient und Kontrolle: Es wird mittels der beiden ΔC_T -Werte (Formel I und II) der $\Delta\Delta C_T$ -Wert ermittelt. In der Annahme, dass im Idealfall die Amplifikationseffizienz der Primer 100% beträgt, kann mit folgender Formel das Expressionsverhältnis ($\Delta\Delta C_T$ -Wert) eines Gens zweier Proben bestimmt werden.

Formel III:

$$\text{Expressionsverhältnis} = 2^{\Delta C_T \text{ Mikrodeletionsgen}} / 2^{\Delta C_T \text{ GAPDH}}$$

Das Expressionsverhältnis (Formel III) gibt an, um welchen Faktor das untersuchte Mikrodeletionsgen stärker oder schwächer beim Patient im Vergleich zur Kontrollperson exprimiert wird. Ein Wert von 1 bedeutet, dass das untersuchte Gen beim Patient und der Kontrollperson gleich stark transkribiert wird. Ein Wert über 1 zeigt eine stärkere Genexpression, ein Wert unter 1 eine reduzierte Genexpression beim Patienten an. Ein Wert von 0,5 bedeutet dementsprechend, dass die Genexpression beim Patient nur 50% der Genexpression der Kontrollperson entspricht.

2.7 Durchflusszytometrie

Die Expression des TPO-Rezeptors auf der Oberfläche von Thrombozyten wird mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Diese Analyse erfolgt im PRP (Kapitel 2.5.1.1). Davon werden 5 μL mit 44 μL HTP (Kapitel 2.2) und 1 μL Primärantikörper $\alpha\text{-c-Mpl}$ versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Der Ansatz wird für 8 min bei 200 g und RT zentrifugiert und das Pellet in 100 μL HTP aufgenommen. Anschließend erfolgt die Zugabe von 1 μL Sekundärantikörper Alexa-Flour 488. Nach 15 min wird die Inkubation mit 1,5 mL FACS-Puffer gestoppt. Die c-Mpl-Expression auf der Thrombozytenoberfläche wird über die Signalstärke des PE-markierten Sekundärantikörpers im FACS Canto II von Becton Dickinson bestimmt. Die Auswertung erfolgt mittels der Software Flow Jo von Treestar, Ashland.

FACS-Puffer:

0,1% (w/v) BSA in PBS
partikelfrei filtriert

2.8 Densitometrie

Für eine densitometrische Analyse der Immunblots werden Filme mit ungesättigten Signalstärken eingescannt, bei denen noch von einer linearen „Signal- zu Expressionsstärke“ ausgegangen werden kann. Mittels der Software ImageJ (Wayne Rasband, NIH, USA: <http://rsb.info.nih.gov/ij>) werden die Pixelintensitäten der Signale bestimmt. Die Pixelintensität des untersuchten Proteins teilt man durch jene des GAPDH-Signals. Die Quotienten von TAR-Patient und Kontrollperson werden ins Verhältnis gesetzt und als *Integrated density value* (IDV) angegeben.

2.9 Statistische Auswertungen

Die Bestimmung der statistischen Signifikanz der Muster #1 und #2 mit den Parametern Thrombozytenzahl und Alter der TAR-Patienten erfolgte mit einem Mann-Whitney U-Test.

3 Ergebnisse

3.1 Zeitliche Verläufe der Thrombozytenwerte bei TAR-Patienten

Das TAR-Syndrom wird den BMFSs zugeordnet [68]. Diese sind durch den Mangel einer singulären Blutzellreihe (Zytopenie) bzw. mehrerer Blutzellreihen (Panzytopenie) gekennzeichnet. TAR-Patienten weisen eine reduzierte Anzahl von Thrombozyten auf und haben somit eine Thrombozytopenie. Patienten mit einem BMFS sind durch zunehmendes Knochenmarkversagen charakterisiert. Beim TAR-Syndrom hingegen zeigt sich eine Verbesserung der Thrombozytenwerte. Laut Hall und Hedberg haben betroffene Säuglinge geringere Thrombozytenwerte ($<100/\text{nL}$) als Erwachsene ($100\text{-}150/\text{nL}$) [76, 78]. Allerdings beinhalten diese Studien keine zeitlichen Verläufe einzelner TAR-Patienten, die eine allgemeine Verbesserung der Thrombozytenzahlen belegen. In der vorliegenden Arbeit werden Thrombozytenwerte von 31 TAR-Patienten, davon 15 über einen langen Zeitraum (Median 12 Jahre), dokumentiert. Dazu werden aktuelle Thrombozytenwerte der TAR-Patienten bestimmt sowie Thrombozytenwerte aus den Patientenakten über maximal 26,5 Jahre ausgewertet. Zunächst erfolgt (wie bei Hall und Hedberg) eine globale Betrachtung von 180 Thrombozytenwerten der 31 TAR-Patienten. Hierbei ist zur besseren Übersicht nur ein Thrombozytenwert innerhalb von drei Monaten pro Patient dargestellt. Die Tabelle 8 im Anhang gibt an, wie viele Thrombozytenwerte pro TAR-Patient ausgewertet werden.

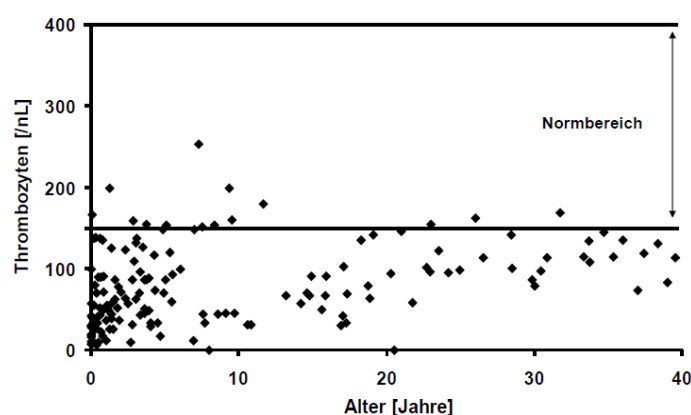


Abb. 10: Verbesserung der Thrombozytenzahlen bei erwachsenen TAR-Patienten. Es sind 180 Thrombozytenwerte von 31 TAR-Patienten dargestellt. Die Thrombozytenwerte von Säuglingen mit TAR-Syndrom liegen vorwiegend unter $100/\text{nL}$. Die Daten zeigen bei TAR-Patienten eine Zunahme der Thrombozytenzahl innerhalb der ersten Lebensjahre. Die Thrombozytenwerte von erwachsenen Patienten erreichen aber kaum den Normbereich. Dieser beträgt $150\text{-}400/\text{nL}$, bei Säuglingen $250\text{-}550/\text{nL}$.

Säuglinge mit TAR-Syndrom haben vorwiegend sehr geringe Thrombozytenzahlen $<100/\text{nL}$ (Abb. 10). Eine Verbesserung dieser erfolgt innerhalb der ersten Lebensjahre. Bei erwachsenen TAR-Patienten liegen die Thrombozytenwerte knapp unterhalb des Referenzbereichs und bleiben über den dokumentierten Beobachtungszeitraum thrombozytopen.

Im Folgenden wird die Altersspanne, in dem der Thrombozytenanstieg stattfindet, durch die Betrachtung von Einzelverläufen genauer untersucht.

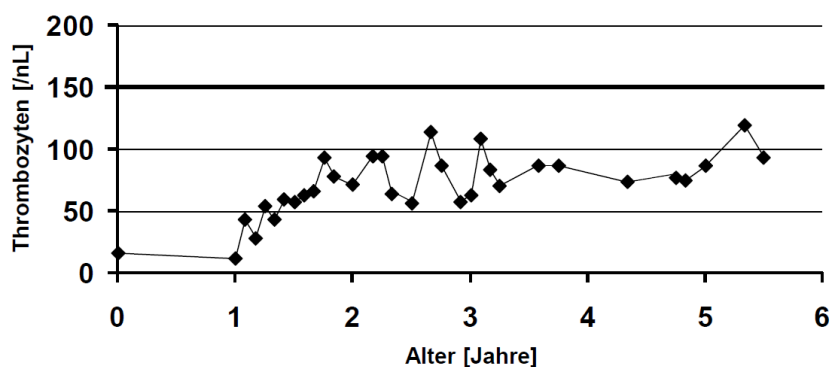


Abb. 11: Verlauf der Thrombozyten bei einer TAR-Patientin mit ansteigender Thrombozytenzahl innerhalb der ersten zwei Lebensjahre. Die Thrombozytenzahl dieser Patientin nimmt innerhalb der ersten zwei Lebensjahre zu, aber erreicht nicht den Normbereich. Diese Abbildung ist repräsentativ für den Thrombozytenverlauf von acht TAR-Patienten.

Bei acht TAR-Patienten nimmt die Thrombozytenanzahl innerhalb der ersten zwei Lebensjahre zu. Die Thrombozytenwerte erreichen aber nicht den Normbereich (Abb. 11). Von 15 TAR-Patienten der Kohorte werden Thrombozytenwerte über einen langen Zeitraum (Median: 12 Jahre, min: 2 Jahre, max: 26,5 Jahre) ausgewertet. Die Einschlusskriterien dieser Analyse lauten: vom Patient sind mindestens drei Thrombozytenwerte über den Zeitraum der ersten zwei Lebensjahre dokumentiert. Es fließt nur ein Thrombozytenwert innerhalb von drei Monaten in die Wertung ein.

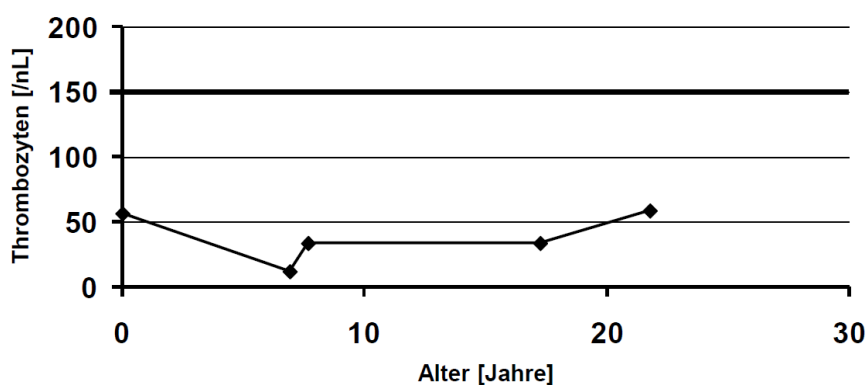


Abb. 12: Verlauf der Thrombozyten bei einer TAR-Patientin mit sehr niedrigen Thrombozytenzahlen über einen Zeitraum von mehr als 20 Jahren. Die Thrombozytenzahl dieser Patientin bleibt über 20 Jahre im schwer thrombopenen Bereich. Diese Abbildung ist repräsentativ für den Thrombozytenverlauf von vier TAR-Patienten.

Die Auswertung der Thrombozytenwerte von 15 TAR-Patienten über mehrere Jahre zeigt bei acht Patienten einen Anstieg der Thrombozytenzahl (Abb. 11). Drei Patienten haben von Geburt an Thrombozytenwerte von 100-150/nL (Daten nicht gezeigt). Vier der 15 Patienten weisen über den beobachteten Zeitraum Thrombozytenzahlen im schwer thrombozytopenen Bereich auf (Abb. 12). Die unterschiedlichen Thrombozytenverläufe der TAR-Patienten korrelieren nicht mit dem Geschlecht, dem Erbgang der Mikrodeletion oder dem Schweregrad der Skelettfehlbildungen der TAR-Patienten (Daten nicht gezeigt).

Entgegen der Studien von Hall und Hedberg zeigen in der untersuchten Kohorte nicht alle TAR-Patienten einen Anstieg der Thrombozytenwerte auf 100-150/nL innerhalb der ersten zwei Lebensjahre. Die Thrombozytenzahl von einem Viertel der Patienten bleibt über den Beobachtungszeitraum stark thrombozytopen.

3.2 Zwei Muster TPO-induzierter Signaltransduktion in Thrombozyten von TAR-Patienten

3.2.1 Keine TPO-induzierte Phosphorylierung von Jak2 in Thrombozyten von TAR-Patienten unter 18 Jahren

Die Mehrheit der TAR-Patienten weist innerhalb der ersten zwei Lebensjahre eine Verbesserung der Thrombozytenwerte auf (Kapitel 3.1). Ob dies mit mehr reifen MKs im Knochenmark einhergeht, kann wegen fehlender Knochenmarkbiopsien nicht direkt bestimmt werden. Als Surrogat für das Maß der Megakaryopoese kann jedoch die TPO-induzierte Signaltransduktion in Thrombozyten herangezogen werden [73, 74]. In den Thrombozyten von fünf TAR-Patienten im Alter von sechs Monaten bis sechs Jahren wurde eine gestörte TPO-induzierte Signaltransduktion nachgewiesen [73]. Ursächlich dafür ist nicht phosphorylierbares Jak2 [74]. In der vorliegenden Arbeit wird die TPO-induzierte Phosphorylierung von Jak2 in einer größeren Patientengruppe inklusive erwachsener TAR-Patienten untersucht. Dazu werden von 23 Patienten und 50 Kontrollpersonen Thrombozyten isoliert und für 10 bzw. 30 min mit 50 ng/mL rhTPO stimuliert. (Kapitel 2.5 und 2.1.2).

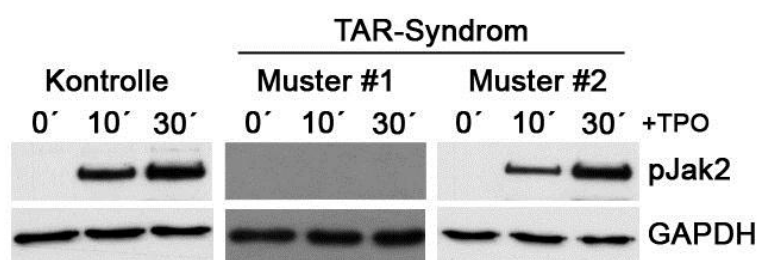


Abb. 13: Zwei Muster TPO-induzierter Jak2-Phosphorylierung in Thrombozyten von TAR-Patienten. Von 23 TAR-Patienten wird per Immunblot die TPO-induzierte Phosphorylierung von Jak2 in Thrombozyten untersucht. Bei 13 Patienten wird kein pJak2 in den TPO-stimulierten Thrombozyten nachgewiesen (Muster #1). Hingegen entsprechen die Signalstärken von pJak2 in den Thrombozyten von elf TAR-Patienten denen der Kontrollpersonen (Muster #2). Die äquivalente Expression von GAPDH bestätigt die Gleichbeladung aller Spuren. Exemplarisch sind die Analysen eines Patienten mit Muster #1 und Muster #2 sowie einer Kontrollperson gezeigt. Die Lysate des Patienten mit Muster #1 wurden gemeinsam mit Martin Wannack hergestellt (0': unstimulierte Thrombozyten, 10' und 30': Thrombozyten für 10 bzw. 30 min mit rhTPO stimuliert).

Bei 13 TAR-Patienten wird kein phosphoryliertes (p)Jak2 in den TPO-stimulierten Thrombozyten detektiert (Muster #1, Abb. 13). Erstaunlicherweise wird in den Thrombozyten von elf TAR-Patienten TPO-induziertes pJak2 wie in den Kontrollpersonen nachgewiesen (Muster #2). Eine Übersicht der TPO-induzierten Phosphorylierung von Jak2 in den Thrombozyten aller TAR-Patienten befindet sich im Anhang in Tabelle 8. Unter den untersuchten 23 TAR-Patienten der Kohorte weist eine Patientin im Alter von 18 Jahren Muster #1, aber mit 22 Jahren Muster #2 auf. Es besteht kein Zusammenhang zwischen den beiden Phosphorylierungsmustern von Jak2 und den stark oder schwach thrombozytopenen Thrombozytenverläufen der TAR-Patienten aus Kapitel 3.1.

Die Muster #1 und #2 werden mit dem Alter, der Thrombozytenzahl bei Blutabnahme, dem Geschlecht, dem Schweregrad der Skelettfehlbildungen und dem Erbgang der Mikrodeletion der TAR-Patienten korreliert.

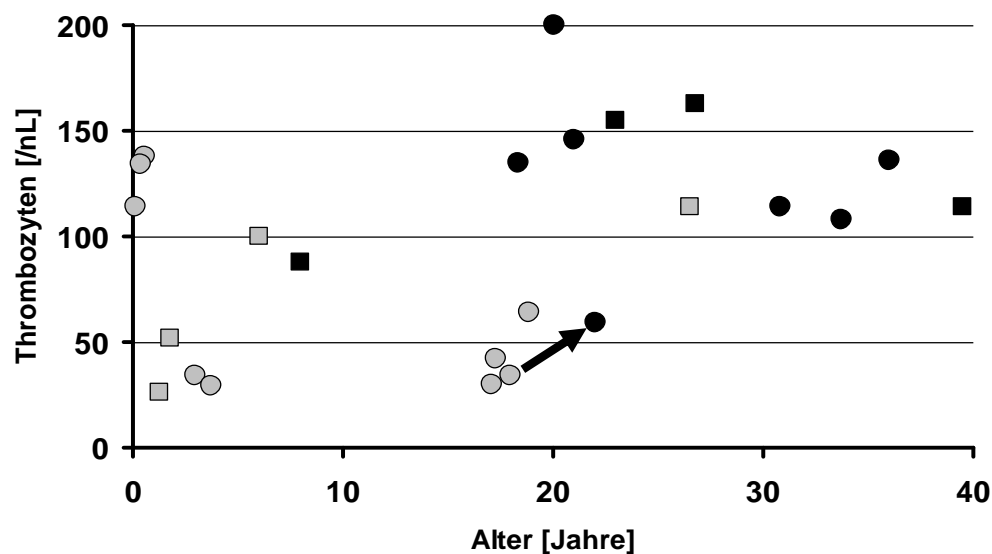


Abb. 14: Muster #1 und #2 korrelieren mit dem Alter und den Thrombozytenzahlen der TAR-Patienten. Die Muster #1 und #2 werden dem Alter, der Thrombozytenzahl bei Blutabnahme und dem Geschlecht zugeordnet. Zwölf der 13 Patienten mit Muster #1 (graue Symbole) sind unter 18 Jahre und haben sehr geringe Thrombozytenzahlen. Zehn der elf Patienten mit Muster #2 (schwarze Symbole) sind Erwachsene mit Thrombozytenzahlen zwischen 100-150/nL. Eine Patientin weist im Alter von 18 Jahren Muster #1 und einhergehend mit einer leicht verbesserten Thrombozytenzahl mit 22 Jahren Muster #2 (Pfeil) auf. Es besteht kein Zusammenhang von Muster #1 und #2 mit dem Geschlecht (Kreis: weiblich, Viereck: männlich).

Die Korrelation der Muster #1 und #2 ist hoch signifikant mit der Thrombozytenzahl ($p < 0,004$) und dem Alter ($p < 0,002$) der Patienten (Abb. 14). Zwölf der 13 Patienten mit Muster #1 (kein pJak2) weisen stark thrombozytopen Thrombozytenzahlen auf ($< 100/nL$) und sind unter 18 Jahre. Im Gegensatz dazu sind zehn der elf Patienten mit Muster #2 (pJak2) Erwachsene mit Thrombozytenwerten knapp unterhalb des Referenzbereichs. Eine Patientin weist im Alter von 18 Jahren Muster #1 und einhergehend mit einer leicht verbesserten Thrombozytenzahl mit 22 Jahren Muster #2 (Pfeil) auf. Es besteht kein Zusammenhang beider Muster mit dem Geschlecht (Abb. 14), der Ausprägung der Skelettfehlbildungen oder dem Erbgang der Mikrodeletion (Daten nicht gezeigt). Der Anstieg der Thrombozytenzahlen innerhalb der ersten zwei Lebensjahre geht dem Wechsel von Muster #1 zu #2 mit dem Eintritt ins Erwachsenenalter voraus. Musterwechsel und Thrombozytenanstieg legen mehr reife MKs im Knochenmark nahe, aber führen trotzdem nicht zu normalen Thrombozytenwerten in Patienten mit Muster #2. Ob daran eine gestörte Signalweiterleitung von pJak2 zu dessen Substraten verantwortlich ist, wird in den Kapiteln 3.2.2 und 3.2.3 untersucht.

In einigen Publikationen wurde in MKs von Feten und Neonaten eine verminderte Reaktivität auf TPO im Vergleich zu MKs von Erwachsenen nachgewiesen [89, 90]. Es liegen in der Literatur keine Analysen über die TPO-induzierte Signaltransduktion in Thrombozyten oder MKs von gesunden Probanden im Kindes- und Jugendalter vor, wobei sich auch diese von der im Erwachsenenalter unterscheiden könnte. Daher wird die TPO-induzierte Signaltransduktion in Thrombozyten von Probanden unter und über 18 Jahren verglichen. Dies klärt, ob die fehlende Jak2-Phosphorylierung ein spezifischer Defekt von TAR-Patienten mit Muster #1 ist oder im Allgemeinen die TPO-induzierte Signaltransduktion in Kindern und Jugendlichen reduziert ist. Hierzu werden von 20 Kontrollpersonen im Alter von drei Monaten bis 18 Jahren und 30 Erwachsenen Thrombozyten isoliert, für 10 bzw. 30 min mit 50 ng/mL rhTPO stimuliert und pJak2 und pSTAT3 nachgewiesen (Kapitel 2.5 und 2.1.2).

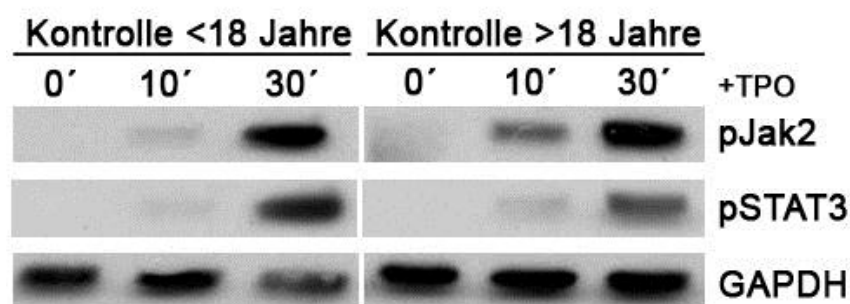


Abb. 15: In den Thrombozyten von Kontrollpersonen unter 18 Jahren wird eine normale TPO-induzierte Signaltransduktion nachgewiesen. Von Kontrollpersonen <18 und >18 Jahren wird die TPO-induzierte Jak/STAT-Signaltransduktion in Thrombozyten per Immunblot analysiert. In beiden Kontrollgruppen werden ähnliche Signalstärken von pJak2 und pSTAT3 nachgewiesen. Die äquivalente Expression von GAPDH bestätigt die Gleichbeladung aller Spuren. Exemplarisch sind Immunblots einer Kontrolle im Kindesalter und im Erwachsenenalter gezeigt (0': unstimulierte Thrombozyten, 10' und 30': Thrombozyten für 10 bzw. 30 min mit rhTPO stimuliert).

In Thrombozyten von 20 Kontrollpersonen <18 Jahren wird die gleiche Signalstärke von pJak2 und pSTAT3 wie in den Thrombozyten von Kontrollen im Erwachsenenalter nachgewiesen (Abb. 15). Daher ist die gestörte TPO-induzierte Signaltransduktion ein spezifischer Defekt bei jungen TAR-Patienten mit Muster #1 und kein genereller Defekt im Kindes- und Jugendalter.

3.2.2 Gestörter Jak/STAT-Signalweg bei TAR-Patienten mit Muster #1

Die Auswirkung von unphosphoryliertem Jak2 in Thrombozyten von TAR-Patienten mit Muster #1 im Gegensatz zu pJak2 bei Patienten mit Muster #2 auf die weitere Signaltransduktion wird durch die Detektion der aktivierten Jak2-Substrate STAT1, 3 und 5 ermittelt (Abb. 16A). Eine Störung der Signalweiterleitung könnte zur Entstehung der Thrombozytopenie beitragen. Es werden von 23 Patienten beider Muster und 50 Kontrollpersonen Thrombozyten isoliert und für 10 bzw. 30 min mit 50 ng/mL rhTPO stimuliert (Kapitel 2.5 und 2.1.2).

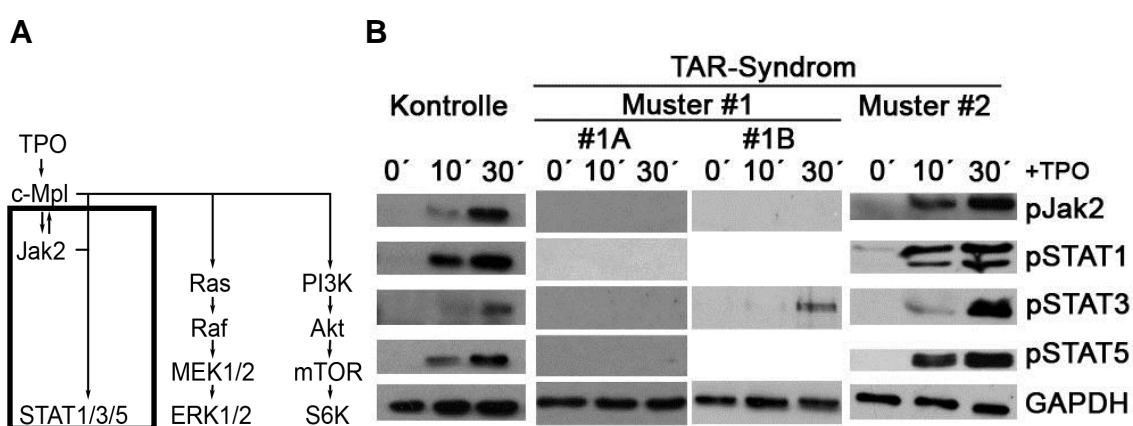


Abb. 16: In den Thrombozyten von TAR-Patienten mit Muster #1 wird kein bzw. nur residual pSTAT3 nachgewiesen. Bei 23 TAR-Patienten mit Muster #1 und #2 und Kontrollpersonen wird per Immunblot die TPO-induzierte Jak/STAT-Signaltransduktion in Thrombozyten analysiert. **A** Überblick der TPO-induzierten Signaltransduktion. Die Box kennzeichnet den Jak/STAT-Signalweg innerhalb der TPO-induzierten Signaltransduktion. **B** In den Thrombozyten von 13 Patienten mit Muster #1 wird kein pJak2 nachgewiesen. Patienten mit Muster #1A weisen auch kein pSTAT1, 3 und 5 auf. Im Gegensatz dazu wird in Patienten mit Muster #1B residual pSTAT3 detektiert. In den Thrombozyten von elf Patienten mit Muster #2 werden vergleichbare Signalstärken von pJak2, pSTAT1, 3 und 5 wie in den Thrombozyten der Kontrollpersonen nachgewiesen. Der Nachweis von pJak2, pSTAT1, 3, 5 und GAPDH des Patienten mit Muster #2 wurde von Martin Wannack durchgeführt [91, Abb. 21 und 22]. Die Lysate des Patienten mit Muster #1 wurden gemeinsam mit Martin Wannack hergestellt. Die Gleichbeladung der Spuren erfolgt durch den Nachweis von GAPDH auf jedem Gel. Ein repräsentatives GAPDH-Gel ist dargestellt. Exemplarisch sind die Analysen eines Patienten mit Muster #1A, Muster #1B und Muster #2 sowie einer Kontrollperson gezeigt. Die Abb. enthält Teilabbildungen von Abb. 13 (Muster #1A), (0': unstimulierte Thrombozyten, 10' und 30': Thrombozyten für 10 bzw. 30 min mit rhTPO stimuliert).

Bei 13 TAR-Patienten mit Muster #1 wird kein pJak2 in den TPO-stimulierten Thrombozyten nachgewiesen (Abb. 13 und 16B). Fünf dieser Patienten weisen auch kein TPO-phosphoryliertes STAT1, 3 und 5 in den Thrombozyten auf (Muster #1A). In den verbleibenden acht TAR-Patienten mit Muster #1 wird residual pSTAT3 detektiert (Muster #1B). Die Expression von Jak2, STAT1, 3 und 5 ist in TAR-Patienten und Kontrollpersonen vergleichbar (Daten nicht gezeigt). In den Thrombozyten von elf Patienten mit Muster #2 werden ähnliche Signalstärken von

pJak2, pSTAT1, 3 und 5 wie bei Kontrollpersonen nachgewiesen. Trotzdem liegen die Thrombozytenzahlen dieser Patienten nicht im Normbereich. Ob dazu eine Störung der Signalweiterleitung des PI3K/Akt- oder Raf/Erk-Wegs beiträgt, wird im anschließenden Kapitel (3.2.5) untersucht.

Folgend wird analysiert, ob TAR-Patienten im Kindesalter eher das Muster #1A aufweisen und im Jugendalter das Muster #1B. Es könnte mit zunehmendem Alter der TAR-Patienten ein schrittweiser Anstieg der Phosphorylierbarkeit von Jak2 stattfinden und zu einem Wechsel von Muster #1A über Muster #1B zu Muster #2 führen. Hierzu werden die Signalintensitäten der entsprechenden Banden auf den Röntgenfilmen (Abb. 16B) von jedem Patienten densitometrisch ausgewertet (Kapitel 2.8).

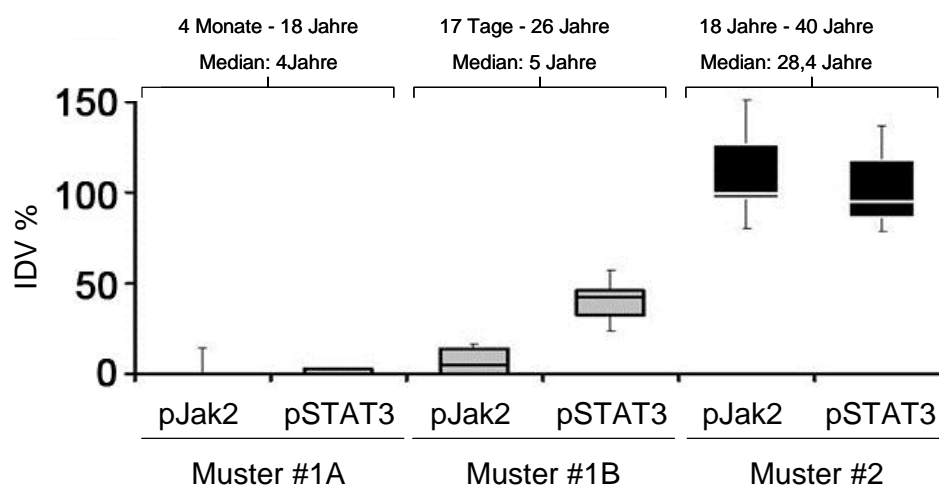


Abb. 17: Die densitometrische Quantifizierung der Signalstärken bestätigt die Muster #1 und #2 und zeigt eine altersunabhängige Verteilung von Muster #1A und #1B bei TAR-Patienten. Die Signalintensitäten der entsprechenden Banden auf den Röntgenfilmen werden von jedem Patienten densitometrisch ausgewertet. Die Boxplots geben die Signalstärken von pJak2 und pSTAT3 der TAR-Patienten im Vergleich zur Kontrollperson an. Dabei ist die Kontrollperson auf 100% gesetzt. Die Thrombozyten der TAR-Patienten mit Muster #1A im Alter von vier Monaten bis 18 Jahren (Median vier Jahre) weisen kein pJak2 und pSTAT3 auf. In Thrombozyten von Patienten mit Muster #1B im Alter von 17 Tagen bis 26,5 Jahren (Median fünf Jahre) wird kaum pJak2 und residual pSTAT3 detektiert (grau). Thrombozyten von TAR-Patienten mit Muster #2 (schwarz) weisen gleiche Signalstärken von pJak2 und pSTAT3 wie die Kontrollpersonen auf. IDV = Angabe der Phosphorylierung von Jak2 bzw. pSTAT3 im Vergleich zum Gesundspender in %.

Die densitometrische Auswertung der Signalstärken der Röntgenfilme bestätigt die Muster #1 und #2 (Abb. 17). Nur in den Thrombozyten der TAR-Patienten mit Muster #2 werden gleiche Signalstärken von pJak2 und pSTAT3 wie in den Thrombozyten der Kontrollpersonen nachgewiesen. In den Thrombozyten von TAR-Patienten im Alter von vier Monaten bis 18 Jahren (Median vier Jahre) mit Muster #1A liegt kein pJak2 und pSTAT3 vor. Bei Patienten mit Muster #1B zwischen 17 Tagen und 26,5 Jahren (Median fünf Jahre) wird kein pJak2 aber residual

phosphoryliertes STAT3 in Thrombozyten detektiert. Somit kann bei Patienten mit Muster #1 kein schrittweiser Anstieg der Phosphorylierbarkeit von Jak2 mit zunehmendem Alter nachgewiesen werden. Durch die densitometrische Auswertung wird das residual phosphorylierte STAT3 in Patienten mit Muster #1B verdeutlicht. Dies macht bis zu 50% der Signalstärke in Kontrollpersonen aus. Daraus lässt sich ein Jak2-unabhängiger, aber TPO-abhängiger Mechanismus, der zur Signaltransduktion bei TAR-Patienten mit Muster #1B beiträgt, mutmaßen.

Zunächst gilt es Tyk2, als möglichen Kandidaten der STAT3-Phosphorylierung, zu untersuchen. Dieses wird ebenfalls neben Jak2 in MKs exprimiert (Abb. 18A), auch wenn *in vitro*-Studien humaner Zelllinien zeigten, dass für die TPO-induzierte Signaltransduktion nur funktionelles Jak2, aber nicht Tyk2 notwendig ist [32]. Es werden von drei Patienten mit Muster #1B, fünf Patienten mit Muster #2 und acht Kontrollpersonen Thrombozyten isoliert und für 10 bzw. 30 min mit 50 ng/mL rhTPO stimuliert (Kapitel 2.5 und 2.1.2).

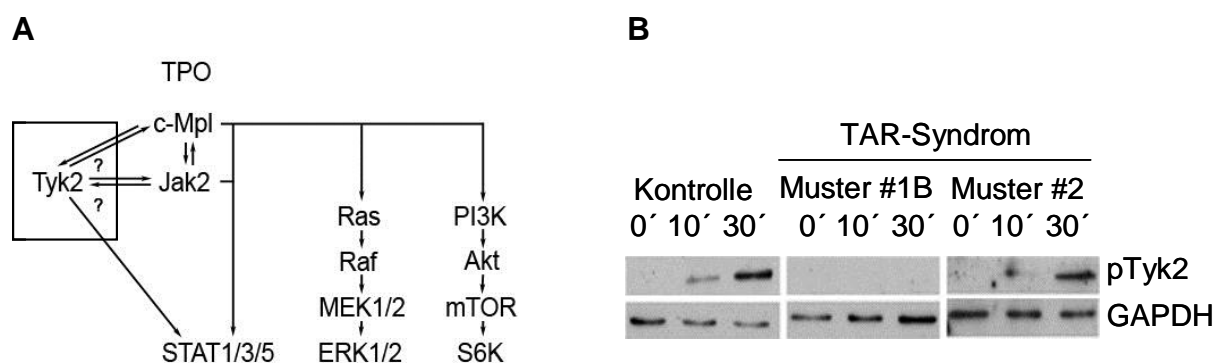


Abb. 18: Die Thrombozyten der Patienten mit Muster #1B weisen kein pTyk2 auf. Von drei Patienten mit Muster #1B und fünf Patienten mit Muster #2 wird per Immunblot die Phosphorylierung von Tyk2 in TPO-stimulierten Thrombozyten analysiert. **A** Überblick der TPO-induzierten Signaltransduktion. Die Box kennzeichnet Tyk2 innerhalb des Jak/STAT-Signalwegs. **B** In Thrombozyten der Patienten mit Muster #1B wird kein pTyk2 detektiert, die der Patienten mit Muster #2 weisen gleiche Signalstärken von pTyk2 wie die Kontrollpersonen auf. Die äquivalente Expression von GAPDH bestätigt die Gleichbeladung aller Spuren. Exemplarisch sind die Analysen eines Patienten mit Muster #1B und Muster #2 sowie einer Kontrollperson gezeigt (0': unstimulierte Thrombozyten, 10' und 30': Thrombozyten für 10 bzw. 30 min mit rhTPO stimuliert).

In den TPO-stimulierten Thrombozyten von TAR-Patienten mit Muster #1B wird kein pTyk2 detektiert (Abb. 18B). Daher kann die Aktivierung von STAT3 nicht durch pTyk2 erfolgen und Tyk2 trägt zu keiner Jak2-unabhängigen, aber TPO-abhängigen Signaltransduktion bei. Die Thrombozyten von Patienten mit Muster #2 weisen gleiche Signalstärken von pTyk2 wie die Kontrollpersonen auf. Tyk2 zeigt die gleichen beiden Phosphorylierungsmuster wie Jak2 bei Patienten mit TAR-Syndrom.

Es wird untersucht, ob residual phosphoryliertes STAT3 in Thrombozyten von TAR-Patienten mit Muster #1B durch einen Jak2-unabhängigen, aber TPO-abhängigen Mechanismus vorliegt oder eher als Artefakt des Experimentaufbaus detektierbar ist. Hierfür wird die Auswirkung von drei Jak2-Kinaseaktivität inhibierenden Substanzen in Thrombozyten bestimmt. Es werden gezielt unterschiedliche Konzentrationen und Inkubationszeiten der Inhibitoren gewählt, um eine Bandbreite der Inhibierung zu erhalten. Dazu werden Thrombozyten von zwei Probanden isoliert, die Jak2-Kinaseaktivität mittels WP1066, Jak2-Inhibitor (Jak2 inh.) oder AG490 (unterschiedliche Konzentrationen und Inkubationszeiten) inhibiert und anschließend für 10 bzw. 30 min mit 50 ng/mL rhTPO stimuliert (Kapitel 2.5 und 2.1.2).

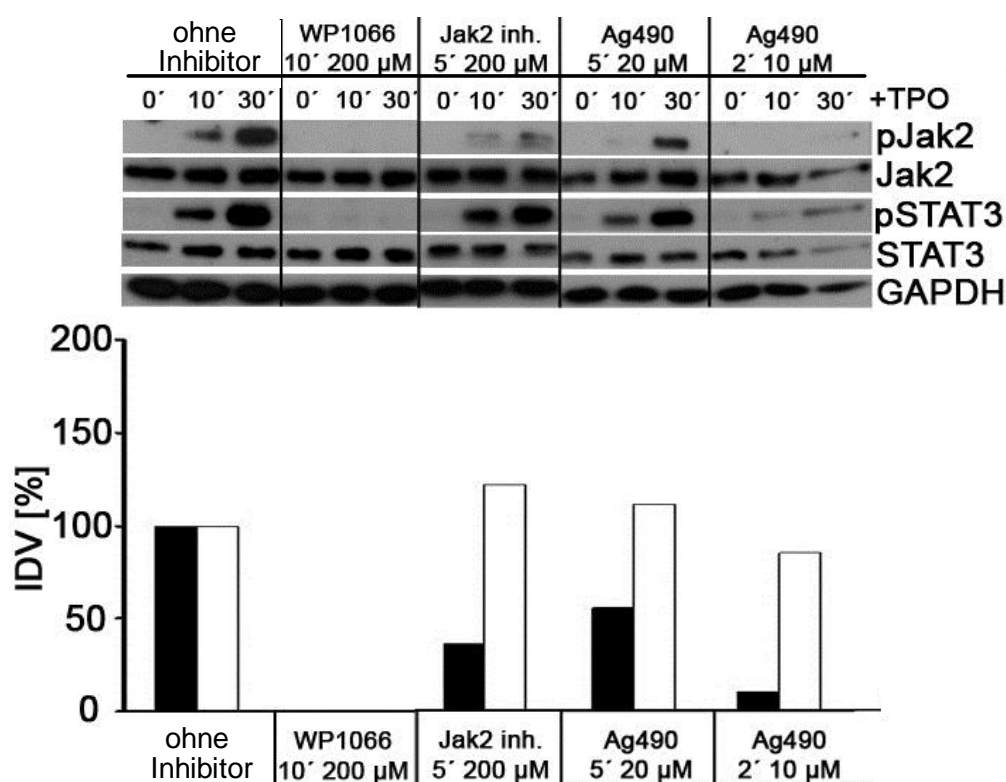


Abb. 19: Detektion von pSTAT3 trotz Inhibierung der Jak2-Kinaseaktivität. In Thrombozyten von Probanden wird die Kinaseaktivität von Jak2 inhibiert und die Auswirkungen auf die TPO-induzierte Signaltransduktion mittels Immunblot analysiert. **Oben:** Unter Einwirkung von 200 µM WP1066 für 10 min ist in den Thrombozyten eines Probanden keine Phosphorylierung von Jak2 und STAT3 nachweisbar. Bei Thrombozyten eines Probanden führt die suboptimale Inhibierung der Jak2-Kinaseaktivität durch Jak2 Inh. (200 µM für 5 min) und AG490 (20 µM für 5 min bzw. 10 µM für 2 min) zum Nachweis eines starken Signals von pSTAT3 und einem schwachen pJak2-Signal. Äquivalente Expressionen von Jak2, STAT3 und GAPDH bestätigen die Gleichbeladung aller Spuren (0': unstimulierte Thrombozyten, 10' und 30': Thrombozyten für 10 bzw. 30 min mit rhTPO stimuliert). **Unten:** Die densitometrische Auswertung der Signalstärken (30 min mit rhTPO stimuliert) verdeutlicht die Ergebnisse des Immunblots. (schwarze Balken: pJak2, weiße Balken: pSTAT3). IDV = Angabe der Phosphorylierung von Jak2 und STAT3 im Vergleich zum Probanden ohne Inhibitoreinfluss in %.

Werden Thrombozyten von Probanden mit 200 μM WP1066 für 10 min behandelt, wird kein TPO-induziertes pJak2 und pSTAT3 detektiert (Abb. 19). Diese Situation entspricht jener in TAR-Patienten mit Muster #1A. Die Situation eines TAR-Patienten mit Muster #1B wird durch die Inkubation der Thrombozyten mit 10 μM Ag490 für 2 min nachgeahmt. Jak2 ist nicht, aber STAT3 ist residual phosphoryliert. Wird in Thrombozyten von Probanden trotz Inhibitoreinfluss residuales pJak2 detektiert, ist die Signalstärke von pSTAT3 vergleichbar mit der Signalstärke von pSTAT3 ohne Inhibitoreinfluss (Jak2 inh: 200 μM für 5 min, Ag490: 20 μM für 5 min). Diese Daten legen nahe, dass das residual phosphorylierte STAT3 in den Thrombozyten der TAR-Patienten mit Muster #1B und in Probanden unter Einfluss von 10 μM Ag490 für 2 min eher nicht durch einen Jak2-unabhängigen, aber TPO-abhängigen Mechanismus zustande kommt. Wahrscheinlich kommt das pSTAT3-Signal durch die hohe Sensitivität des verwendeten pSTAT3-Ak im Vergleich zum pJak2-Ak oder durch restaktiviertes Jak2 zu Stande. Die Daten bestätigen die gestörte TPO-abhängige Signaltransduktion in Thrombozyten von Patienten mit Muster #1B trotz vorliegendem pSTAT3.

3.2.3 Jak2 ist die Schlüsselkinase der TPO-abhängigen Signalweiterleitung

Neben dem Jak/STAT-Signalweg sind auch der TPO-induzierte PI3K/Akt- und Raf/Erk-Signalweg an der Proliferation von MKs und somit der Thrombozytenbiogenese beteiligt (Abb. 20A). Eine Störung in der Signalweiterleitung dieser beiden TPO-induzierten Signalwege könnte zu den Thrombozytenwerten knapp unterhalb des Referenzbereichs der TAR-Patienten mit Muster #2 beitragen. Es werden von drei Patienten mit Muster #1, fünf Patienten mit Muster #2 und acht Kontrollpersonen Thrombozyten isoliert und für 10 bzw. 30 min mit 50 ng/mL rhTPO stimuliert (Kapitel 2.5 und 2.1.2).

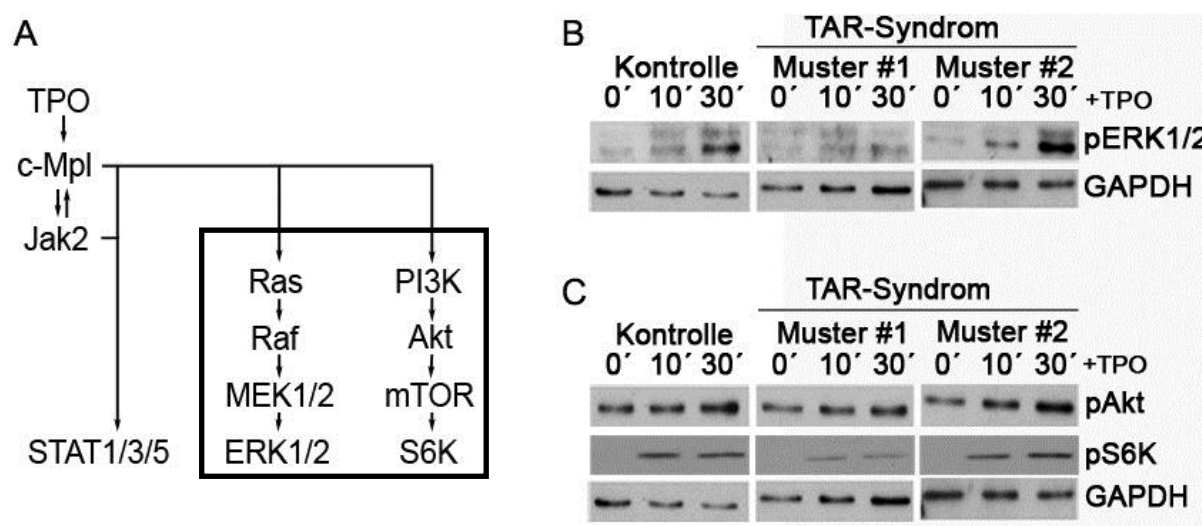


Abb. 20: Die TPO-stimulierten Thrombozyten der TAR-Patienten weisen die beiden Phosphorylierungsmuster auch im PI3K/Akt- und Raf/Erk-Signalweg auf. Bei acht TAR-Patienten mit Muster #1 und #2 sowie Kontrollpersonen wird die TPO-induzierte Signaltransduktion des PI3K/Akt- und Raf/Erk-Signalwegs per Immunblot analysiert. **A** Überblick der TPO-induzierten Signaltransduktion. Die Box kennzeichnet den TPO-induzierten PI3K/Akt- und den Raf/Erk-Signalweg. **B** In den Thrombozyten von Patienten mit Muster #1 wird kein pERK1/2 nachgewiesen, wohingegen in den Thrombozyten der Patienten mit Muster #2 und der Kontrollpersonen ähnliche Signalstärken an pERK1/2 detektiert werden. **C** In den Thrombozyten von Patienten mit Muster #1 wird basal pAkt sowie eine TPO-induzierte reduzierte Signalstärke an pS6K im Vergleich zu Kontrollpersonen nachgewiesen. Die Thrombozyten von Patienten mit Muster #2 und Kontrollpersonen weisen ähnliche Signalstärken an pS6K sowie basales pAkt auf, dessen Menge nach TPO-Stimulation zunimmt. Die Gleichbeladung der Spuren erfolgt durch den Nachweis von GAPDH auf jedem Gel. Ein repräsentatives GAPDH-Gel ist dargestellt. Exemplarisch sind die Analysen an einem Patienten mit Muster #1 und Muster #2 sowie einer Kontrollperson gezeigt (0': unstimulierte Thrombozyten, 10' und 30': Thrombozyten für 10 bzw. 30 min mit rhTPO stimuliert).

In den Thrombozyten von Patienten mit Muster #1 wird kein pERK1/2 nachgewiesen (Abb. 20B). Die Signalstärken von TPO-induziertem pERK1/2, pAkt, pmTOR (Daten nicht gezeigt) und pS6K sind in den Thrombozyten von Patienten mit Muster #2 und Kontrollspendern vergleichbar (Abb. 20B und C). Darunter sind die Moleküle Akt und mTOR bereits TPO-unabhängig phosphoryliert und daher auch in den Thrombozyten der Patienten mit Muster #1 nachweisbar. Hingegen wird die Aktivierung des mTOR-Substrats S6K TPO-abhängig induziert. In den Thrombozyten der Patienten mit Muster #1 ist die Signalstärke von TPO-induzierter S6K im Vergleich zu Kontrollspendern reduziert. Nur in den Thrombozyten der Patienten mit Muster #2 und der Kontrollspender nehmen die Signalstärken von pAkt nach TPO-Stimulation zu. Zusammengefasst weisen die TPO-stimulierten Thrombozyten der TAR-Patienten mit Muster #1 auch einen gestörten PI3K/Akt- und Raf/Erk-Signalweg und Patienten mit Muster #2 eine intakte Signaltransduktion dieser Wege auf. Letztere führt aber nicht zu normalen Thrombozytenzahlen bei TAR-Patienten mit Muster #2.

Die Rolle von pJak2 in der TPO-vermittelten Signaltransduktion lässt sich durch die Inhibition der Jak2-Kinaseaktivität aufklären. Hierzu werden Thrombozyten eines Probanden isoliert, die Kinaseaktivität von Jak2 inhibiert (WP1066 bzw. Jak2 inh.) und anschließend die Thrombozyten für 10 bzw. 30 min mit 50 ng/mL rhTPO stimuliert (Kapitel 2.5 und 2.1.2).

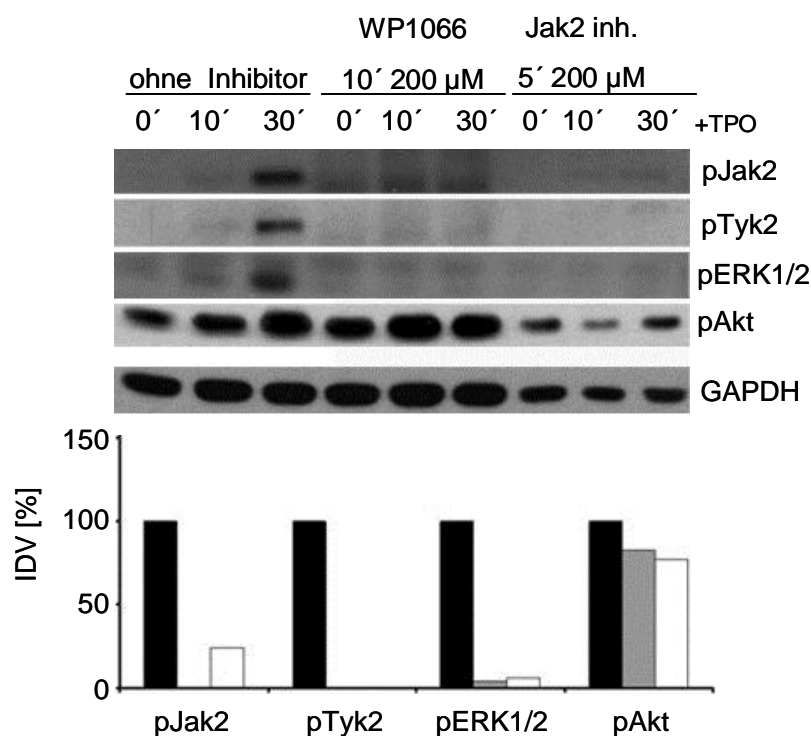


Abb. 21: Jak2 ist die Schlüsselkinase in der TPO-induzierten Signaltransduktion. In den Thrombozyten eines Probanden wird die Kinaseaktivität von Jak2 inhibiert und die Auswirkung auf die TPO-induzierte Signaltransduktion mittels Immunblot analysiert. **Oben:** Die Thrombozyten eines Probanden weisen eine unauffällige TPO-induzierte Signaltransduktion auf (ohne Inhibitoreinfluss). In den Thrombozyten wird nach Zugabe eines Inhibitors der Jak2-Kinaseaktivität (WP1066 bzw. Jak2 inh.) kein pJak2, pTyk2 und pERK1/2 nachgewiesen. Die Signalstärke von pAkt ist nur geringfügig reduziert und TPO-unabhängig nachweisbar. Die äquivalente Expression von GAPDH wird repräsentativ von einem der zwei Experimentansätze gezeigt und legt eine Gleichbeladung aller Spuren nahe. (0': unstimulierte Thrombozyten, 10' und 30': Thrombozyten für 10 bzw. 30 min mit rhTPO stimuliert). **Unten:** Die densitometrische Auswertung der Signalstärken (30 min mit rhTPO stimuliert) verdeutlicht die Ergebnisse des Immunblots. (schwarze Balken: ohne Inhibitor, graue Balken: WP1066 behandelt, weiße Balken: Jak2 inh. behandelt). IDV = Angabe der Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrollperson ohne Inhibitoreinfluss in %.

In den Thrombozyten eines Probanden wird ohne Inhibitoreinfluss eine unauffällige TPO-induzierte Signaltransduktion detektiert (Abb. 21). Wird in den Thrombozyten die Jak2-Kinaseaktivität mittels WP1066 oder Jak2 inh. inhibiert, kann kein pJak2, pTyk2 oder pERK1/2 nachgewiesen werden. Darüber hinaus ist die Signalstärke an basal phosphoryliertem Akt reduziert. Diese Ergebnisse beweisen *ex vivo* die Schlüsselrolle von pJak2 in der TPO-abhängigen Signaltransduktion in Thrombozyten und das Akt auch TPO-unabhängig aktiviert wird.

3.2.4 Thrombozyten von TAR-Patienten mit Muster #1 weisen leicht reduziertes c-Mpl auf

Folgende Punkte konnten bereits als Ursache für die Thrombozytopenie im TAR-Syndrom ausgeschlossen werden: Weder der Thrombopoietinrezeptor c-Mpl (Abb. 22A) noch die kodierenden Bereiche von JAK2 sind mutiert [81, 91]. Synthetisiertes TPO ist biologisch aktiv und es liegt ein erhöhter TPO-Plasmaspiegel vor [73, 81]. Letzterer sowie die gestörte TPO-induzierte Signaltransduktion in TAR-Patienten weisen auf einen Defekt in c-Mpl hin. Dessen Rolle beim TAR-Syndrom wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Eine Arbeitsgruppe detektierte in Thrombozyten und MKs von TAR-Patienten mittels Immunblot reduzierte Proteinmengen vom TPO-Rezeptor [80]. Eine andere Gruppe bestimmte per Durchflusszytometrie eine zu Kontrollen vergleichbare c-Mpl-Expression auf der Thrombozytenoberfläche von TAR-Patienten [73]. Daher erfolgt ein Vergleich beider Methoden an Proben von denselben TAR-Patienten. Zuerst wird mittels Durchflusszytometrie die Expression des TPO-Rezeptors auf der Thrombozytenoberfläche von acht TAR-Patienten beider Muster und Kontrollpersonen bestimmt (Kapitel 2.7).

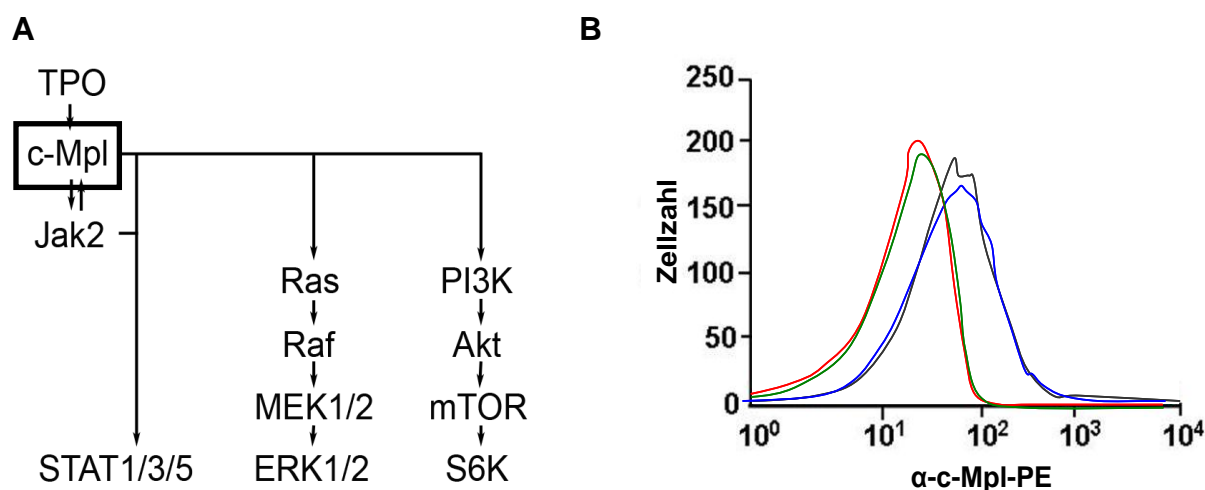


Abb. 22: TAR-Patienten beider Muster und Kontrollpersonen zeigen eine vergleichbare c-Mpl-Expression auf der Thrombozytenoberfläche. Bei Patienten und Kontrollspendern wird mittels Durchflusszytometrie die c-Mpl-Expression auf der Thrombozytenoberfläche bestimmt. **A** Überblick der TPO-induzierten Signaltransduktion. Die Box kennzeichnet den TPO-Rezeptor c-Mpl. **B** Das Histogramm zeigt bei einem TAR-Patienten mit Muster #1 und einer Kontrollperson die gleiche Expression von c-Mpl auf der Thrombozytenoberfläche (Kontrolle (grün) und Patient (rot): ohne c-Mpl-Ak, Kontrolle (grau) und Patient (blau): mit c-Mpl-Ak). Es ist die Fluoreszenzintensität gegen die Zellzahl aufgetragen. Ein repräsentatives Experiment der acht untersuchten Patienten ist dargestellt.

Die durchflusszytometrische Analyse weist unabhängig vom Phosphorylierungsmuster in allen untersuchten TAR-Patienten und Kontrollpersonen eine vergleichbare

Expression von c-Mpl auf der Thrombozytenoberfläche nach (Abb. 22B). Anschließend erfolgt per Immunblot die Bestimmung der Proteinmenge von c-Mpl in den Thrombozyten dieser acht Patienten und Kontrollpersonen (Kapitel 2.1.2 und 2.5.1).

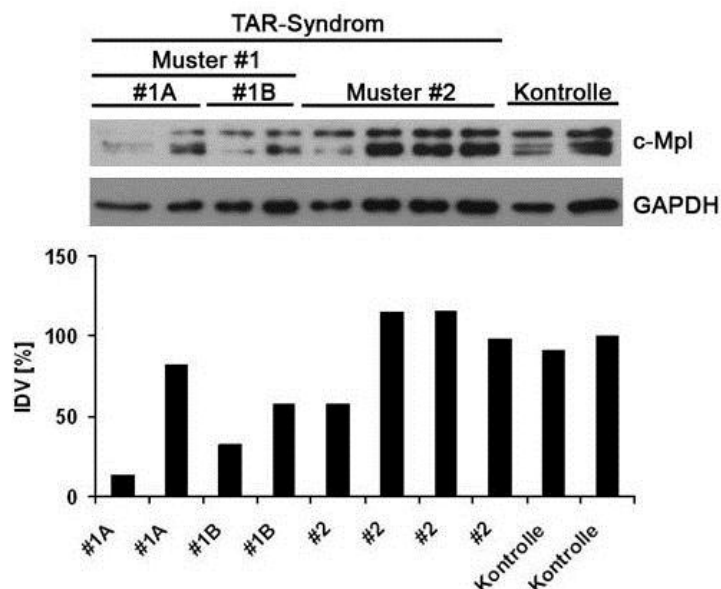


Abb. 23: In den Thrombozyten von TAR-Patienten mit Muster #1 ist die Proteinmenge von c-Mpl leicht reduziert. In den Thrombozyten von TAR-Patienten und Kontrollpersonen wird mittels Immunblot die Proteinmenge von c-Mpl bestimmt. **Oben:** Die Thrombozyten von Patienten mit Muster #1 weisen leicht reduzierte Mengen von c-Mpl auf. In den Thrombozyten von Kontrollpersonen und Patienten mit Muster #2 sind die Signalstärken von c-Mpl vergleichbar. Die äquivalente Expression von GAPDH bestätigt die Gleichbeladung aller Spuren. **Unten:** Eine densitometrische Auswertung der Signalstärken verdeutlicht die Ergebnisse des Immunblots. IDV = Angabe der Menge an c-Mpl im Vergleich zur Kontrollperson in %.

Nur in den Thrombozyten von TAR-Patienten mit Muster #1 wird eine minimal reduzierte Menge an c-Mpl im Vergleich zu den Kontrollpersonen nachgewiesen (Abb. 23). Eine densitometrische Analyse bestätigt diese Reduktion, auch wenn die Unterschiede statistisch nicht signifikant sind. In den Thrombozyten von Patienten mit Muster #2 entsprechen die Signalstärken von c-Mpl annähernd denen in Kontrollpersonen. Die reduzierte Proteinmenge an c-Mpl bei Patienten mit Muster #1 könnte zur gestörten TPO-induzierten Signaltransduktion beitragen. In den Thrombozyten von TAR-Patienten mit dem Muster #1A und #1B werden keine unterschiedlichen Proteinmengen von c-Mpl nachgewiesen. Da adulte Patienten mit Muster #2 analog zu den Kontrollpersonen vergleichbare Mengen des Proteins aufweisen, ist eine reduzierte Expression als Ursache für das TAR-Syndrom eher unwahrscheinlich.

3.3 Der prozentuale Anteil unreifer Thrombozyten (IPF%) ist bei TAR-Patienten mit Muster #2 nicht erhöht

Das Phosphorylierungsmuster #1 konnte bei TAR-Patienten unter 18 Jahren bestimmt werden. Diese haben kein TPO-induzierbares pJak2 und sind durch sehr geringe Thrombozytenzahlen (<100/nL) gekennzeichnet. Muster #2 wiederum ist auf TAR-Patienten über 18 Jahren beschränkt, die pJak2 und Thrombozytenzahlen knapp unterhalb des Referenzbereichs aufweisen (Abb. 14). Ob der Wechsel von Muster #1 zu Muster #2 sowie der Thrombozytenanstieg innerhalb der ersten zwei Lebensjahre (Kapitel 3.1) mit einer vermehrten Anzahl reifer MKs im Knochenmark einhergeht, kann auf Grund fehlender Knochenmarkbiopsien nicht direkt bestimmt werden. Als Surrogat kann der Anstieg des IPF%-Werts im Blut herangezogen werden. Hierbei handelt es sich um neu gebildete Thrombozyten, die im Vergleich zu reifen Thrombozyten größer sind und einen hohen RNA-Gehalt aufweisen. Ihr Anteil im peripheren Blut bei Kontrollpersonen liegt bei ein bis sechs Prozent [92]. Von 16 Patienten mit TAR-Syndrom wird der IPF%-Wert im Blutzellzähler Sysmex XE-2100 bestimmt und nach dem Phosphorylierungsmuster gruppiert.

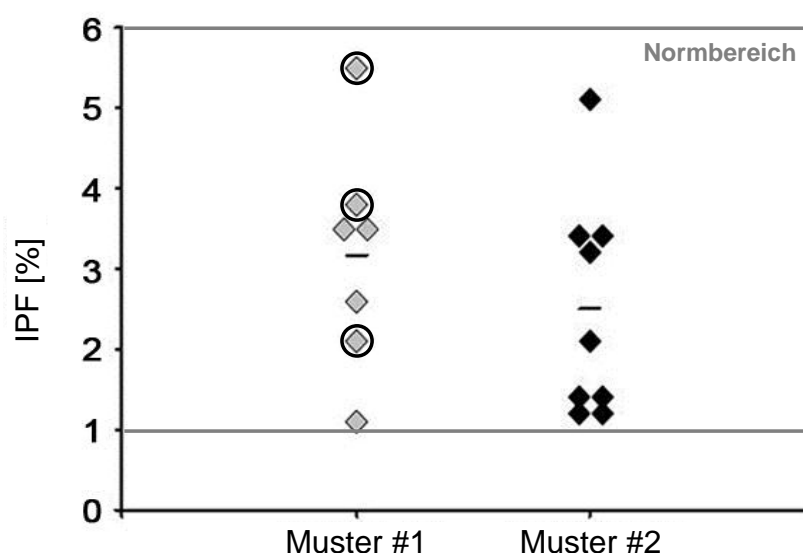


Abb. 24: TAR-Patienten mit Muster #2 haben keine erhöhten IPF%-Werte im Vergleich zu Patienten mit Muster #1. Die IPF%-Werte der TAR-Patienten werden im Blutzellzähler bestimmt und nach dem Phosphorylierungsmuster geordnet dargestellt (grau: TAR-Patienten mit Muster #1, schwarz: TAR-Patienten mit Muster #2). Die TAR-Patienten weisen normale IPF%-Werte auf. TAR-Patienten mit dem Muster #1 haben leicht höhere IPF%-Werte als TAR-Patienten mit dem Muster #2. Die horizontale Markierung gibt den Median der Population an. Drei TAR-Patienten unter zwei Jahren (durch Kreis gekennzeichnet) haben IPF-Werte über den gesamten Normbereich verteilt. Dieser beträgt 1 bis 6%. IPF = unreife Thrombozyten-Fraktion.

Alle untersuchten TAR-Patienten weisen IPF%-Werte im Normbereich auf (Abb. 24). Bei sieben Patienten mit Muster #1 liegt der Median vom IPF%-Wert bei 3,2%, bei neun Patienten mit Muster #2 bei 2,5%. Dieser Unterschied ist statistisch nicht signifikant. Drei Patienten mit Muster #1 sind zwischen einem halben Jahr und zwei Jahren alt. Deren IPF%-Werte von 2,1; 5,5 und 3,8 zeigen eine Streuung über den gesamten Normbereich. Dieses Ergebnis deutet bei TAR-Patienten auf eine unveränderte Anzahl reifer MKs im Knochenmark nach dem Thrombozytenanstieg innerhalb der ersten zwei Lebensjahre und dem Musterwechsel mit 18 Jahren hin.

3.4 Normale Plasmaspiegel von SDF-1 und FGF-4 bei TAR-Patienten

Zur Thrombozytenbiogenese tragen auch TPO-unabhängige Mechanismen bei, da TPO^{-/-}- und c-Mpl^{-/-}-Mäuse lebensfähig sind mit nur 10% der normalen Thrombozytenzahl (Kapitel 1.2.3) [53-55, 57]. SDF-1 und FGF-4 unterstützen die Thrombozytenbiogenese und vermitteln die Migration von MKs aus der Stammzellnische zur Blutbahn, deren Reifung sowie die Abschnürung der Thrombozyten [62, 93]. Die Applikation beider Zytokine in TPO^{-/-}- bzw. c-Mpl^{-/-}-Mäusen geht mit einer vorübergehend normalen Thrombozytenzahl einher [61]. Daher wird untersucht, ob bei TAR-Patienten der Reifungsdefekt von MKs mit einem geringen SDF-1 oder FGF-4 Plasmaspiegel bzw. mit einer reduzierten Proteinmenge des SDF-1-Rezeptors CXCR4 assoziiert ist. Dazu werden von zehn TAR-Patienten beider Phosphorylierungsmuster, zwei del-Trägern und Kontrollpersonen die Plasmaspiegel beider Zytokine per Sandwich-ELISA (Kapitel 2.5.2) sowie in Thrombozyten die Proteinmenge von CXCR4 mittels Immunblot (Kapitel 2.1.2 und 2.5.1) bestimmt.

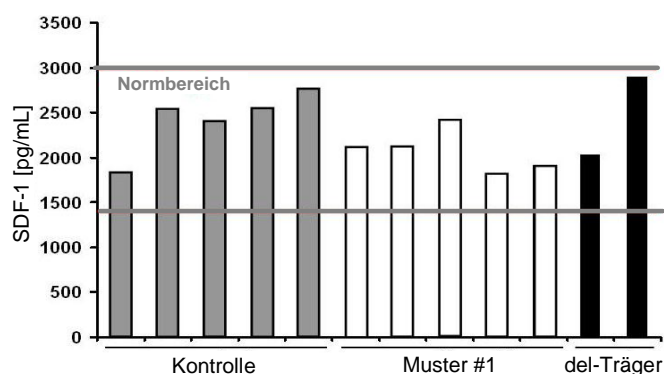


Abb. 25: Die Plasmaspiegel von SDF-1 in TAR-Patienten mit Muster #1 befinden sich im Normbereich. Mittels Sandwich-ELISA werden im EDTA-Plasma von Kontrollen (graue Balken), Patienten mit Muster #1 (weiße Balken) und del-Trägern (schwarze Balken) normale SDF-1-Werte bestimmt. Der Referenzbereich beträgt 1400-3000 SDF-1 pg/mL.

Bei Patienten mit Muster #1, del-Trägern und Kontrollpersonen liegen die Plasmaspiegel von SDF-1 innerhalb des Normbereichs (Abb. 25). Ebenso sind bei Patienten mit Muster #1 und #2, del-Trägern und Kontrollpersonen die Plasmaspiegel von FGF-4 unauffällig (Daten nicht gezeigt). In den Thrombozyten von TAR-Patienten beider Phosphorylierungsmuster, Kontrollpersonen und del-Trägern werden gleiche Proteinmengen von CXCR4 nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Diese Daten deuten darauf hin, dass zu den niedrigen Thrombozytenzahlen in TAR-Patienten weder verminderte Plasmaspiegel von SDF-1 und FGF-4, noch eine Reduktion an CXCR4 beitragen. Jedoch kann ein lokaler Mangel der Zytokine im Knochenmark durch die Analyse im Blut nicht ausgeschlossen werden.

3.5 Beitrag der Mikrodeletion zur Thrombozytopenie im TAR-Syndrom

3.5.1 Unauffällige TPO-induzierte Signaltransduktion in Thrombozyten von Eltern mit und ohne Mikrodeletion

Über 80 TAR-Patienten weisen eine Mikrodeletion auf Chromosom 1 (Abb. 6) auf (persönliche Mitteilung von Eva Klopocki). Bei 75% der Patienten wird diese von einem gesunden Elternteil ohne TAR-Syndrom (del-Träger) vererbt [83]. Es wird nun bestimmt, ob die Mikrodeletion in del-Trägern eine Auswirkung auf die TPO-induzierte Signaltransduktion hat. Darüber hinaus wird die TPO-induzierte Signaltransduktion in Elternteilen ohne Mikrodeletion analysiert. Daher werden Thrombozyten von elf del-Trägern, vier Elternteilen ohne Mikrodeletion sowie von Kontrollspendern isoliert und für 10 bzw. 30 min mit 50 ng/mL rhTPO stimuliert (Kapitel 2.5 und 2.1.2).

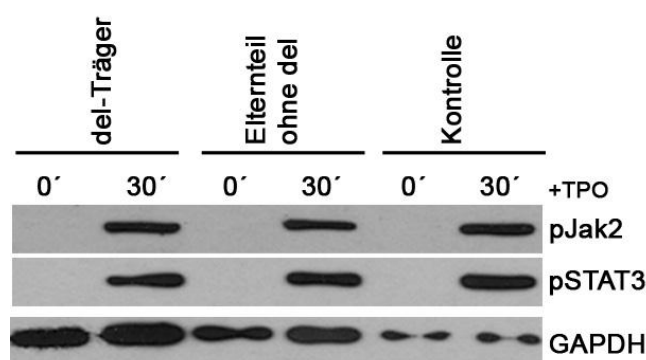


Abb. 26: Die Thrombozyten von del-Trägern und Elternteilen ohne Mikrodeletion weisen eine unauffällige TPO-induzierte Signaltransduktion auf. In den Thrombozyten von del-Trägern und Elternteilen ohne Mikrodeletion wird die TPO-induzierte Jak/STAT-Signaltransduktion per Immunblot analysiert. Die Thrombozyten von del-Trägern und Elternteilen ohne Mikrodeletion weisen ähnliche Signalstärken von pJak2 und pSTAT3 wie die Kontrollpersonen auf. GAPDH wird als Ladekontrolle angegeben. Exemplarisch sind die Analysen an einem del-Träger, einem Elternteil ohne Mikrodeletion und einer Kontrollperson gezeigt (0': unstimulierte Thrombozyten, 10' und 30': Thrombozyten für 10 bzw. 30 min mit rhTPO stimuliert).

In den Thrombozyten von del-Trägern und Elternteilen ohne Mikrodeletion (Abb. 26) wird eine unauffällige TPO-induzierte Signaltransduktion nachgewiesen. Die Signalstärken von pJak2 und pSTAT3 sind mit denen der Kontrollpersonen vergleichbar. Dies steht im Einklang mit den im Normbereich liegenden Thrombozytenzahlen der Elternteile (Daten nicht gezeigt). Somit hat die Mikrodeletion allein keinen negativen Einfluss auf die TPO-induzierte Signaltransduktion.

3.5.2 Unauffällige mRNA-Expression der Mikrodeletionsgene in LCLs

Der minimale Deletionsbereich umfasst zwölf annotierte Gene (Abb. 6). Auf dem nicht betroffenen Allel weisen die kodierenden Bereiche dieser Gene keine Mutationen auf, ANKRD34 und NUDT17 wurden allerdings nicht überprüft [83]. Ob eine Promotermutation in einem der Deletionsgene vorliegt, wird indirekt durch die Bestimmung des mRNA-Genexpressionsprofils untersucht. Thrombozyten enthalten wenig RNA, weshalb die Genexpressionsanalyse in LCLs durchgeführt wird (Kapitel 2.4.1). Diese repräsentieren den genetischen Status des jeweiligen TAR-Patienten, haben einen Zellkern und sind in der Zellkultur in gewünschter Menge expandierbar. Zuerst wird mittels qRT-PCR untersucht, ob die Mikrodeletionsgene in LCLs exprimiert werden. HFE2, *Ankyrin repeat domain 35* (ANKRD35) und *Integrin alpha*

10 (ITGA10) werden zwar in anderen Geweben, aber nicht in LCLs exprimiert und können daher hier nicht analysiert werden (Daten nicht gezeigt). GNRH2 ist ein Pseudogen und wird nicht exprimiert [94]. Die restlichen Gene (TXNIP, POLR3GL, ANKRD34; LIX1L, RBM8A, PEX11B, PIAS3 und NUDT17) werden in LCLs exprimiert und können analysiert werden. Vorab wird ermittelt, ob deren Genexpression in LCLs und aus CD34⁺ HSCs differenzierten MKs vergleichbar ist und sich die LCLs zu dieser Analyse eignen. Daher wird RNA aus LCLs von Probanden und aus CD34⁺ HSCs differenzierten MKs isoliert und die mRNA-Genexpression mittels qRT-PCR bestimmt (Kapitel 2.6.4).

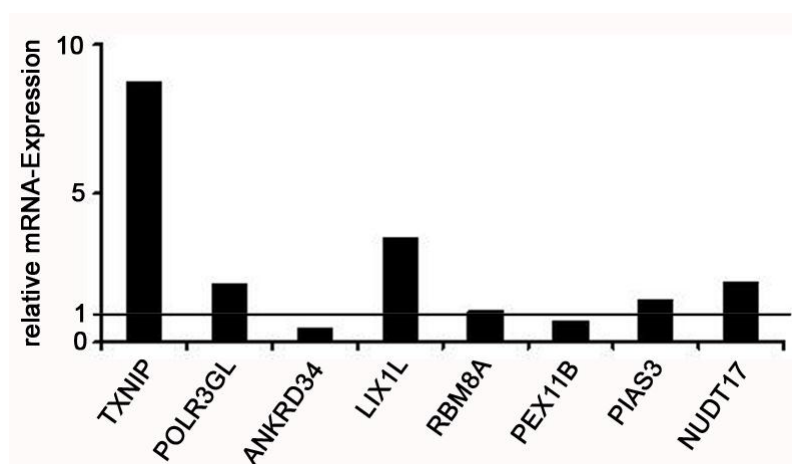


Abb. 27: In LCLs und MKs ist die mRNA-Expression der Mikrodeletionsgene vergleichbar. In LCLs und Mks wird die Expression der Mikrodeletionsgene mittels qRT-PCR bestimmt. Die Balken geben die n-fache Expression der angegebenen Gene in den MKs im Vergleich zu LCLs an. Dabei ist die mRNA-Expression in LCLs auf eins gesetzt. In sieben von acht Mikrodeletionsgenen ist die Expression in LCLs und MKs vergleichbar. Die mRNA von TXNIP ist in MKs achtfach höher exprimiert als in LCLs. Ein repräsentatives Experiment von zwei Durchführungen ist dargestellt.

In MKs ist die mRNA von *Thioredoxin interacting protein* (TXNIP) achtfach höher exprimiert als in LCLs (Abb. 27). Die restlichen sieben der acht untersuchten Mikrodeletionsgene weisen in LCLs und MKs eine vergleichbare mRNA-Expression auf. LCLs eignen sich daher zur Analyse von Promotermutationen der Deletionsgene. Eine in LCLs um 50% reduzierte Expression der untersuchten Gene bei TAR-Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen wird durch die Hemizygotie verursacht und spricht eher gegen eine DNA-Mutation. Ein Anzeichen einer Promotermutation liegt bei einer Abweichung von mehr als 50% vor. Aus den LCLs von sechs TAR-Patienten beider Phosphorylierungsmuster (Kapitel 3.2.1), drei del-Trägern, zwei Elternteilen ohne Mikrodeletion und zwei Kontrollpersonen wird RNA isoliert und die mRNA-Expression der acht Gene mittels qRT-PCR bestimmt (Kapitel 2.6.4).

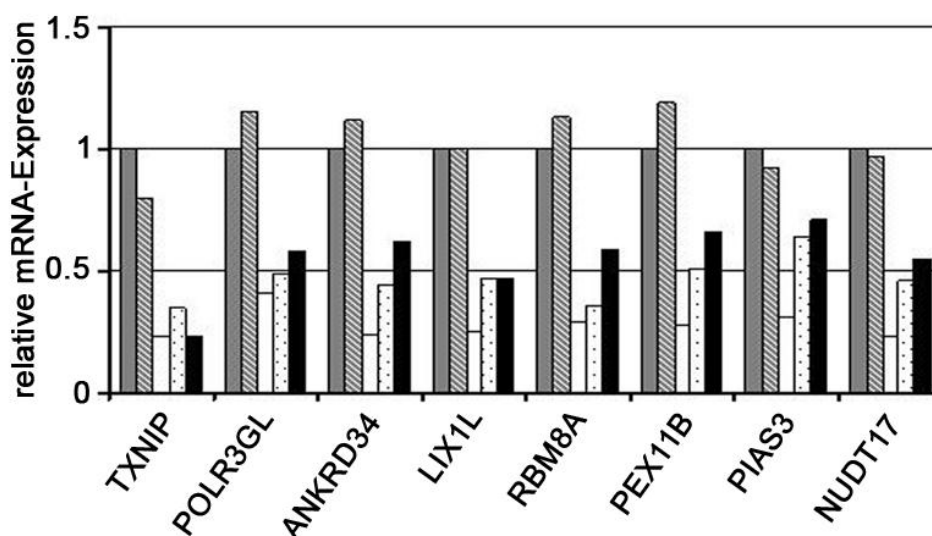


Abb. 28: In LCLs von TAR-Patienten und del-Trägern weisen die Mikrodeletionsgene eine um circa 50% reduzierte mRNA-Expression auf. In LCLs von TAR-Patienten, del-Trägern und Kontrollpersonen wird die Expression der Mikrodeletionsgene mittels qRT-PCR verglichen. Die Balken geben die n-fache Expression der untersuchten Gene im Vergleich zur Kontrollperson an. Dabei ist die Kontrolle auf eins gesetzt (graue Balken). In LCLs einer Kontrollperson und einem Elternteil ohne Mikrodeletion (grau gestreifte Balken) ist die mRNA-Expression der Mikrodeletionsgene vergleichbar. In LCLs von einem Patient mit Muster #1 (weiße Balken), einem mit Muster #2 (weiß gepunktete Balken) und einem del-Träger (schwarze Balken) wird eine um circa 50% reduzierte mRNA-Expression der untersuchten Gene im Vergleich zur Kontrollperson nachgewiesen, die mRNA-Expression von TXNIP ist um mehr als 50% reduziert. Exemplarisch ist die Analyse eines Patienten mit Muster #1 und Muster #2, beider Elternteile mit und ohne Mikrodeletion sowie einer Kontrollperson gezeigt. Ein repräsentatives Experiment von zwei Durchführungen ist dargestellt.

In LCLs von Kontrollpersonen (graue Balken, auf eins gesetzt) und Elternteilen ohne Mikrodeletion (grau gestreifte Balken) ist die mRNA-Expression der acht untersuchten Gene untereinander vergleichbar (Abb. 28). In LCLs von Patienten mit Muster #1 (weiße Balken), Patienten mit Muster #2 (weiß gepunktete Balken) sowie del-Trägern (schwarze Balken) ist die mRNA-Expression der untersuchten Gene um circa 50% reduziert. Die mRNA-Menge von TXNIP ist geringfügig mehr als 50% verringert. Es wird in Patienten mit Muster #1 stets die geringste Genexpression nachgewiesen. Die mRNA-Expression der untersuchten Gene in den LCLs der TAR-Patienten ist weder von einer paternalen oder einer maternalen Vererbung der Mikrodeletion noch vom Geschlecht der Patienten beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse deuten auf keine Promotermutation der untersuchten Mikrodeletionsgene hin, die eine deutlich veränderte Expression auf Proteinebene nahelegen würde. Ein ausschließlich spezifischer Defekt eines der Gene in MKs kann allerdings in LCLs nicht nachgewiesen werden. HFE2, ANKRD35 und ITGA10 bleiben weiterhin Kandidatengene.

3.5.3 Hämojuvelin-Nachweis in Thrombozyten von TAR-Patienten

Das Mikrodeletionsgen HFE2 kodiert für Hämojuvelin, das den Eisensensor Hepcidin reguliert. Eisen ist eines der wichtigsten Spurenelemente des menschlichen Körpers. Der Sauerstofftransport erfolgt durch das eisenhaltige Hämoglobin. Dessen Mangel kann zu einer unzureichenden Sauerstoffversorgung im Gewebe führen. Einige TAR-Patienten weisen in den ersten Lebenswochen eine Anämie, d. h. einen Mangel an funktionsfähigen Erythrozyten, auf. Es wird analysiert, ob die Ursache Blutungen sind (sekundäre Anämie), oder ob die Mikrodeletion zur Störung der Erythropoese beiträgt (primäre Eisenmangelanämie). Eine Eisenmangelanämie ist durch niedrige Hämoglobinwerte, niedrige Werte für die mittlere Größe der Erythrozyten, niedrige Werte für den mittleren Gehalt an Hämoglobin, eine deutlich erhöhte Größenvariation der Erythrozyten, niedrige Ferritinwerte und eine niedrige Eisensättigung charakterisiert. Von jedem TAR-Patienten wird ein Blutbild angefertigt mit einem besonderen Augenmerk auf Erythrozyten- und Eisenwerte. Zusätzlich werden Blutwerte aus den Patientenakten zusammengetragen und entsprechend ausgewertet.

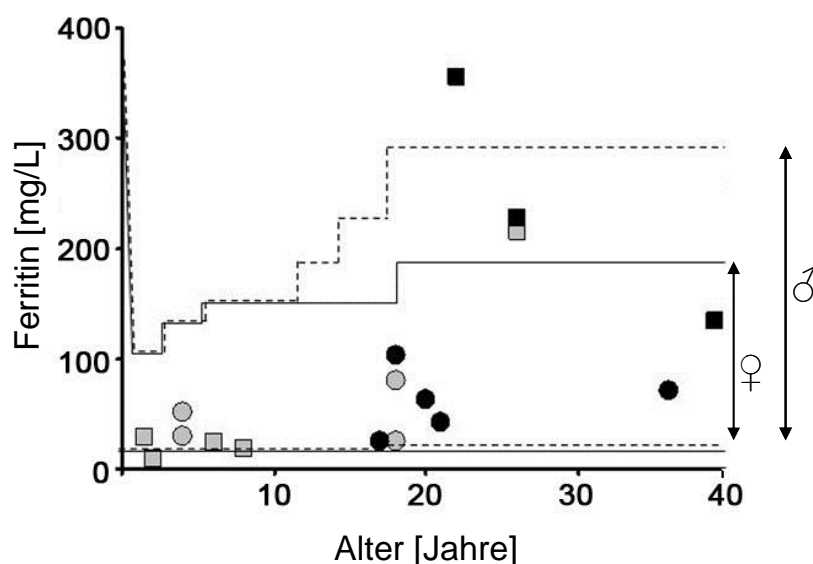


Abb. 29: Im Blut von TAR-Patienten mit Muster #1 werden geringe Ferritinwerte nachgewiesen. TAR-Patienten mit Muster #1 (graue Symbole) weisen im Blut sehr geringe Ferritinwerte im Normbereich auf. Ein Patient hat einen Ferritinwert außerhalb des Referenzbereichs. Die Ferritinwerte von Patienten mit Muster #2 (schwarze Symbole) liegen über den gesamten Normbereich verteilt. Der Ferritinwert korreliert nicht mit dem Geschlecht von TAR-Patienten (Viereck: männlich, Kreis: weiblich). (Normbereich von Ferritin: ♀(Mädchen / Frauen), ♂(Jungen / Männer).

Neben zu niedrigen Thrombozytenwerten im Blut aller TAR-Patienten weisen Patienten mit Muster #1 sehr niedrige Ferritinwerte im unteren Normbereich auf (Abb. 29). Diese normalisieren sich mit dem Wechsel des Phosphorylierungsmusters. Alle anderen untersuchten Blutwerte sind normal (Daten nicht gezeigt). Somit scheint bei TAR-Patienten die Hemizygotie von HFE2 die Erythropoese nicht primär zu beeinflussen und Anämien treten vermutlich in Folge von Blutungen auf.

Ein kommerziell verfügbarer Ak gegen Hämöjuvelin ermöglicht die Bestimmung der Proteinmenge mittels Immunblot in Thrombozyten. Dies erfolgt bei vier TAR-Patienten, zwei Elternteilen ohne Mikrodeletion und zwei Kontrollpersonen (Kapitel 2.5 und 2.1.2).

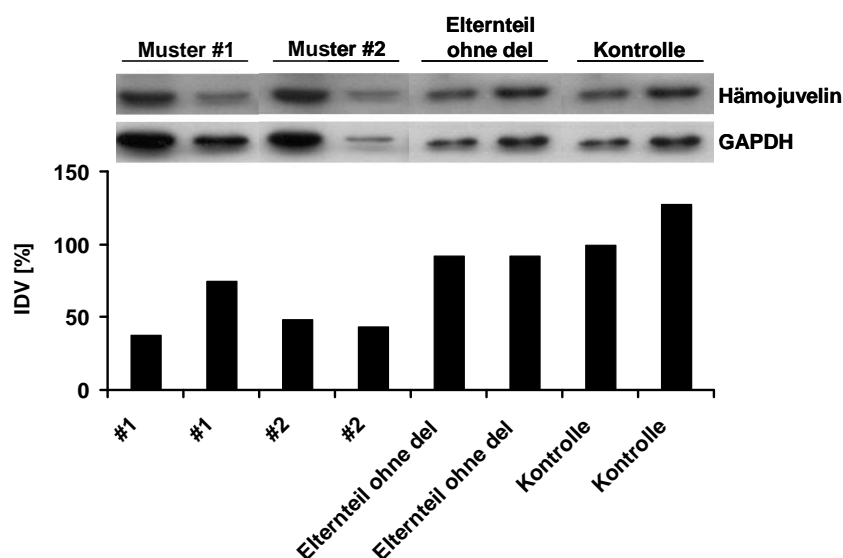


Abb. 30: Thrombozyten von TAR-Patienten weisen eine um 50% reduzierte Proteinmenge von Hämöjuvelin auf. In Thrombozyten von TAR-Patienten, Elternteilen ohne Mikrodeletion und Kontrollpersonen wird die Proteinmenge von Hämöjuvelin mittels Immunblot bestimmt. **Oben:** Die Thrombozyten von TAR-Patienten mit Muster #1 und Muster #2 weisen im Vergleich zu Kontrollpersonen und Elternteilen ohne Mikrodeletion eine um 50% reduzierte Proteinmenge von Hämöjuvelin (HFE2) auf. GAPDH wird als Ladekontrolle angegeben. **Unten:** Eine densitometrische Analyse verdeutlicht die Ergebnisse des Immunblots. IDV = Angabe der Menge an Hämöjuvelin im Vergleich zur Kontrollperson in %.

In Thrombozyten von TAR-Patienten beider Phosphorylierungsmuster wird im Vergleich zu Kontrollpersonen und Elternteilen ohne Mikrodeletion eine um circa 50% reduzierte Proteinmenge an Hämöjuvelin (HFE2) nachgewiesen (Abb. 30). Diese ist durch die Hemizygotie von HFE2 erklärbar. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass HFE2 im verbleibenden Allel nicht mutiert ist.

3.5.4 PIAS3-Nachweis in Thrombozyten von TAR-Patienten

STAT3 ist ein Schlüsselmolekül in der TPO-induzierten Signaltransduktion. PIAS3 blockiert die Bindung von pSTAT3 an DNA und die damit vermittelte Genexpression (Abb. 31A) [52]. Ein kommerziell verfügbarer Ak ermöglicht die Bestimmung der Proteinmenge von PIAS3 in Thrombozyten. Dies erfolgt bei zwei TAR-Patienten beider Phosphorylierungsmuster, einem del-Träger und zwei Kontrollpersonen (Kapitel 2.5. und 2.1.2).

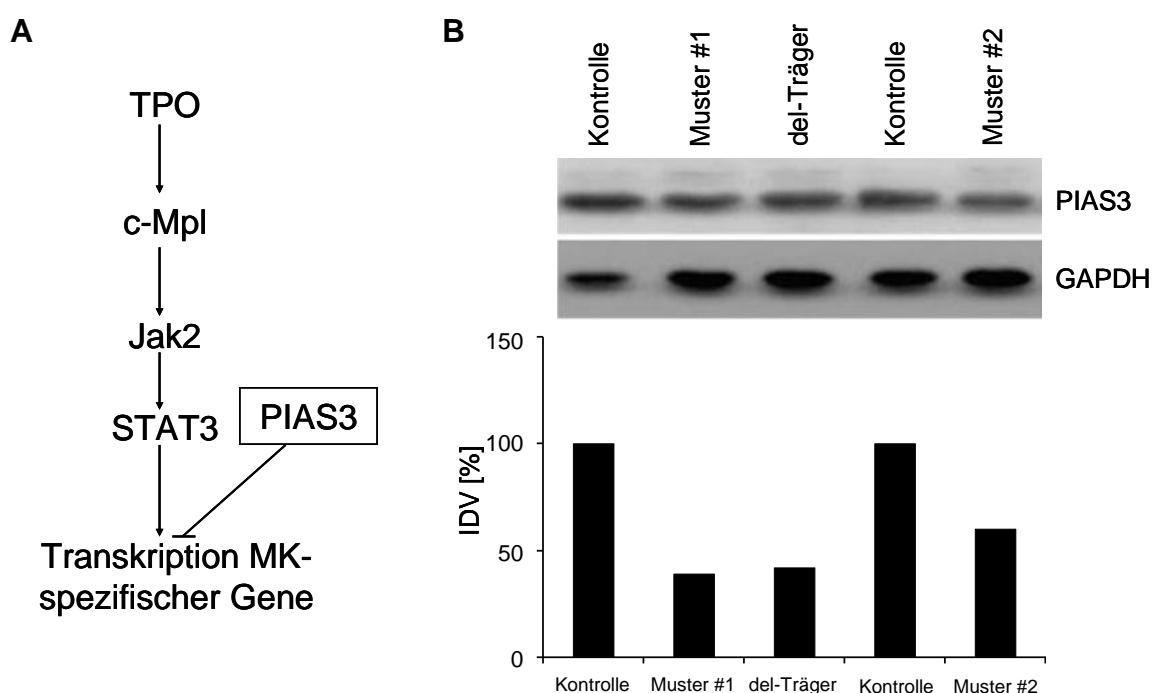


Abb. 31: In den Thrombozyten von TAR-Patienten und einem del-Träger wird eine um 50% reduzierte Proteinmenge von PIAS3 nachgewiesen. In Thrombozyten von TAR-Patienten, einem del-Träger und Kontrollpersonen wird die Proteinmenge von PIAS3 mittels Immunblot bestimmt. **A** Überblick des JAK/STAT-Signalwegs. PIAS3 blockiert die Bindung von pSTAT3 an DNA. **B Oben:** In den Thrombozyten der Patienten mit Muster #1 und #2 sowie einem del-Träger wird eine um 50% reduzierte Proteinmenge von PIAS3 im Vergleich zur Kontrollperson nachgewiesen. GAPDH wird als Ladekontrolle angegeben. **Unten:** Eine densitometrische Analyse verdeutlicht die Ergebnisse des Immunblots. IDV = Angabe der Proteinmenge an PIAS3 im Vergleich zur Kontrollperson in %.

Thrombozyten von TAR-Patienten mit Muster #1 und #2 sowie ein del-Träger weisen im Vergleich zu Kontrollpersonen eine um 50% reduzierte Proteinmenge von PIAS3 auf (Abb. 31B). Diese ist durch die Hemizygotie von PIAS3 erklärbar und deckt sich mit den Genexpressionsanalysen in LCLs. In LCLs von TAR-Patienten und del-Trägern wird eine um 50% reduzierte mRNA-Expression im Vergleich zu Kontrollpersonen bestimmt (Abb. 28). Diese Ergebnisse legen nahe, dass PIAS3 im verbleibenden Allel nicht mutiert ist.

Die Einteilung der Phosphorylierungsmuster #1 und #2 bei TAR-Patienten beruht auf der Detektion von phosphoryliertem Jak2 in Thrombozyten (Kapitel 3.2.1). Folgend wird mittels EMSA die Bindung der TPO-induzierten Jak2-Substrate pSTAT1 und pSTAT3 an einem responsiven DNA-Element untersucht. Dazu werden Thrombozyten von vier Patienten beider Phosphorylierungsmuster, zwei del-Trägern und Kontrollspendern isoliert und für 10 bzw. 30 min mit 50 ng/mL rhTPO stimuliert (Kapitel 2.5 und 2.1.2). Die Zugabe eines Ak (*Supershift*) spezifiziert die am responsiven DNA-Element gebundenen Proteine.

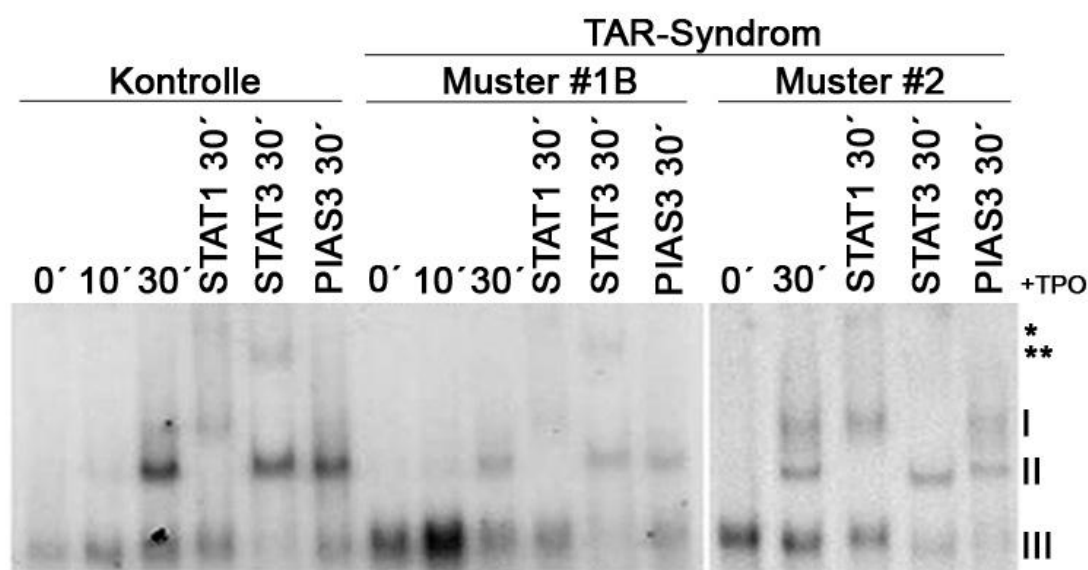


Abb. 32: In Thrombozytenlysaten von TAR-Patienten werden per EMSA beide Phosphorylierungsmuster bestätigt und ein Komplex aus STAT3 und PIAS3 nachgewiesen. Von Thrombozytenlysaten der TAR-Patienten und Kontrollpersonen wird die Bindung von pSTAT1, pSTAT3 und PIAS3 an einem responsiven DNA-Element mittels EMSA untersucht. Dabei zeigen Patienten mit Muster #2 (rechts) eine im Vergleich zu den Kontrollpersonen leicht reduzierte Bindung der STAT3/STAT3- und STAT1/STAT1-Dimere (II und I) am responsiven DNA-Element. Patienten mit Muster #1B weisen kaum am responsiven DNA-Element gebundene STAT3/STAT3- und STAT1/STAT1-Dimere (II und I) in Thrombozyten auf. Weiterhin wird in den Thrombozyten der Patienten und Kontrollpersonen ein Komplex aus STAT3 und PIAS3 (III) nachgewiesen. Die Signalstärke dieses Komplexes ist in den Thrombozyten von TAR-Patienten erhöht, insbesondere bei TAR-Patienten mit Muster #1B. Exemplarisch sind die Analysen an einem Patienten mit Muster #1B, einem mit Muster #2 und einer Kontrollperson gezeigt (*:STAT1-*Supershift*, **: STAT3-*Supershift* / I:STAT3/STAT3-Dimer, II: STAT1/STAT1-Dimer, III:STAT3/PIAS3-Dimer / 0': unstimulierte Thrombozyten, 10' und 30': Thrombozyten für 10 bzw. 30 min mit rhTPO stimuliert).

In Thrombozytenlysaten von Kontrollspendern und del-Trägern wird eine vergleichbare Signalstärke von gebundenen STAT1/STAT1- und STAT3/STAT3-Dimeren am responsiven DNA-Element nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Hingegen zeigen Patienten mit Muster #2 eine im Vergleich zu den Kontrollpersonen leicht reduzierte Bindung der STAT-Dimere am responsiven DNA-Element (I und II in

Abb. 32). In Thrombozyten von TAR-Patienten mit Muster #1B werden kaum am responsiven DNA-Element gebundene STAT-Dimere detektiert.

Obwohl PIAS3 laut Literatur die Bindung von STAT3 an DNA inhibiert [52], wird in den Thrombozytenlysaten der TAR-Patienten und Kontrollspender ein Komplex aus STAT3 und PIAS3 am responsiven DNA-Element nachgewiesen (III in Abb. 32). In den Thrombozytenlysaten von TAR-Patienten ist die Signalstärke des Komplexes im Vergleich zu Kontrollen erhöht und nimmt außerdem in Patienten mit Muster #1B nach TPO-Stimulation zu.

Zusammengefasst bestätigen die EMSA-Analysen die Phosphorylierungsmuster #1 und #2 der TAR-Patienten. Patienten mit Muster #1B zeigen per Immunblot eine gestörte TPO-induzierte Signaltransduktion (Abb. 16) und folglich kaum gebundene STAT-Dimere am responsiven DNA-Element. Hingegen werden in Thrombozyten von Patienten mit Muster #2 eine unauffällige TPO-induzierte Signaltransduktion und am responsiven DNA-Element gebundene STAT-Dimere nachgewiesen. Jedoch sind die Signalstärken der gebundenen STAT-Dimere im Vergleich zu Kontrollpersonen leicht reduziert, was zu Thrombozytenzahlen knapp unterhalb des Referenzbereichs beitragen könnte.

3.6 „Modifier of TAR“ – Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) in RBM8A

3.6.1 SNP in RBM8A

In 30 TAR-Patienten wurde 2007 mittels der *Comparative genomic hybridization*-Array-Technik eine Mikrodeletion auf Chromosom 1 identifiziert (Abb. 6) [83]. Bislang konnte diese in über 80 TAR-Patienten nachgewiesen werden (persönliche Mitteilung von Eva Klopocki). Zu 75% wird die Mikrodeletion von einem nicht betroffenen Elternteil vererbt. Daher ist diese zur Ausprägung des TAR-Syndroms notwendig, aber nicht ausreichend. Es muss ein weiterer Faktor beitragen, der entweder *de novo* entsteht oder vom Elternteil ohne Mikrodeletion stammt. In Kooperation mit dem Sanger-Institut in Cambridge und Arbeitsgruppen aus Frankreich, Belgien und den Niederlanden wird nach diesem Faktor gesucht. Dies erfolgt mittels *Next generation sequencing*. Die Hochdurchsatz-Sequenzierung erlaubt genomweit DNA-Mutationen in kurzer Zeit zu detektieren.

Von fünf TAR-Patienten wird initial mit einem *Exome-chip* "plus" (Illumina GAI, Illumina, Little Chesterford, UK) das Exom inklusive exonnaher intronischer Bereiche, 5'-untranslatierter Bereiche (UTRs), und 3'-UTRs sequenziert. Dabei wird bei vier TAR-Patienten im Mikrodeletionsbereich des verbleibenden Allels ein SNP im 5'-UTR-Bereich und bei einem Patienten ein SNP im ersten Intron von RBM8A identifiziert.

Die DNA aus mononukleären Zellen (Kapitel 2.6.1) von 25 TAR-Patienten, Eltern (mit und ohne Mikrodeletion) und 7504 Kontrollpersonen (aus der Cambridge BioResource [95]) wird im RBM8A-Promoterbereich nach der Sanger-Methode sequenziert. Dabei wird in acht von 25 TAR-Patienten der Intron-SNP (Position 145507765) und in 17 von 25 Patienten der 5'-UTR-SNP (Position 145507646) in RBM8A nachgewiesen (Tabelle 8 im Anhang). Beim 5'-UTR-SNP ist ein Guanosin gegen ein Adenosin ausgetauscht. Dieser SNP ist bereits in der SNP-Datenbank von *National Center for Biotechnology Information* beschrieben und kommt zu 3% in der kaukasischen Bevölkerung vor. In der DNA von acht der 25 TAR-Patienten wird im ersten Intron von RBM8A ein Austausch von Guanosin mit Cytosin nachgewiesen. Dieser Intron-SNP ist neu identifiziert und kommt mit einer Frequenz von 0,5% eher selten in der Bevölkerung vor. Der jeweilige SNP der TAR-Patienten wird in einem Elternteil (ohne Mikrodeletion) nachgewiesen (SNP-Träger, Daten nicht gezeigt). Der 5'-UTR- bzw. Intron-SNP in RBM8A korreliert nicht mit dem Schweregrad der Skelettfehlbildungen bzw. der Thrombozytopenie (Daten nicht gezeigt). Zusammengenommen sind alle untersuchten TAR-Patienten durch eine Mikrodeletion auf Chromosom 1 und auf dem verbleibenden Allel einen SNP in regulatorischen DNA-Elementen von RBM8A charakterisiert.

3.6.2 *Ecotropic viral insertion-1* (Evi-1) bindet an RBM8A-Sequenz mit 5'-UTR-SNP

Ein SNP in der regulatorischen DNA-Sequenz eines Gens kann eine zusätzliche Bindungsstelle für einen TF hervorrufen, aber auch den Verlust einer solchen verursachen. Eine Vorhersage über die potentielle Bindung von TFs an eine Sequenz kann mit der Software *MatInspector* [96] getroffen werden. Es werden die potentiellen TFs der RBM8A-Sequenzen mit und ohne SNP bestimmt.

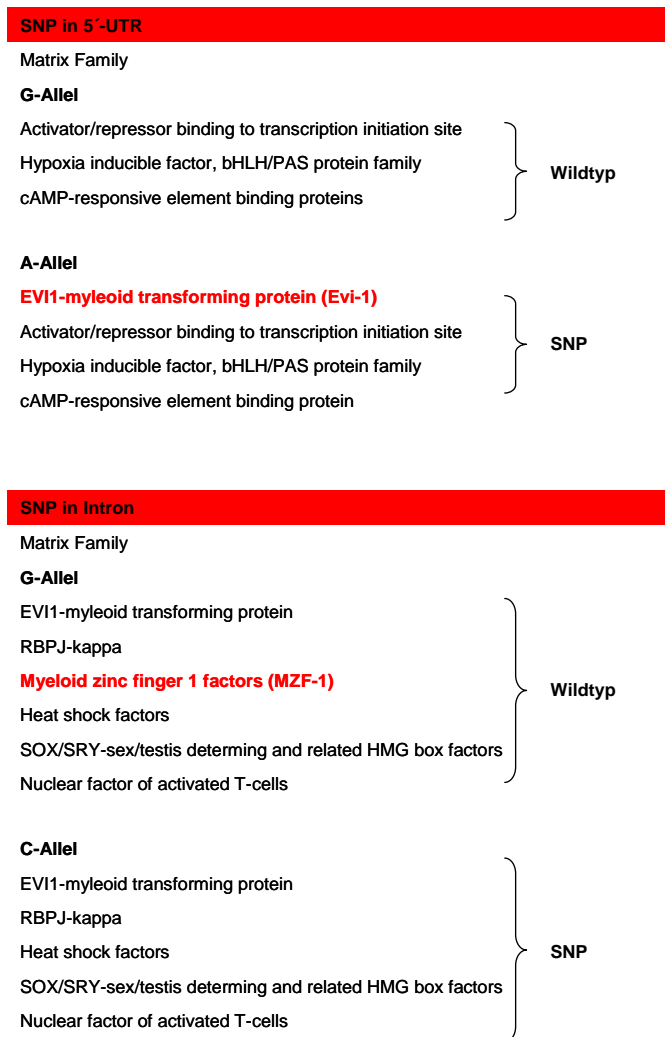


Abb. 33: Der Algorithmus von *MatInspector* sagt durch die SNPs in der RBM8A-Sequenz veränderte Bindungsstellen von TFs voraus. Es sind die hypothetischen gebundenen Proteine an die RBM8A-Sequenzen mit und ohne SNPs aufgelistet. Der 5'-UTR-SNP führt eine zusätzliche DNA-Bindungsstelle für Evi-1 ein. Durch den Intron-SNP kommt es zum Verlust der Bindungsstelle für *Myeloid Zinc Finger 1*. Diese Daten wurden in Zusammenarbeit mit Dirk Paul vom Sanger-Institut in Cambridge erhoben.

Der Algorithmus von *MatInspector* sagt durch den 5'-UTR-SNP in RBM8A eine zusätzliche Bindung von Evi-1 voraus (Abb. 33). Im Gegensatz dazu führt der Intron-SNP zum Verlust der Bindung von *Myeloid Zinc Finger 1*. Da die Mehrheit der TAR-Patienten den 5'-UTR-SNP in RBM8A aufweisen, wird im Folgenden dieser SNP schwerpunktmäßig analysiert.

In Thrombozytenlysaten wird unter der Annahme, dass Evi-1 in diesen auch exprimiert wird, die Bindung von Evi-1 an RBM8A mit dem 5'-UTR-SNP untersucht. Hierfür werden Thrombozyten eines Probanden isoliert und die Bindung der lysierten Proteine an die WT- bzw. 5'-UTR-SNP-DNA von RBM8A sowie an die Evi-1-Consensus-Sequenz mittels EMSA untersucht (Kapitel 2.5.1.3).

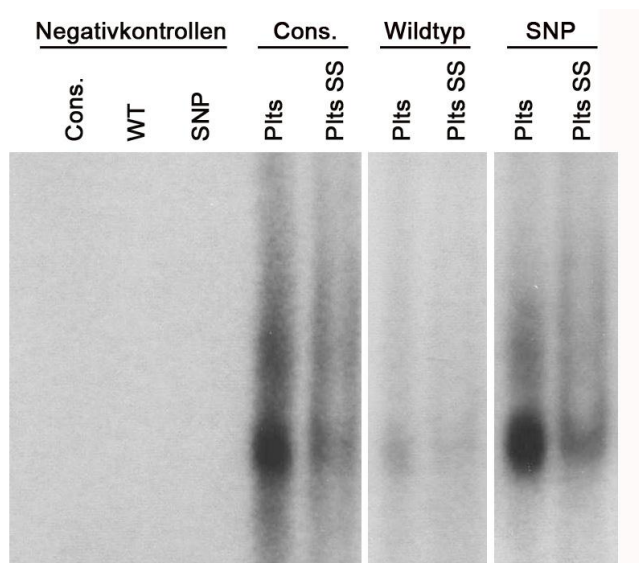


Abb. 34: Nachweis der Bindung von Evi-1 an dessen Consensus-Sequenz und an RBM8A mit dem 5'-UTR-SNP. In den Thrombozytenlysaten eines Probanden wird mittels EMSA ein Komplex aus TF und dem responsiven DNA-Element der Evi-1-Consensus-Sequenz (Cons.) bzw. von RBM8A mit dem 5'-UTR-SNP nachgewiesen. Dieser Komplex migriert langsamer nach Zugabe eines Evi-1 Aks (SS = *Supershift*). An das responsive DNA-Element mit der Wildtyp-Sequenz von RBM8A (WT) erfolgt keine Bindung von Proteinen. Die ersten drei Spuren enthalten keine lysierten Thrombozytenproteine (Negativkontrollen). Den restlichen Ansätzen sind Thrombozytenlysate zugesetzt (Plts).

In den Thrombozytenlysaten eines Probanden wird ein DNA gebundenes Protein an der Evi-1-Consensus-Sequenz (Cons.) bzw. der RBM8A-Sequenz mit 5'-UTR-SNP (SNP) nachgewiesen (Abb. 34). Der DNA/Protein-Komplex migriert nach Zugabe eines Evi-1 Aks langsamer, allerdings ist dieser kaum nachweisbar. An der Wildtyp-Sequenz von RBM8A (WT) bindet kein Protein. Diese Ergebnisse legen nahe, dass durch den 5'-UTR-SNP in RBM8A der zusätzliche TF Evi-1 binden kann.

3.6.3 In Thrombozyten von TAR-Patienten wird eine reduzierte Proteinmenge von Y14 detektiert

Die Bindung von Evi-1 an den 5'-UTR-SNP in RBM8A könnte dessen Genexpression beeinflussen. RBM8A kodiert für das Protein Y14. Laut Gewebeatlas (www.broadinstitute.org/dmap) ist es genau in den Geweben hoch exprimiert, in denen Evi-1 kaum vorliegt und umgekehrt. Dies legt eine repressorische Wirkung von Evi-1 auf die Genexpression von RBM8A nahe. Daher wird mittels Immunblot die Proteinmenge von Y14 in Thrombozyten von acht TAR-Patienten (mit 5'-UTR-SNP und Intron-SNP), einem del-Träger und zwei Kontrollpersonen bestimmt. (Kapitel 2.5 und 2.1.2).

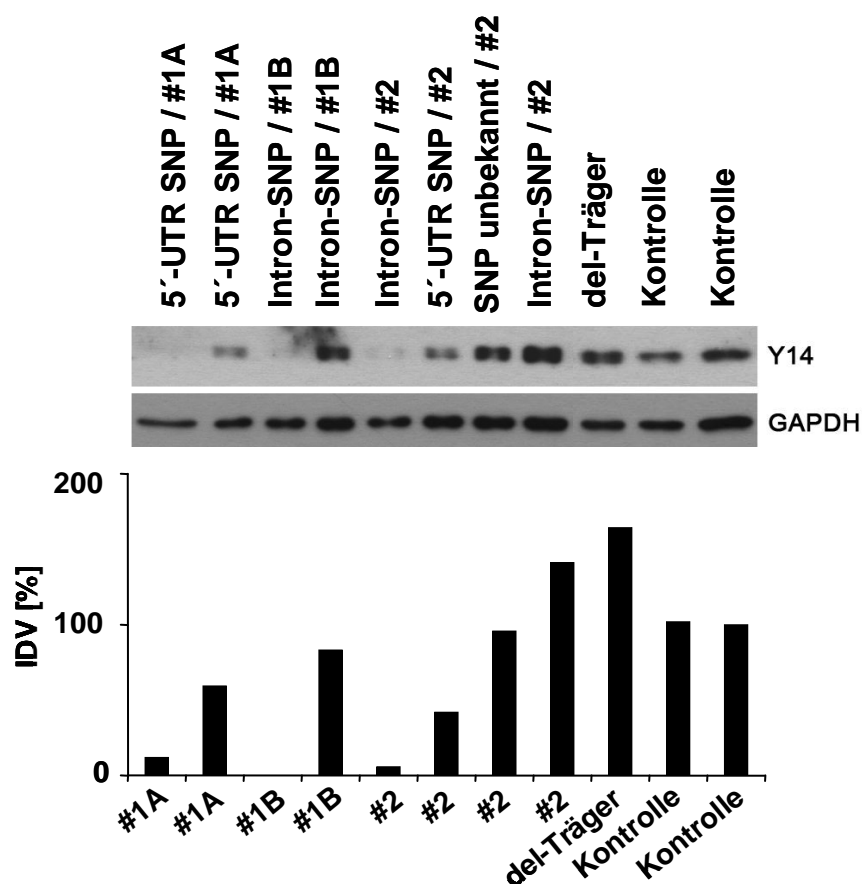


Abb. 35: In den Thrombozyten von TAR-Patienten wird überwiegend eine stark reduzierte Proteinmenge von Y14 nachgewiesen. In Thrombozyten von TAR-Patienten, einem del-Träger und Kontrollpersonen wird die Proteinmenge von Y14 mittels Immunblot bestimmt. **Oben:** Sieben der acht TAR-Patienten weisen in Thrombozyten eine reduzierte Proteinmenge von Y14 unabhängig von dem Phosphorylierungsmuster #1 oder #2 sowie vom 5'-UTR- oder dem Intron-SNP in RBM8A auf. In den Thrombozyten vom del-Träger und der Kontrollpersonen werden annähernd vergleichbare Signalstärken von Y14 detektiert. Die äquivalente Expression von GAPDH bestätigt die Gleichbeladung aller Spuren. **Unten:** Eine densitometrische Auswertung der Signalstärken verdeutlicht die Ergebnisse des Immunblots. IDV = Angabe der Proteinmenge von Y14 im Vergleich zur Kontrollperson in %.

In Thrombozyten von sieben der acht TAR-Patienten wird im Vergleich zu den Kontrollpersonen eine reduzierte Proteinmenge von Y14 nachgewiesen (Abb. 35). Die Hälfte der Patienten zeigt eine starke Y14-Reduktion um mehr als 50%. Del-Träger und Kontrollpersonen zeigen annähernd vergleichbare Signalstärken von Y14 in Thrombozyten. Das Ausmaß der Y14-Reduktion bei TAR-Patienten korreliert nicht mit den beiden Phosphorylierungsmustern (#1 und #2), den beiden SNPs in RBM8A (5'-UTR- und Intron-SNP) (Abb. 35), dem Alter oder der Thrombozytenzahl (Daten nicht gezeigt) der TAR-Patienten. Die Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass durch den 5'-UTR-SNP in RBM8A Evi-1 bindet und die Expression von Y14 in Thrombozyten reprimiert wird.

4 Diskussion

Die erste Fallbeschreibung eines Patienten mit einer Thrombozytopenie und beidseitiger Radiusaplasie erfolgte 1929 durch Greenwald [75]. Obwohl Hall bereits 1969 diese Symptome als Thrombocytopenia-absent radii-Syndrom zusammenfasste, ist dessen Ätiologie bis heute weitgehend ungeklärt [97]. 2007 wurde in allen TAR-Patienten eine Mikrodeletion auf Chromosom 1 detektiert [83]. Diese ist auch zu 75% in einem der beiden gesunden Elternteile nachweisbar. In vielen Lehrbüchern wird die Erkrankung mit einer Ausreifungsstörung der MKs und einem Defekt in der intrazellulären Signalübermittlung des TPO-Rezeptors beschrieben [70, 98].

In der vorliegenden Arbeit sollten die molekularen Ursachen des hämatologischen Defekts bei TAR-Patienten für ein besseres Verständnis der Signaltransduktion von TPO im Rahmen der Thrombozytenbiogenese charakterisiert werden. Dazu wurde zum ersten Mal mittels Immunblot eine umfangreiche Analyse des TPO-induzierten Jak/STAT-, PI3K/Akt- und Raf/Erk-Signalwegs in Thrombozyten von 23 TAR-Patienten durchgeführt. Zusätzlich wurde die Auswirkung der Mikrodeletion bei del-Trägern sowie die gezielte Inhibierung der Tyrosinkinaseaktivität von Jak2 bei Probanden auf die TPO-induzierte Signaltransduktion mittels Immunblot untersucht. Da die Rolle von c-Mpl beim TAR-Syndrom, basierend auf unterschiedlichen Untersuchungsmethoden (Immunblot und Durchflusszytometrie), in der Literatur kontrovers eingeschätzt wird, wurde c-Mpl mit beiden Techniken an Proben derselben Patienten bestimmt.

Zur Thrombozytenbiogenese tragen auch TPO-unabhängige Mechanismen bei. SDF-1 und FGF-4 vermitteln die Reifung von MKs. Daher wurden die Plasmaspiegel beider Zytokine sowie die Proteinmenge von CXCR4 in TAR-Patienten und Kontrollspendern bestimmt.

Weiterhin wurden zahlreiche periphere Blutwerte der TAR-Patienten unter anderem für eine Aussage zum zeitlichen Verlauf von Thrombozytenzahlen ausgewertet. Durch den IPF%-Wert kann eine Prognose über die Anzahl von MKs im Knochenmark getroffen werden.

Einige TAR-Patienten sind von starken Blutungen betroffen, die sich allein nicht nur durch eine reduzierte Thrombozytenzahl erklären lassen. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit mittels Durchflusszytometrie zusätzlich die Thrombozyten der TAR-Patienten auf Funktionsdefekte hin untersucht. Da dies nur indirekt zur Klärung der

Zielsetzung dieser Arbeit beiträgt, sind die Erkenntnisse nicht im Ergebnisteil dargestellt, sondern werden in der Diskussion besprochen.

Die Mikrodeletion auf Chromosom 1 ist zur Ausprägung des TAR-Syndroms notwendig, aber nicht ausreichend. Es ist naheliegend, dass eines der annotierten Gene zur Ausprägung der Erkrankung beiträgt. Daher wurde in spezifischen Zelllinien von TAR-Patienten (immortalisierte B-Lymphozyten) eine Expressionsanalyse der Gene des Deletionsbereichs durchgeführt. Weiterhin erfolgte in Thrombozyten von TAR-Patienten der Nachweis der Proteinmengen von Hämojuvelin, PIAS3 und Y14. Zeitgleich wurde im Rahmen einer internationalen Kooperation das Exom der Patienten mittels *Next generation sequencing* sequenziert. Die Ergebnisse werden folgend zusammenhängend betrachtet und mit der Literatur diskutiert.

4.1 Periphere Blutwerte der TAR-Patienten

TAR-Patienten weisen wenige MKs auf, haben aber ansonsten ein normozelluläres Knochenmark [79]. Das TAR-Syndrom wird den BMFSs zugeordnet [99]. Patienten mit einem BMFS sind durch ein zunehmendes Knochenmarkversagen gekennzeichnet. Im Verlaufe der Zeit verschlechtern sich die peripheren Blutwerte und betreffen oft mehrere Blutzellreihen. Bei TAR-Patienten hingegen verbessern sich die Thrombozytenwerte von $<100/\text{nL}$ auf $100\text{-}150/\text{nL}$, jedoch sind Einzelverläufe nicht dokumentiert [76, 78]. In der vorliegenden Arbeit wurden Blutbilder von 15 TAR-Patienten über einen langen Beobachtungszeitraum (Median zwölf Jahre) analysiert. Daraus konnten folgende Erkenntnisse gezogen werden:

Die Ergebnisse bestätigen nur zum Teil die in der Literatur beschriebene Verbesserung der Thrombozytenwerte bei TAR-Patienten. Ein Viertel der Patienten hatte über den gesamten Beobachtungszeitraum stark erniedrigte Thrombozytenzahlen $<100/\text{nL}$ (Abb. 12). Die Mehrzahl der untersuchten Patienten wiesen jedoch einen Thrombozytenanstieg innerhalb der ersten zwei Lebensjahre auf (Abb. 11). Die Verbesserung der Thrombozytenwerte legt eine gesteigerte Megakaryopoese nahe. Knochenmarkbiopsien von TAR-Patienten sind nicht verfügbar, weshalb keine Verlaufskontrolle über die zelluläre Zusammensetzung des Knochenmarks und somit über die Größe und die Anzahl der MKs vorliegt. Die wenigen Thrombozytenwerte von TAR-Patienten im Normbereich der Abb. 10 lassen sich durch Gabe von

Thrombozytenkonzentraten erklären. Patienten erhalten bei sehr geringen Thrombozytenzahlen und Blutungen Thrombozytenkonzentrate, insbesondere innerhalb der ersten Lebensjahre.

Einige TAR-Patienten sind in den ersten Lebenswochen anämisch. Dies deutet darauf hin, dass TAR-Patienten auch einen Defekt der roten Blutzellreihe aufweisen könnten. Die Blutbilder der TAR-Patienten jedoch zeigten normale Werte aller Blutreihen (Kapitel 3.5.3), ausgenommen zu niedriger Thrombozytenwerte. Daher sind die Anämien von TAR-Patienten in den ersten Lebenswochen vermutlich eher sekundär durch starke Blutungen und nicht durch einen primären Defekt der roten Zellreihe im Knochenmark verursacht. Die Verbesserung der Thrombozytenzahlen und sonst unauffällige Blutwerte sprechen eher gegen die Einordnung des TAR-Syndroms zu den BMFSs.

Die erhöhte Blutungsneigung einiger TAR-Patienten insbesondere in den ersten zwei Lebensjahren könnte durch präventive Medikamente gemindert werden. Der Einsatz von rekombinantem EPO führte nur zu einem kurzzeitigen Thrombozytenanstieg [100] und ist daher für die Therapie ungeeignet. Durch die Applikation von IL-6, einem proinflammatorischen Zytokin, das MKs und Thrombozyten aktiviert, wurden erhebliche Nebenwirkungen in TAR-Patienten registriert [101]. Bei Patienten mit Immunthrombozytopenie führten die neu zugelassenen TPO-Mimetika Eltrombopag[®] und Romiplostim[®] erfolgreich zu einer erhöhten Anzahl von Thrombozyten und MKs. Auch bei TAR-Patienten könnten diese TPO-Mimetika die Reifungsstörung der MKs mindern. Die Anwendung bei TAR-Patienten sollte Gegenstand künftiger Forschung sein.

4.2 Kopplung zwischen TPO-induzierter Signaltransduktion und Thrombozytenbiogenese

Das Hauptanliegen dieser Arbeit ist die Untersuchung der molekularen Ursachen des hämatologischen Defekts bei TAR-Patienten für ein besseres Verständnis der Signaltransduktion von TPO im Rahmen der Thrombozytenbiogenese. Diese Analysen waren sehr umfangreich und greifen darüber hinaus an verschiedenen Stellen der Signaltransduktion an. Die Abbildung 36 gibt ein Überblick der Erkenntnisse zum TPO-induzierten Jak/STAT-, PI3K/Akt- und Raf/Erk-Signalweg, die anschließend jeweils einzeln diskutiert werden.

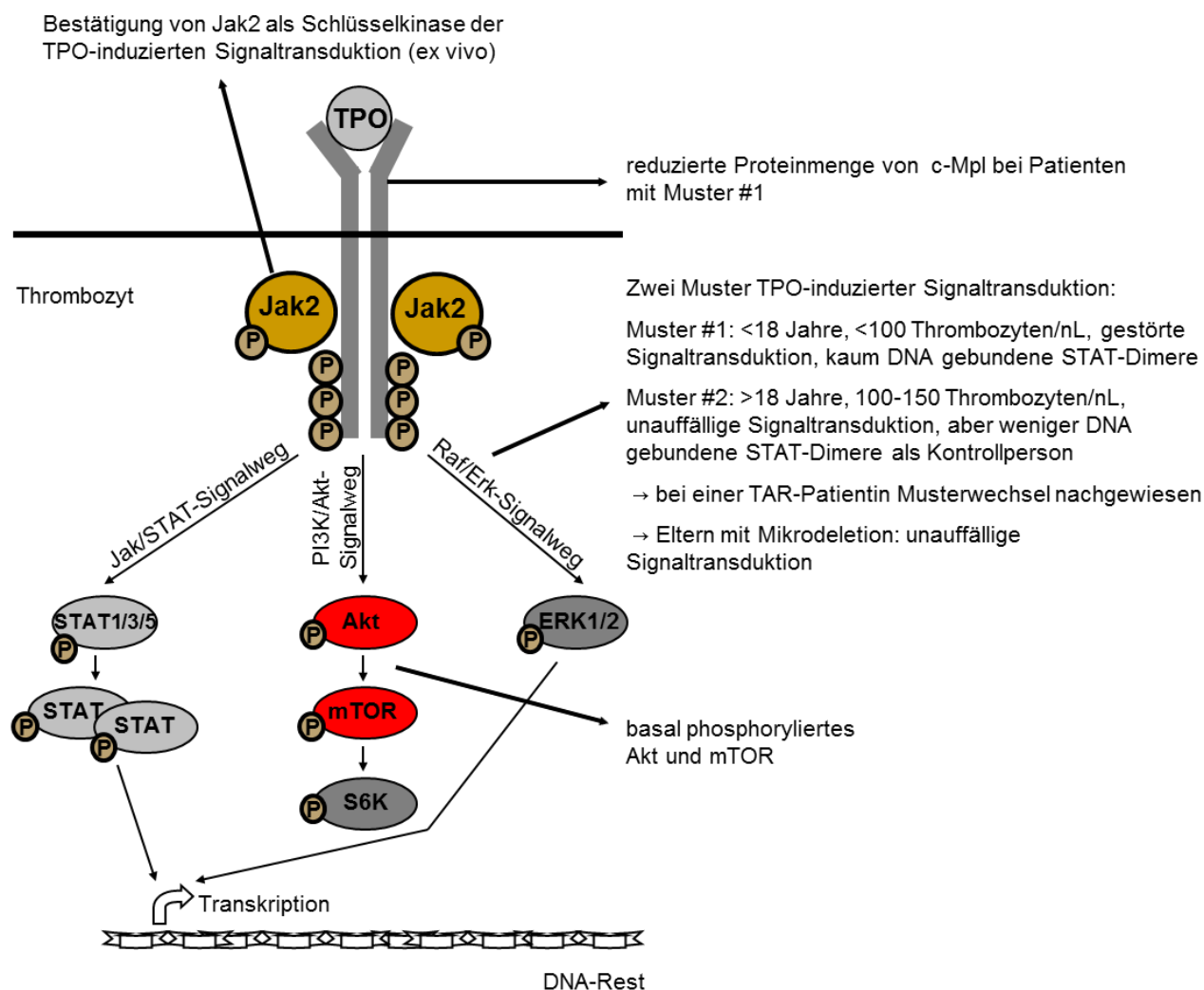


Abb. 36: Analyse der TPO-induzierten Jak/STAT-, PI3K/Akt- und Raf/Erk-Signalwege im Thrombozyt. Diese Abbildung gibt einen Überblick der Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit bezüglich der beteiligten Moleküle der TPO-induzierten Signaltransduktion. Es konnten bei Patienten mit TAR-Syndrom zwei Muster TPO-induzierter Signaltransduktion identifiziert werden. In Thrombozyten von Patienten mit Muster #1 wurde eine gestörte TPO-induzierte Signaltransduktion detektiert, aber es liegt basal phosphoryliertes Akt und mTOR (rot markiert) vor. Darüber hinaus wurde in den Thrombozyten der Patienten mit Muster #1 eine reduzierte Proteinmenge von c-Mpl bestimmt. In den Thrombozyten der Patienten mit Muster #2 und del-Trägern erfolgt der Nachweis einer unauffälligen TPO-induzierten Signaltransduktion. Eine TAR-Patientin zeigte den Wechsel von Muster #1 zu #2 im Alter von 18 Jahren. *Ex vivo* konnte gezeigt werden, dass Jak2 als Schlüsselkinase der TPO-induzierten Signaltransduktion fungiert.

4.2.1 Zwei Muster TPO-induzierter Jak/STAT-Signaltransduktion in TAR-Patienten

Ob bei TAR-Patienten die Verbesserung der Thrombozytenwerte innerhalb der ersten zwei Lebensjahre mit mehr MKs im Knochenmark einhergeht, kann auf Grund fehlender Knochenmarkbiopsien nicht direkt bestimmt werden. Als Surrogat für das Maß der Megakaryopoese kann jedoch die TPO-induzierte Signaltransduktion in Thrombozyten herangezogen werden. Diese ist in Patienten mit TAR-Syndrom

gestört. In den Thrombozyten eines Patienten wurde kein TPO-induziertes pJak2 detektiert [73, 74]. Die Nachweismethoden dieser Studien waren durch die Kombination von Immunpräzipitation und einem Ak gegen Phosphotyrosin sehr zeit- und materialaufwendig. Sie werden heute durch den Gebrauch kommerziell erhältlicher Aks gegen aktivierungsspezifische Epitope der untersuchten Moleküle erleichtert. Auf Grund der Sensitivität dieser Aks ist weniger Material zur Analyse notwendig. Deshalb konnte in der vorliegenden Arbeit bei vielen TAR-Patienten eine weitaus größere Anzahl von Molekülen des TPO-induzierten Signalwegs, trotz der begrenzten Materialmenge, untersucht werden.

Initial wurde die TPO-induzierte Jak2-Phosphorylierung in Thrombozyten von TAR-Patienten untersucht. In zwölf von 13 TAR-Patienten unter 18 Jahren mit Thrombozytenzahlen $<100/nL$ konnte kein TPO-induziertes pJak2 nachgewiesen werden (Muster #1, Abb. 13 und 14). Diese Ergebnisse bestätigen nicht phosphorylierbares Jak2 bei einem einjährigen TAR-Patienten in einer früheren Analyse [74]. Erstaunlicherweise konnte bei zehn von elf TAR-Patienten über 18 Jahren mit Thrombozytenzahlen knapp unterhalb des Referenzbereichs pJak2 wie beim Kontrollspender detektiert werden (Muster #2, Abb. 13 und 14).

In der vorliegenden Arbeit wurde in den Thrombozyten von TAR-Patienten beider Muster, Kontrollpersonen und beiden Elternteilen (mit und ohne Mikrodeletion) die TPO-induzierte Signaltransduktion des Jak/STAT-Signalwegs analysiert. In den Thrombozyten von Patienten mit Muster #2 und Kontrollpersonen wurde eine vergleichbare, unauffällige TPO-induzierte Signaltransduktion nachgewiesen (Abb. 16). Circa 50% der Patienten mit Muster #1 weisen kein pSTAT3 auf (Muster #1A, Abb. 16 und Abb. 17). Überraschenderweise konnte in der anderen Hälfte trotz unphosphoryliertem Jak2 eine residuale Phosphorylierung von STAT3 nachgewiesen werden (Muster #1B). Daraus lässt sich bei Patienten mit Muster #1B ein Jak2-unabhängiger, aber TPO-abhängiger Mechanismus, der zur Thrombozytenbiogenese beiträgt, mutmaßen. Als möglicher Kandidat der STAT3-Phosphorylierung konnte mittels Immunblot pTyk2 ausgeschlossen werden (Abb. 18), allerdings wurde keine direkte Interaktion beider Moleküle mittels Co-Immunpräzipitation bestimmt. Weiterhin wurde in den Thrombozyten gesunder Probanden durch WP1066, Jak2 inh. und Ag490 die Kinaseaktivität von Jak2 inhibiert und das Muster #1A und #1B von TAR-Patienten nachgeahmt. In den Thrombozyten der Probanden mit dem Muster #1B der TAR-Patienten wird ebenfalls

kein pJak2, aber eine residuale STAT3-Phosphorylierung nachgewiesen (Abb. 19). Somit scheint diese Phosphorylierung von STAT3 generell (und nicht nur bei TAR-Patienten) aufzutreten und eher ein Artefakt des Experimentaufbaus zu sein. Das pSTAT3-Signal könnte auf Grund der hohen Sensitivität des verwendeten pSTAT3-Aks im Vergleich zur geringeren Sensitivität des pJak2-Aks auftreten. Alternativ kann für das pSTAT3-Signal auch eine residuale Enzymaktivität von pJak2 verantwortlich sein. Diese könnte innerhalb einer verhältnismäßig langen Inkubationszeit von 30 min STAT3 phosphorylieren (verlangsamte Kinaseaktivität). Mittels eines pJak2/pSTAT3-Kinase-Assays sollte künftig überprüft werden, ob pJak2 der Patienten mit Muster #1B zur Phosphorylierung von STAT3 führen kann. Die durchgeführten Inhibitorexperimente bestätigen die gestörte TPO-abhängige Signaltransduktion in Thrombozyten von TAR-Patienten mit Muster #1B und widersprechen eher einem zur Thrombozytenbiogenese beitragenden Jak2-unabhängigen, aber TPO-abhängigen Mechanismus.

In den Thrombozyten der Eltern wurde eine unauffällige TPO-induzierte Signaltransduktion detektiert (Abb. 26). Außerdem weisen die Eltern normale Thrombozytenzahlen auf (Daten nicht gezeigt). Somit hat die Mikrodeletion allein keinen negativen Einfluss auf die Thrombozytenbiogenese.

In den Thrombozyten einer Patientin konnte sogar der Wechsel von Muster #1 zu Muster #2 im Alter von 18 Jahren nachgewiesen werden (Abb. 14). Dieser ging mit keinem signifikanten Anstieg der Thrombozytenwerte einher. Der Musterwechsel ist schwer nachweisbar, da Analysen über mehrere Jahre von denselben TAR-Patienten notwendig sind. Die vorgestellten Daten dieser Arbeit zeigen, dass die Verbesserung der Thrombozytenzahlen innerhalb der ersten zwei Lebensjahre dem Wechsel von Muster #1 zu Muster #2 im Alter von 18 Jahren vorausgeht. Diese beiden Ereignisse sind dementsprechend voneinander unabhängig, was eine Entkopplung zwischen TPO-Reaktivität und Thrombozytenbiogenese beim TAR-Syndrom nahelegt. Der Musterwechsel könnte auch schon während der Pubertät erfolgen, die mit Knochenmarkveränderungen und Hormonumstellungen einhergeht. Aus persönlichen Gesprächen mit TAR-Patienten geht hervor, dass diese vor allem im Jugendalter Arztbesuche meiden. Daher liegen kaum dokumentierte Daten von Patienten dieses Alters vor. Das wird auch in der Abb. 10 deutlich. Im Alter von zehn bis 15 Jahren sind deutlich weniger Thrombozytenwerte von TAR-Patienten dargestellt.

Eine Verbesserung der Thrombozytenzahlen innerhalb der ersten zwei Lebensjahre und der Musterwechsel mit 18 Jahren legen eine vermehrte Anzahl von MKs im Knochenmark nahe. Anstatt des Anstiegs an MKs kann als Surrogat der Anstieg des IPF%-Werts im Blut bestimmt werden [92]. Die vorliegende Arbeit zeigt bei 16 TAR-Patienten IPF%-Werte im Normbereich. Weder der Thrombozytenanstieg noch der Musterwechsel sind mit einem Anstieg des IPF%-Werts verbunden (Abb. 24). Dies deutet bei TAR-Patienten trotz Thrombozytenanstieg und Musterwechsel auf eine gleich bleibende Anzahl von MKs hin. Die Fragestellung könnte nur durch Knochenmarkbiopsien geklärt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte zwischen der Thrombozytenzahl, dem Alter und den beiden Phosphorylierungsmustern der TAR-Patienten eine statistisch signifikante Korrelation nachgewiesen werden (Abb. 14). Außerdem wurden in der untersuchten Kohorte pro Mann 1,6 Frauen mit TAR-Syndrom gezählt. Der Vergleich zu anderen Studien bestätigt, dass vermehrt Frauen am TAR-Syndrom erkrankt sind (1:1,8 [76] und 1:3,8 [77]). Die Ursache dafür bleibt ungeklärt.

4.2.2 Jak2 ist die Schlüsselkinase der TPO-induzierten Signaltransduktion

TPO reguliert durch den Jak/STAT-Signalweg, aber auch durch den PI3K/Akt- und den Raf/Erk-Signalweg die Thrombozytenbiogenese (Kapitel 1.2.2.2). In den Thrombozyten von TAR-Patienten mit Muster #2 konnte eine unauffällige TPO-induzierte Jak/STAT-Signaltransduktion nachgewiesen werden (Abb. 16). Die gestörte Signalweiterleitung innerhalb des PI3K/Akt- oder des Raf/Erk-Signalwegs könnte zu den niedrigen Thrombozytenzahlen in Patienten mit Muster #2 beitragen. In der vorliegenden Arbeit wird die Reaktivität der beteiligten Signalmoleküle der TPO-induzierten Signaltransduktion anhand einer Kinetik und der Signalintensität bestimmt. Dies findet zum ersten Mal in diesem Ausmaß in Thrombozyten von Patienten mit TAR-Syndrom statt. In den Thrombozyten von TAR-Patienten mit Muster #2 wurde ein unauffälliger, mit den Kontrollpersonen vergleichbarer TPO-induzierter PI3K/Akt- und Raf/Erk-Signalweg nachgewiesen (Abb. 20B/C). Dennoch haben diese Patienten keine normalen Thrombozytenzahlen. In Thrombozyten von Patienten mit Muster #1 wurde keine TPO-induzierte Signaltransduktion der drei Signalwege nachgewiesen (Abb. 16 und 20). Weiterhin zeigt diese Arbeit, dass die

Thrombozyten von TAR-Patienten auch beim Nachweis von Tyk2 die beiden Phosphorylierungsmuster #1 und #2 aufweisen, wodurch die untergeordnete Rolle von Tyk2 bei der TPO-induzierten Signaltransduktion bekräftigt wird (Abb. 18B) [32].

Auch wenn in Thrombozyten von Patienten mit Muster #1 keine TPO-induzierte Signaltransduktion stattfindet, werden in diesen Patienten noch wenige Thrombozyten gebildet. Dazu könnten basal phosphoryliertes Akt und mTOR beitragen (Abb. 20C). In TPO-stimulierten BaF3-Zellen mit der intrazellulären c-Mpl-Box1-Deletionsmutante wurden kein pJak2 und pSTAT3, aber residuale Mengen von aktivierten Substraten des PI3K/Akt- und Raf/Erk-Signalwegs nachgewiesen. Dies gewährleistet die Zellproliferation, die durch Zugabe des PI3K-Inhibitors *Wortmannin* gehemmt wird. Somit ist die Proliferation der BaF3-Zellen zumindest partiell unabhängig von der Jak2-Aktivierung [29]. Warum trotz basal phosphoryliertem Akt und mTOR deren Substrat S6K nur TPO-induziert aktiviert wird, bleibt unklar (Abb. 20C). In der Literatur ist S6K als Substrat der Moleküle Akt und mTOR beschrieben [102]. Dies legt nahe, dass auch alternative Kinasen S6K aktivieren könnten und verschiedene Phosphorylierungsstellen von Akt eventuell unterschiedliche Folgereaktionen auslösen.

JAK2 von TAR-Patienten beider Phosphorylierungsmuster weist keine Mutationen auf [91]. Um die Rolle von Jak2 für die TPO-induzierte Signaltransduktion zu studieren, wurde deren Kinaseaktivität in Thrombozyten von Kontrollpersonen gezielt inhibiert. Dadurch wird die TPO-induzierte Signaltransduktion, vergleichbar wie in Patienten mit Muster #1, unterdrückt (Abb. 21). Dies zeigt, dass pJak2 alle bekannten Jak2-Substrate in humanen Thrombozyten beeinflusst und bestätigt erstmals *ex vivo* die Schlüsselrolle von pJak2 im TPO-induzierten Signalweg.

4.2.3 Trotz TPO-induzierter Signaltransduktion haben Patienten mit Muster #2 keine normalen Thrombozytenzahlen

Die Thrombozytenbiogenese wird im Wesentlichen durch TPO reguliert. Der TPO-Plasmaspiegel hängt von der Gesamtzahl der c-Mpl auf Thrombozyten und MKs ab [19]. Bei einem Überschuss an Thrombozyten bindet viel TPO an seinen Rezeptor. Der TPO/c-Mpl-Komplex wird internalisiert und der aktuelle Plasmaspiegel von TPO sinkt. Liegt ein Mangel an Thrombozyten vor, ist der TPO-Plasmaspiegel erhöht und

wirkt stimulierend auf Vorläuferzellen im Knochenmark und somit auf die Thrombozytenbiogenese (Fließgleichgewicht). Bei Erkrankungen mit einem Defekt der Megakaryopoese liegt ein erhöhter TPO-Plasmaspiegel vor [82]. Patienten mit TAR-Syndrom und Congenitaler amegakaryozytärer Thrombozytopenie bilden trotz fehlender TPO-induzierter Signaltransduktion wenige Thrombozyten (Abb. 16, 18 und 20) [71, 72]. Daher ist der Einfluss von TPO auf die Thrombozytenbiogenese von großer Bedeutung, aber auch alternativ kompensierbar.

TAR-Patienten mit Muster #2 weisen, wie die Kontrollpersonen, eine intakte TPO-induzierte Signaltransduktion in Thrombozyten auf (Abb. 16, 18 und 20), aber haben keine normalen Thrombozytenwerte. Es könnte sein, dass zwar aktivierte Signalmoleküle in MKs der Patienten mit Muster #2 vorliegen, aber deren Bindung an die DNA gestört ist. Dies konnte mittels EMSA untersucht werden. Von Thrombozytenlysaten der Patienten mit Muster #2 binden im Vergleich zum Kontrollspender weniger pSTAT1- und pSTAT3-Dimere an ein DNA-responsives Element (Abb. 32). Das Ergebnis legt nahe, dass in Patienten mit Muster #2 trotz unauffälliger TPO-induzierter Signaltransduktion, weniger TF DNA binden und dadurch die Expression MK-relevanter Gene reduziert ist. Dies könnte wiederum zu den niedrigen Thrombozytenwerten unterhalb des Referenzbereichs bei Patienten mit Muster #2 beitragen. Weder der Thrombozytenanstieg innerhalb der ersten zwei Lebensjahre (Abb. 11) noch der Musterwechsel (Abb. 14) führen zu normalen Thrombozytenzahlen in TAR-Patienten mit Muster #2.

4.2.4 TPO-Rezeptor c-Mpl

Die Rolle vom TPO-Rezeptor im TAR-Syndrom wird in der Literatur kontrovers eingeschätzt. Während eine französische Arbeitsgruppe eine reduzierte Proteinmenge mittels Immunblot bestimmt, weist eine andere eine normale c-Mpl-Expression auf der Thrombozytenoberfläche per Durchflusszytometrie nach [73, 80]. Daher erfolgte in dieser Arbeit ein Vergleich beider Methoden an Proben von denselben TAR-Patienten. Per Immunblot wird nur in den Thrombozyten von TAR-Patienten mit Muster #1 eine reduzierte Menge an c-Mpl nachgewiesen (Abb. 23). Dies könnte zur gestörten TPO-induzierten Signaltransduktion in Patienten mit Muster #1 beitragen. Patienten mit Muster #2 weisen mit Kontrollpersonen vergleichbare Mengen von c-Mpl in Thrombozyten auf, weshalb eine reduzierte

Menge des Proteins als Ursache für das TAR-Syndrom unwahrscheinlich ist. Mittels Durchflusszytometrie konnte in dieser Arbeit in allen TAR-Patienten und Kontrollpersonen eine vergleichbare c-Mpl Expression nachgewiesen werden (Abb. 22B). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der verwendete Ak nur für die Bestimmung der Proteinmenge von c-Mpl mittels Immunblot geeignet bzw. sensitiv genug ist.

Dabei sollte der Anspruch an einen Antikörper, der einen wenig exprimierten Rezeptor auf der Thrombozytenoberfläche nachweist, und die Schwierigkeit, dessen unterschiedliche Expression zu detektieren, beachtet werden. Pro humanem Thrombozyt werden 30-70 TPO-Rezeptoren exprimiert, im Gegensatz zu z. B. 80.000 Kopien des Fibrinogenrezeptors (CD41/CD61) auf einem unstimulierten und doppelt so vielen auf dem aktivierten Thrombozyten [103, 104]. Eine aktuelle Studie über die Eignung von kommerziell erhältlichen c-Mpl-Aks für durchflusszytometrische Analysen kommt ebenfalls zu dem Schluss, dass keiner der getesteten acht, darunter auch der in dieser Arbeit benutzte, geeignet ist [105]. Eine Qualitätskontrolle von künftig benutzten Aks, z. B. mittels einer c-Mpl transfizierten Zelllinie (beispielsweise BaF3) im Gegensatz zu einer untransfizierten Zelllinie, ist notwendig.

4.2.5 TPO-Reaktivität in Thrombozyten als Surrogat für das Maß der Megakaryopoese

Als Surrogat für das Maß der Megakaryopoese wurde in der vorliegenden Arbeit die TPO-induzierte Signaltransduktion in Thrombozyten herangezogen [73, 74]. Thrombozyten entstehen direkt durch Abschnürung von MKs und weisen eine vergleichbare Proteinausstattung auf, haben aber keinen Zellkern [106]. Damit sind keine negativen Transkriptions-abhängigen Regulationsmechanismen der Zytokin-Signalweiterleitung in den Thrombozyten vorhanden. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich die TPO-induzierte Signaltransduktion in Thrombozyten anders verhält als in MKs. Ein Vergleich der TPO-induzierten Signaltransduktion zwischen MKs und Thrombozyten wäre sinnvoll. Der Vorteil, die Megakaryopoese mittels TPO-induzierter Signaltransduktion in Thrombozyten zu überprüfen, liegt in deren leichten Gewinnung. Sämtliche Blutentnahmen von TAR-Patienten in dieser Arbeit erfolgten unabhängig von Blutungsperioden.

4.2.6 TPO-unabhängige Thrombozytenbiogenese

TPO-unabhängige Mechanismen beeinflussen ebenfalls die Thrombozytenbiogenese (Kapitel 1.2.3). Patienten mit Congenitaler amegakaryozytärer Thrombozytopenie weisen bedingt durch Mutationen im TPO-Rezeptor keine TPO-induzierte Signaltransduktion in Thrombozyten auf [71, 72, 107]. Hingegen ist c-Mpl in TAR-Patienten nicht mutiert [81]. TPO^{-/-}- und c-Mpl^{-/-}-Mäuse bilden trotz defekter TPO-induzierter Signaltransduktion funktionsfähige Thrombozyten [53-55]. Die *knockout*-Mäuse weisen noch rund 15% der üblichen Thrombozytenzahlen auf, Patienten mit Muster #1 etwa 25% (Durchschnittswert der Thrombozytenzahlen aus Abb. 14).

SDF-1 und FGF-4 vermitteln die Migration von MKs aus der Stammzellnische zur Blutbahn, deren Reifung sowie die Abschnürung der Thrombozyten [60, 61]. In der vorliegenden Arbeit wurden die Plasmaspiegel beider Zytokine mittels ELISA bestimmt. Diese sind in TAR-Patienten und Kontrollpersonen vergleichbar (Abb. 25). Auch die Proteinmengen von CXCR4 in Thrombozyten von TAR-Patienten entsprechen denen von Kontrollpersonen (Daten nicht gezeigt). Somit trägt vermutlich die TPO-unabhängige Signaltransduktion nicht zum Musterwechsel bei, begünstigt aber vor allem in Patienten mit Muster #1 die geringe Thrombozytenbiogenese. Es kann aber sein, dass Defekte der TPO-unabhängigen Thrombopoese nur lokal (parakrin) im Knochenmark vorliegen und im Blutplasma nicht global nachweisbar sind.

4.3 Funktionsdefekt der Thrombozyten von TAR-Patienten

Die Handfehlstellung vieler TAR-Patienten wird für eine bessere Lebensqualität operativ korrigiert. Die Chirurgen berichten dabei von auftretenden Blutungskomplikationen (persönliche Mitteilung), welche sich nicht nur auf die reduzierte Thrombozytenzahl zurückführen lassen, sondern einen zusätzlichen Funktionsdefekt der Thrombozyten nahelegen. Eine verminderte Expression des Fibrinogenrezeptors (CD41/CD61) und vom vWFR (CD42) kann die Adhäsion der Thrombozyten an das verletzte Blutgefäß negativ beeinflussen. Weniger Kollagenrezeptor (CD29/CD49b), Lamininrezeptor (CD29/CD49f), Fibronektinrezeptor (CD29/CD49e) und CD42 auf der Thrombozytenoberfläche kann die Aggregation der Thrombozyten beeinträchtigen. Daher wird die Rezeptorexpression auf der Thrombozytenoberfläche (Immunphänotypisierung) von TAR-Patienten

beider Phosphorylierungsmuster im Vergleich zu Kontrollpersonen mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

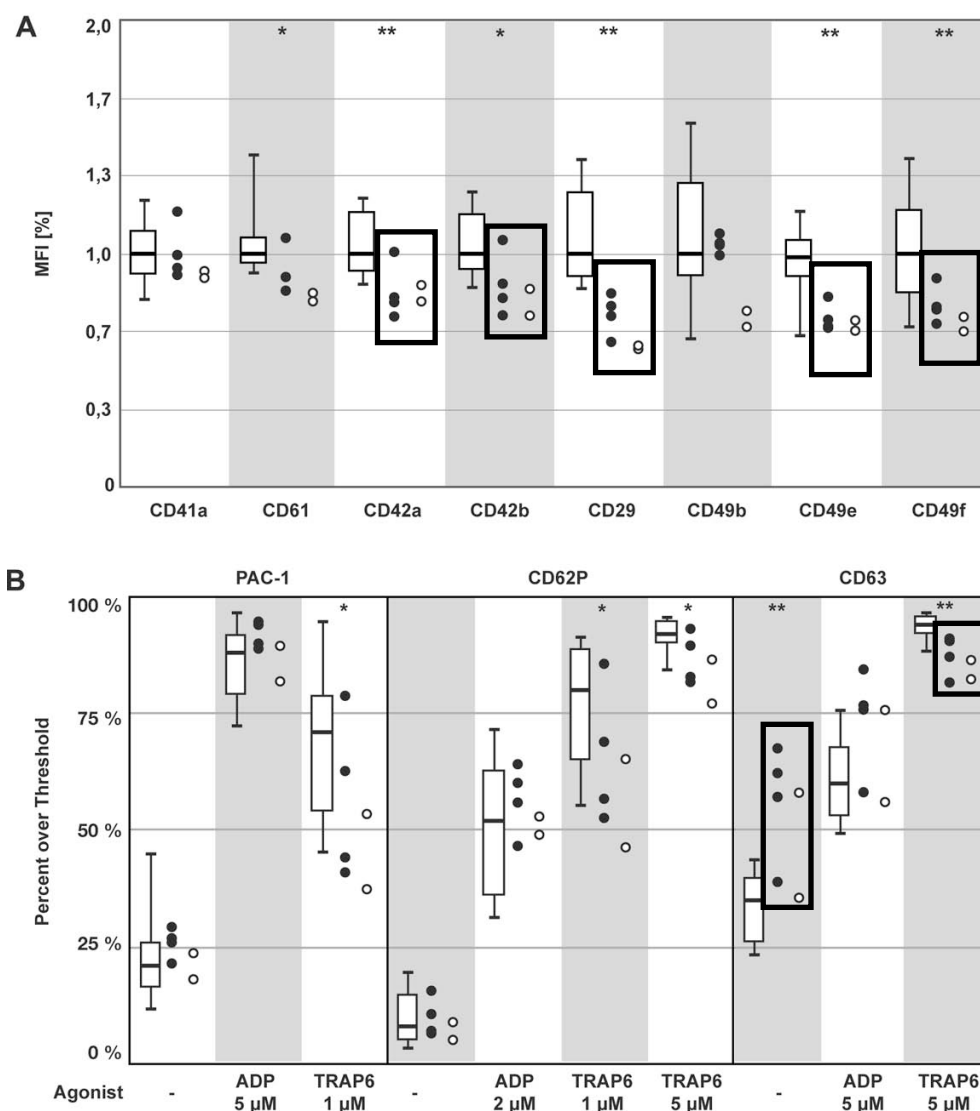


Abb. 37: Thrombozyten von TAR-Patienten weisen einen leichten Funktionsdefekt auf. Von sieben TAR-Patienten wird die Expression der Rezeptoren für die Aggregation und Adhäsion auf der Thrombozytenoberfläche mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Weiterhin werden die Thrombozyten von 13 TAR-Patienten mit ADP und TRAP6 stimuliert und deren Aktivierbarkeit im Durchflusszytometer analysiert. Sechs repräsentative Untersuchungen sind dargestellt. **A** Auf den Thrombozyten der TAR-Patienten und Kontrollpersonen wird mittels mittlerer Fluoreszenzintensität (MFI) die Rezeptorexpression bestimmt. Bei TAR-Patienten ist die Expression des Fibrinogenrezeptors (CD41/CD61) sowie des Kollagenrezeptors (CD29/CD49b) normal. Der Lamininrezeptor (CD29/CD49f) wird leicht, der Fibronectinrezeptor (CD29/CD49e) sowie zwei Untereinheiten vom vWFR (CD42a/CD42b) stark reduziert auf der Thrombozytenoberfläche der TAR-Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen exprimiert. **B** Die Thrombozyten von TAR-Patienten und Kontrollpersonen werden mit ADP und TRAP6 stimuliert. Es wird der Anteil an den Zellen ermittelt, die nach Stimulierung positiv für den bestimmten Marker werden (Prozent über Schwellenwert). In Thrombozyten von TAR-Patienten sind die Aktivierung des Fibrinogenrezeptors (PAC-1) und die α -Granulaausschüttung (CD62P) mit Kontrollpersonen vergleichbar. In TAR-Patienten ist die erhöhte Grundexpression von CD63 auffällig. Weiterhin führt die Stimulation mit 5 μ M TRAP6 nicht zu einer maximalen Ausschüttung der lysosomalen Granula. Weiße Punkte kennzeichnen Patienten mit Muster #1, schwarze Punkte Patienten mit Muster #2. * = signifikant mit p-Wert < 0,05; ** = stark signifikant mit p-Wert < 0,01. Boxen der Kontrollpersonen: 25.-75. Perzentile, Whisker: 5.-95. Perzentile, Balken: Median. Die schwarzen Boxen markieren Auffälligkeiten der TAR-Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen. (Abb. aus [108].)

Letestu berichtet, dass MKs von TAR-Patienten eine reduzierte CD42-Expression aufweisen und nur ein geringer Prozentsatz an MKs vollkommen ausreift und dann Thrombozyten abschnürt [80]. Die erhobenen Daten der Durchflusszytometrie an Thrombozyten von TAR-Patienten können diese These nicht bestätigen. Thrombozyten von TAR-Patienten weisen eine signifikant verminderte Expression von CD42a und CD42b des vWFRs, sowie eine verminderte Expression des Fibronektin- und Lamininrezeptors auf (Abb. 37A). Die Ergebnisse zeigen, dass sich in TAR-Patienten auch von unreifen MKs Thrombozyten abschnüren. Die Diskrepanz der erhobenen Daten mit Letestus Ergebnissen könnte durch die Wahl des Probenmaterials zustande kommen. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Analyse direkt an Thrombozyten von TAR-Patienten. Letestus Untersuchungen hingegen basieren zum Teil auf MKs aus differenzierten CD34⁺ HSCs. Die Gruppe postulierte einen Differenzierungsblock der MKs bei TAR-Patienten. Der Kollagenrezeptor wird erst in einer späten Entwicklungsphase des MKs exprimiert (Abb. 2). Beim TAR-Patienten konnte eine normale Expression dieses Rezeptors nachgewiesen werden (Abb. 37A). Daher kann man eher von einer Störung als einer Blockade der MK-Entwicklung sprechen.

Thrombozyten von TAR-Patienten zeigen im Durchflusszytometer etwas verminderte Werte des Vorwärts- und Seitwärtsscatters, was für kleine und wenig granulierte Thrombozyten spricht (Daten nicht gezeigt). Dies deutet auf eine reduzierte Granulaspeicherung in Thrombozyten von TAR-Patienten hin. Daher könnte die Aktivierbarkeit dieser Thrombozyten beeinflusst sein, wie bereits von zwei anderen Arbeitsgruppen vorgeschlagen [109, 110]. Tatsächlich führt die Stimulation von Thrombozyten der TAR-Patienten mit einer hohen Konzentration von Thrombinrezeptor-Agonist-Peptid 6 (TRAP6) nicht zu einer maximalen Ausschüttung der lysosomalen Granula (CD63, Abb. 37B). Das Maß der Funktionsstörung der Thrombozyten von TAR-Patienten ist unabhängig vom Alter, den Thrombozytenzahlen (Daten nicht gezeigt) und überwiegend dem Phosphorylierungsmuster der TAR-Patienten. Patienten mit Muster #1 weisen auf der Thrombozytenoberfläche eine leicht reduzierte Menge des Kollagenrezeptors auf.

Zusammengenommen deuten diese Daten darauf hin, dass MKs im Knochenmark von TAR-Patienten einen generellen Reifungsdefekt aufweisen und an die gebildeten Thrombozyten weitergeben. Durch den veränderten Immunphänotyp sowie die

reduzierte Ausschüttung lysosomaler Granula weisen Thrombozyten von TAR-Patienten einen leichten Funktionsdefekt auf. Dieser trägt vermutlich in Verbindung mit wenigen Thrombozyten zu der erhöhten Blutungsneigung in TAR-Patienten bei.

4.4 Mausmodelle für das TAR-Syndrom

Die Homologie des Erbguts von Maus und Mensch beträgt über 97% [111]. Der murine Organismus ist ein geeignetes Modellsystem, um mittels gezieltem Gen-*knockout* (transgene Mäuse) die Proteinfunktion von Genen zu bestimmen. Dieser Methode steht die Zufallsmutagenese von Mäusen mittels *N*-Ethyl-*N*-nitrosoharnstoff gegenüber. Hier versucht man, einem auffälligen Phänotyp eine Ursache zu zuordnen. Da die Ätiologie des TAR-Syndroms bislang unbekannt ist, konnte bisher keine *knockout*-Maus als Modell des TAR-Syndroms generiert werden. Dennoch gibt es *knockout*-Mäuse, die einzelne gestörte Komponenten des TAR-Syndroms nachahmen. Im Folgenden wird ein Überblick über relevante Mausmodelle für das TAR-Syndrom gegeben.

Knochenbildung

Die Embryogenese wird durch eine Vielzahl von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren reguliert, unter anderem durch den *Transforming growth factor-beta 2*. Der *knockout* dieses Gens in Mäusen resultiert in einer erhöhten Mortalitätsrate des Embryos und diversen Entwicklungsdefekten von Herz, Lunge, Schädel, Wirbelsäule, Auge, Ohr, Urogenitaltrakt und der Extremitäten [112]. Kürzlich wurde eine Promotermutation des Gens in vier TAR-Patienten beschrieben, die aber nicht die Genexpression beeinflusst [113].

HOX-Gene regulieren die Morphogenese des Embryos. *HOXA11*^{-/-}, *HOXD11*^{-/-} und *HOXA10*^{-/-}-Mäusen fehlen die Radien und Ulnae [84]. Patienten mit Radio-ulnärer Synostose mit amegakaryozytärer Thrombozytopenie weisen Fehlbildungen des Unterarms auf. Hier ist der Radiusknochen vorhanden, aber mit der Ulna zusammengewachsen. Ursächlich dafür sind Mutationen in *HOXA11* [114]. Allen TAR-Patienten fehlen die Radien. Die DNA von TAR-Patienten weist keine Mutationen der kodierenden Bereiche der drei HOX-Gene auf [85]. Mutationen in den Promoterbereichen der Gene oder epigenetische Veränderungen konnten bisher nicht ausgeschlossen werden. Die HOX-Proteine wirken als TF. In der vorliegenden Arbeit wurde die Bindung von HOXA11 an ein DNA-responsives Element in

Thrombozyten von TAR-Patienten und Kontrollpersonen analysiert. Beide zeigten vergleichbare Signalstärken von DNA-gebundenem HOXA11 (Daten nicht gezeigt). Jedoch spiegelt vermutlich die Analyse in den kernlosen Thrombozyten nicht die Situation während der Embryogenese wieder. Für diese Experimente wären kernhaltige MKs oder megakaryozytäre Zelllinien geeigneter.

Hämatopoese

HOX-Gene regulieren die Morphogenese eines Organismus. Darüber hinaus zeigten verschiedene Arbeitsgruppen auch andere Funktionen der HOX-Gene unter anderem in der Hämatopoese auf. HoxB4 induziert *in vitro* die Differenzierung früher Stammzellen zu definierten HSCs und verstärkt *in vivo* das regenerative Potential von HSCs. [115, 116]. Neben HOXB4 greifen weitere HOX-Gene in die Hämatopoese ein, z. B. die Überexpression von HoxA10 stimuliert *in vitro* die Entwicklung von murinen MKs [85].

Die relevanten Gene für die TPO-induzierte Signaltransduktion wurden in Mausmodellen ausgeschaltet. $c-Mpl^{-/-}$ bzw. $TPO^{-/-}$ -Mäuse sind ein Modell für Patienten mit Congenitaler amegakaryozytärer Thrombozytopenie. Diese *knockout*-Mäuse können auch als Modell für TAR-Patienten mit Muster #1 angesehen werden. Die gestörte TPO-induzierte Signaltransduktion in den *knockout*-Mäusen sowie bei Congenitalen amegakaryozytären Thrombozytopenie- und TAR-Patienten resultiert in einer reduzierten Thrombozytenzahl (Abb. 10) [53-55]. Im Gegensatz zu den funktionalen Thrombozyten der $c-Mpl^{-/-}$ bzw. $TPO^{-/-}$ -Mäuse weisen die Thrombozyten der TAR-Patienten einen leichten Funktionsdefekt auf (Kapitel 4.3) [57]. $JAK2^{-/-}$ -Mäuse sind auf Grund einer defekten Erythropoese und $STAT3^{-/-}$ -Mäuse wegen fehlreguliertem Zellwachstum und Apoptose embryonal letal [117-119]. TAR-Patienten mit Muster #1 weisen vermutlich in MKs und Thrombozyten kein phosphorylierbares Jak2 auf. Würde Jak2 generell in allen Zellen fehlen, wäre der humane Organismus vermutlich ebenfalls nicht lebensfähig. Tabelle 5 gibt einen Überblick über Auffälligkeiten und Fehlbildungen lebensfähiger transgener STAT-Mäuse.

Tabelle 5: Transgene STAT-Mäuse. Es sind Auffälligkeiten und Fehlbildungen transgener STAT-Mäuse aufgelistet

transgene Mäuse	Fehlbildungen
STAT1 ^{-/-}	- trotz reduzierter Endomitose der MKs mit normalen Thrombozytenzahlen [120, 121] - Defekt der Interferon-Signalweiterleitung [118]
STAT3 konditionale <i>knockout</i> -Mäuse	abhängig vom Gewebe: vielseitige Störungen der Proliferation, Antiapoptose, Apoptose und Zellmotilität [122-124]
STAT3 dominant-negative <i>knockin</i> -Maus in MKs	Proliferationsverlust von MK-Vorläuferzellen [125]
STAT5a ^{-/-}	gestörte Milchdrüsenentwicklung [118]
STAT5b ^{-/-}	gestörte Entwicklung geschlechtsspezifischer Gewebe [118]
STAT5a ^{-/-} /5b ^{-/-}	weibliche Mäuse: Defekt der Ovarienentwicklung, sind unfruchtbar [118]

4.5 Genetische Aspekte des TAR-Syndroms

Alle TAR-Patienten weisen, wenn auch in unterschiedlichem Umfang, die Mikrodeletion 1q21.1 auf (Abb. 6). Die Minimaldeletion umfasst 200 kb (Position: 144.1-144.3 MB) und die Maximaldeletion 500 kb (Position: 144.1-144.6 MB). In den meisten TAR-Patienten sind 17 Gene (400kb, Position: 144.1-144.5 MB) deletiert [83]. Ein TAR-Patient mit der Maximaldeletion zeigt einen sehr schwachen Phänotyp. Im Gegensatz dazu ist eine TAR-Patientin mit der Minimaldeletion skelettal sehr stark betroffen (Daten nicht gezeigt). Somit scheint die Anzahl der deletierten Gene nicht mit dem Ausmaß der Skelettfehlbildungen im Zusammenhang zu stehen.

Die Mikrodeletion auf Chromosom 1 wurde bislang in über 80 untersuchten TAR-Patienten nachgewiesen. Die Analyse zahlreicher Familienstammbäume ergab, dass bei 75% der TAR-Patienten die Mikrodeletion von einem gesunden Elternteil vererbt wird [83]. Daher ist die Mikrodeletion zur Ausprägung des TAR-Syndroms notwendig, aber nicht ausreichend. Zur Ausprägung des TAR-Syndroms ist eine Mutation der hemizygot vorliegenden Gene der Minimaldeletion auf dem nicht betroffenen Allel naheliegend. Die kodierenden Bereiche dieser Gene zeigen aber keine genetischen Veränderungen auf, die Gene ANKRD34 und NUDT17 wurden allerdings nicht sequenziert [83]. Eine Zusammenlagerung der Schwesterchromatide, auf Grund der zentromernahen Lage der Mikrodeletion, und Chromosomenbrüche im Genom wurden mittels Chromosomenanalyse nicht nachgewiesen [77].

In der Tabelle 6 sind die in der Literatur beschriebenen Proteinfunktionen der Gene der Minimaldeletion zusammengetragen. Es liegen keine Informationen über

NUDT17, LIX1L, ANKRD34 und 35 vor. Im Vergleich dazu haben HFE2^{-/-}, TXNIP^{-/-}, PEX11B^{-/-} und ITGA10^{-/-}-Mäuse entscheidend zur Charakterisierung der jeweiligen Genfunktion beitragen. Dies zeigt, wie unerlässlich Mausmodelle zur Bestimmung von Proteinfunktionen sind.

Tabelle 6: Proteinfunktionen der Mikrodeletionsgene. Alle bekannten Proteinfunktionen der Mikrodeletionsgene und verfügbare *knockout*-Mäuse sind aufgelistet.

Mikrodeletionsgen	<i>knock out</i> -Maus	Proteinfunktion
HFE2 Hemochromatosis type 2 (juvenile)	[126]	- reguliert den Eisenhaushalt durch die Förderung der Expression von Hpcidin [127] - Mutationen in HFE2 verursachen juvenile Hämochromatose [128]
TXNIP Thioredoxin interacting protein	[129]	- Förderung apoptotischer Prozesse [130] - Erkenntnisse aus TXNIP ^{-/-} -Mäusen: 1) Redoxprotein [129] 2) reduziert LT-HSC-Population mit erschöpften Selbsterneuerungs-Potential (Mobilisierung von HSCs) [131] 3) reguliert Fettsäureoxidation [132]
POLR3GL Polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide G (32kD)-like	nein	Untereinheit der RNA-Polymerase III [133]
ANKRD34 Ankyrin repeat domain 34A	nein	unbekannt
LIX1L Lix1 homolog (mouse)-like	nein	unbekannt, hat Sequenzhomologie zu LIX1 (exprimiert bei Hintergliedmaßenentwicklung von Hühnern [134])
RBM8A RNA binding motif protein 8A	nein	- Untereinheit vom <i>Exon junction complex</i> [135] - mRNA mit vorzeitigen <i>Stopcodon</i> wird abgebaut (<i>Nonsense mediated mRNA decay</i>) [136] - Depletion von RBM8A geht mit reduzierter STAT3-Phosphorylierung in IL-6 stimulierten Hep3B-Zellen einher [86] - Y14 und Magoh regulieren STAT3-Aktivierung [137]
GNRHR2 Gonadotropin-releasing hormone (type 2) receptor 2	nein	Pseudogen [94]
PEX11B Peroxisomal biogenesis factor 11 beta	[138]	- Aufrechterhaltung und Proliferation von Peroxisomen [139] - fördert Entwicklungsprozesse, Aufrechterhaltung des Blutdrucks [138] - fördert Migration und unterdrückt die Apoptose von Nervenzellen [138]
ITGA10 Homo sapiens integrin, alpha 10	[140]	- Kollagen Typ II bindendes Integrin auf Chondrozyten [141] - fördert Chondrozytentwicklung und unterstützt die Morphogenese und Funktion von Wachstumsfugen langer Röhrenknochen [140]
ANKRD35 Ankyrin repeat domain 35	nein	unbekannt
PIAS3 Protein inhibitor of activated STAT	nein	- Transkriptionsregulation: 1) inhibiert die Bindung von pSTAT3 an DNA [52] 2) sumoyliert NF-κB, SMAD-Proteine p53 [142, 143] - Knochenerhaltung: negativer Regulator der Osteoklastogenese [144] - fördert Expression von Ferritin H-RNA (Untereinheit des Ferritinproteins) [145]
NUDT17 Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 17	nein	unbekannt

4.5.1 Analyse von PIAS3 und Hämojuvelin in Thrombozyten

PIAS3

PIAS3 wurde initial als negativer Regulator von pSTAT3 innerhalb der IL-6-induzierten Signaltransduktion identifiziert. Dabei blockt PIAS3 die Bindung von pSTAT3 an DNA, vermutlich durch dessen Dephosphorylierung, und verhindert die pSTAT3-vermittelte Genexpression (Kapitel 1.2.2.2) [52, 146].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Proteinmenge von PIAS3 in den Thrombozyten von TAR-Patienten bestimmt. Diese ist in Folge der Hemizygotie von PIAS3 um rund 50% im Vergleich zu Kontrollpersonen reduziert (Abb. 31B). Das könnte in MKs der TAR-Patienten zu einer vermehrten Bindung der STAT3-Dimere an DNA beitragen. In Thrombozytenlysaten von Patienten mit Muster #1B wurden mittels EMSA kaum pSTAT3-Dimere am responsiven DNA-Element nachgewiesen. In Patienten mit Muster #2 konnten pSTAT3-Dimere am responsiven DNA-Element detektiert werden (Abb. 32). Jedoch sind die detektierten Signalstärken in Patienten im Vergleich zu den Kontrollpersonen schwächer anstatt stärker. Diese Ergebnisse deuten auf keine geförderte Bindung der pSTAT3-Dimere an DNA in MKs von TAR-Patienten durch die reduzierte Proteinmenge von PIAS3 hin.

Darüber hinaus wurde erstaunlicherweise in den Thrombozytenlysaten von TAR-Patienten und Kontrollpersonen ein am responsiven DNA-Element gebundener Komplex aus STAT3 und PIAS3 nachgewiesen, wobei die Signalstärke dieses Komplexes bei TAR-Patienten höher ist (Abb. 32). Außerdem nimmt in den Thrombozyten der Patienten mit Muster #1B die Signalstärke des Komplexes nach TPO-Stimulation zu. Diese Beobachtung ist gegensätzlich zur beschriebenen Funktion von PIAS3 in der Literatur. Es inhibiert die Bindung von pSTAT3 an DNA [52]. Ob der ausgeprägte STAT3/PIAS3-Komplex zu den niedrigen Thrombozytenwerten in TAR-Patienten oder zum Signaldefekt in Patienten mit Muster #1B beiträgt, ist ungewiss. Im Allgemeinen könnten alle heterozygot vorliegenden Mikrodeletionsgene die Genexpression beeinflussen. In A549-Zellen führt die Überexpression von PIAS3 im Vergleich zur siRNA-vermittelten Depletion von STAT3 zu einem unterschiedlichen mRNA-Expressionsprofil. Ohne hier näher auf die Diversität transkribierter Gene einzugehen, sind die größten Unterschiede in der Expression von Genen der Krebsentwicklung und der Interferon-Signalweiterleitung zu finden [147]. Daher ist es künftig von großer Relevanz, das Transkriptom von Thrombozyten in TAR-Patienten mit Kontrollspendern zu

vergleichen. Eine aktuelle Publikation berichtet über die Anwendung dieser Technik in Thrombozyten [148].

PIAS3 fördert die Expression von Ferritin H-RNA, dessen Protein eine Untereinheit des Ferritin-Komplexes ist [145]. Somit hat PIAS3 neben Hämojuvelin auch eine regulatorische Funktion auf den Eisenhaushalt. Einige TAR-Patienten sind nur in den ersten Lebenswochen anämisch, im Jugend- und Erwachsenenalter nicht (Kapitel 3.5.3). Dies legt nahe, dass die reduzierte Proteinmenge von PIAS3 den Eisenhaushalt der TAR-Patienten nicht negativ beeinflusst.

Hämojuvelin

Die juvenile Hämochromatose wird durch eine *loss of function*-Mutation (Punktmutation) in HFE2 verursacht [128]. Diese Patienten weisen eine reduzierte Expression des Eisensensors Hcpidin auf, wodurch eine erhöhte Eisenaufnahme ins Gewebe erfolgt. Nur wenn dies frühzeitig medikamentös behandelt wird, können Leberzirrhose, Zuckerkrankheit, Gelenkschmerzen und Herzkrankheiten verhindert werden. Erhöhte Eisen-, Transferrin- und Ferritinspiegel sind Anzeichen einer Hämochromatose. Während der Anfertigung der vorliegenden Arbeit wurden diese Blutwerte von TAR-Patienten bestimmt. Alle Eisenwerte befinden sich im Referenzbereich (Kapitel 3.5.3). Einzig auffällig sind die im unteren Normbereich detektierten, sehr geringen Ferritinwerte in Patienten mit Muster #1 im Gegensatz zu Patienten mit Muster #2 (Abb. 29). Ob ein Zusammenhang zwischen Musterwechsel und Ferritinwerten besteht, ist unklar.

Ein kommerziell verfügbarer Ak ermöglichte die direkte Bestimmung der Proteinmenge von Hämojuvelin in Thrombozyten von TAR-Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen. Die Patienten wiesen eine um 50% reduzierte Proteinmenge auf (Abb. 30). Diese korreliert mit der Hemizygotie von HFE2. Dessen reduzierte Menge scheint aber auf Grund normaler Eisenwerte keinen grundlegenden negativen Einfluss auf die globale Eisenregulation in TAR-Patienten zu haben.

4.5.2 Analyse der Mikrodeletionsgene in LCLs

Genexpressionsanalysen

Die kodierenden Bereiche der Mikrodeletionsgene wiesen keine Mutationen auf dem nicht betroffenen Allel auf [83]. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Promotermutationen der Mikrodeletionsgene zur Ausprägung des TAR-Syndroms beitragen. Dazu erfolgte der Vergleich der mRNA-Expression der Gene in LCLs von TAR-Patienten und del-Trägern mit Kontrollpersonen. Die untersuchten Gene (POLR3GL, ANKRD34; LIX1L, RBM8A, PEX11B, PIAS3 und NUDT17) zeigten tatsächlich eine um 50% reduzierte Genexpression in LCLs von TAR-Patienten und del-Trägern (Abb. 28). Dies deutet darauf hin, dass keine Promotermutationen der Gene vorliegen, die einen Einfluss auf deren Expressionsstärke in LCLs haben und so eine veränderte Proteinexpression nahe legen könnten. Interessanterweise wurde eine um mehr als 50% reduzierte Genexpression von TXNIP in LCLs von TAR-Patienten und del-Trägern detektiert (Abb. 28). Darüber hinaus ist die mRNA-Expression von TXNIP in MKs achtmal höher als in LCLs (Abb. 27).

TXNIP^{-/-}-Mäuse weisen eine reduzierte LT-HSC-Population auf, deren Selbsterneuerungspotential erschöpft ist [131]. Außerdem ist die durch SDF-1 und Osteopontin vermittelte Interaktion zwischen HSCs und dem Knochenmark reduziert, wodurch der Verbleib von HSCs im Knochenmark gestört ist und die Mobilisierung dieser Zellen gefördert wird. [131]. Daher könnte die Hemizygotie von TXNIP zu einer veränderten Ausstattung des Knochenmarks beitragen. Eine kürzlich erschienene Publikation identifiziert Txnip erstmalig als negativen Regulator von mTOR: eine Überexpression von Txnip reduziert die mTOR-Aktivität, wohingegen der knockdown von Txnip mittels siRNA die mTOR-Aktivität steigert [149]. Somit könnte eine reduzierte Menge an Txnip mTOR aktivieren und Apoptoseprozesse inhibieren. Neueste Veröffentlichungen unterstützen diese Theorie und schreiben Txnip eine Förderung der Apoptose zu [130]. Vielleicht trägt reduziertes Txnip in TAR-Patienten, wie in Abb. 28 in LCLs detektiert, zur Aktivierung von mTOR (Kapitel 3.2.3) und somit zur Thrombozytenbiogenese (durch antiapoptische Prozesse) vor allem bei TAR-Patienten mit gestörter TPO-induzierter Signaltransduktion (Muster #1) bei. Künftig sollte die Proteinmenge von Txnip in Thrombozyten von TAR-Patienten bestimmt werden. Mittlerweile sind Epitop-spezifische Aks gegen dieses Protein kommerziell erhältlich.

Modellsystem LCLs

Ein limitierender Faktor von Analysen an sehr seltenen Erkrankungen wie dem TAR-Syndrom ist das begrenzt zur Verfügung stehende Untersuchungsmaterial. In der vorliegenden Arbeit wurde hauptsächlich mit Thrombozyten gearbeitet. Die Genexpressionsanalysen wurden, auf Grund des geringen Probenmaterials und dem geringen RNA-Gehalt der Thrombozyten, stellvertretend in LCLs durchgeführt. LCLs weisen den genetischen Status der TAR-Patienten auf, haben einen Zellkern und sind in der Zellkultur in gewünschter Menge expandierbar (Kapitel 2.4). HFE2, ANKRD35 und ITGA10 werden in LCLs nicht exprimiert und konnten dementsprechend nicht untersucht werden (Kapitel 3.5.2). Sie bleiben weiterhin Kandidatengene, deren Hemizygotie zur Ausprägung des TAR-Syndroms beitragen könnte. Daran zeigt sich der Nachteil dieses Modells: LCLs sind lymphoide Zellen. MK-spezifische Defekte lassen sich in LCLs nicht nachweisen. Man bräuchte ein Modell mit MK-Charakter. Dies könnte durch die Generierung pluripotenter Stammzellen aus somatischen Zellen (z. B. aus den LCLs) gewährleistet werden. Die induzierten pluripotenten Stammzellen könnten zu MKs differenziert und als Untersuchungsmaterial genutzt werden. Eine andere Möglichkeit ist, CD34⁺ HSCs aus dem peripheren Blut von TAR-Patienten zu isolieren und in MKs zu differenzieren [80]. Auch hier sind größere Blutmengen nötig, die sich nur bei erwachsenen Patienten realisieren lassen.

4.5.3 „Modifier of TAR“ – SNP in RBM8A

Assoziation von SNP und *loss of function* von RBM8A

Da die Mikrodeletion auf Chromosom 1 zur Ausprägung des TAR-Syndroms nicht ausreicht, wurde in der vorliegenden Arbeit nach einem weiteren beitragenden Faktor gesucht. Dieser entsteht *de novo* oder stammt vom Elternteil ohne Mikrodeletion. In Kooperation mit dem Sanger-Institut in Cambridge und Arbeitsgruppen aus Frankreich, Belgien und den Niederlanden wurde initial von fünf TAR-Patienten das Exom inklusive exonnaher intronischer Bereiche, 5'-UTRs, und 3'-UTRs sequenziert. Bei der parallelen Hochdurchsatz-Sequenzierung mittels *Next generation sequencing* wird die Basenabfolge von Millionen DNA-Fragmenten gleichzeitig in einem Lauf bestimmt. Dabei wurde in der DNA von vier TAR-Patienten ein 5'-UTR-SNP sowie bei einem Patienten ein SNP im ersten Intron von RBM8A identifiziert (Kapitel 3.6.1). Letzterer SNP ist neu identifiziert und kommt in der Bevölkerung nur zu 0,5% vor.

Der 5'-UTR-SNP war bereits vorher in der SNP-Datenbank von *National Center for Biotechnology Information* beschrieben und kommt in 3% der Bevölkerung vor. Anschließend wurden die Promotersequenz von RBM8A und der Bereich des ersten Introns von 25 TAR-Patienten unserer Kohorte sequenziert. Jeder TAR-Patient wies in der DNA einen der beiden SNPs auf (Tabelle 8 im Anhang). In der DNA von weiteren 23 TAR-Patienten unserer Kooperationspartner wurde ebenfalls jeweils einer der beiden SNPs nachgewiesen [150].

Für ein besseres Verständnis der Pathogenese des TAR-Syndroms erfolgte am Sanger-Institut die Sequenzierung des Bereichs 1q21.1 in einer Vielzahl von Kontrollpersonen, TAR-Patienten und deren Eltern (Tabelle 7).

Tabelle 7: 1q21.1-Sequenzierung. Sequenzierung des Bereichs 1q21.1 in Kontrollpersonen der *Cambridge BioResource* [95], TAR-Patienten sowie deren Eltern. Die Anzahl der untersuchten Personen ist angegeben und die Berliner Kohorte ist gesondert gekennzeichnet. Diese Daten wurden in Zusammenarbeit mit Kees Albers vom Sanger-Institut in Cambridge erhoben [150].

Personengruppe	Ergebnis
7504 Kontrollpersonen	Auf einem Allel wurde in drei Prozent der untersuchten Kontrollpersonen der 5'-UTR-SNP und in einem halben Prozent der Intron-SNP nachgewiesen.
5919 Kontrollpersonen	Keine Kontrollperson wies die Mikrodeletion auf Chromosom 1 auf.
20 del-Träger (Berliner Kohorte)	In 75% der Elternteile wurde die Mikrodeletion nachgewiesen.
7 SNP-Träger (Berliner Kohorte)	In jedem Elternteil ohne Mikrodeletion auf Chromosom 1 bzw. in einem der Elternteile (<i>de novo</i> -Erbgang) wurde der jeweilige SNP der betroffenen Kinder auf einem Allel nachgewiesen.
Vater eines TAR-Patienten (gesund)	In der DNA des Vaters wurde auf beiden Allelen von RBM8A der 5'-UTR-SNP detektiert.
51 TAR-Patienten (davon 25 von der Berliner Kohorte)	Auf dem einen Allel wurde die Mikrodeletion, auf dem anderen einer der beiden SNPs in RBM8A nachgewiesen.
1 TAR-Patient	Ein Allel von RBM8A weist den 5'-UTR-SNP, das andere eine vier Basenpaar umfassende Leseraster-Insertion auf.
1 TAR-Patient	Auf dem einen Allel wurde der 5'-UTR-SNP, auf dem anderen ein vorzeitiges <i>Stopcodon</i> in RBM8A nachgewiesen.

Zwei Patienten der Kohorte der Kooperationspartner wiesen anstelle der Mikrodeletion eine vier Basenpaar umfassende Leseraster-Insertion bzw. ein vorzeitiges *Stopcodon* in RBM8A auf (Tabelle 7). Diese Mutationen führen zu einer

loss of function-Mutation von RBM8A (RBM8A-Nullallel). In der DNA des Vaters eines TAR-Patienten wurde in beiden Allelen der 5'-UTR-SNP in RBM8A nachgewiesen. Der Vater ist gesund und nicht am TAR-Syndrom erkrankt. SNP-Träger weisen wie die del-Träger normale Thrombozytenwerte und keine Radiusaplasie auf.

Durch die Sequenzierung des Bereichs 1q21.1 von über 13.500 Personen wird postuliert: das TAR-Syndrom ist mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit mit einem SNP in RBM8A auf dem einen Allel und einer *loss of function*-Mutation auf dem anderen Allel assoziiert ($p\text{-Wert} < 5 \cdot 10^{-228}$). Diese Mutationen treten allein und erst recht in Kombination sehr selten auf. Die *loss of function*-Mutation von RBM8A erfolgt vorwiegend durch die Mikrodeletion 1q21.1. TAR-Patienten erhalten den SNP in RBM8A von einem Elternteil und zu 75% wird die Mikrodeletion von dem anderen Elternteil vererbt bzw. entsteht zu 25% *de novo*.

Jedoch wurde von den Kooperationspartnern auch in einer TAR-Patientin indischer Ethnität und ihrem Abort nur die Mikrodeletion und kein SNP in RBM8A nachgewiesen [150]. Dies legt dem TAR-Syndrom weiterhin ein komplexes Vererbungsmuster nahe. Vielleicht tragen mehrere genetische Variationen zur Ausprägung des TAR-Syndroms bei.

Evi-1 reprimiert die Genexpression von RBM8A in Thrombozyten

Ein SNP in der Regulatorregion eines Gens kann Bindungsstellen für TF verändern und so die Genexpression beeinflussen. Durch den 5'-UTR-SNP in RBM8A bindet der TF Evi-1 an diese Sequenz (Abb. 34). RBM8A kodiert für das Protein Y14. Da Evi-1 laut Gewebeatlas in den Geweben hoch exprimiert wird, in denen Y14 kaum vorliegt, kann eine repressorische Wirkung von Evi-1 auf RBM8A angenommen werden. Tatsächlich wurde in den Thrombozyten von TAR-Patienten überwiegend eine stark reduzierte Proteinmenge von Y14 nachgewiesen (Abb. 35). Analysen der Kooperationspartner bestätigten in einem TAR-Patienten kein Y14 bzw. eine reduzierte Menge an Y14 in den Thrombozyten von drei TAR-Patienten. Darüber hinaus haben die Kooperationspartner den Promoterbereich von RBM8A mit der 5'-UTR-SNP-Sequenz in eine MK-Zelllinie kloniert und mittels Luciferase-Assay eine reduzierte Transkription von RBM8A bestimmt [150].

Interessanterweise geht die siRNA-vermittelte Depletion von Y14 mit einer reduzierten STAT3-Phosphorylierung, DNA-Bindung und Genexpression in IL-6-stimulierten Hep3B-Zellen einher [86]. Vielleicht trägt in MKs von TAR-Patienten die

reduzierte Proteinmenge von Y14 zu einer verminderten Bindung von pSTAT3 an die DNA bei, was zu einer Reduktion der Thrombozytenbiogenese führt. In TAR-Patienten mit Muster #2 wurde, trotz der mit dem Kontrollspender vergleichbaren TPO-induzierten Signaltransduktion (Abb. 16, 18 und 20), eine reduzierte Bindung von pSTAT3 am responsiven DNA-Element nachgewiesen (Abb. 32). Dies könnte zu einer fehlerhaften Signaltransduktion und letztlich zu den niedrigen Thrombozytenzahlen knapp unterhalb des Referenzbereichs beitragen. Künftig sollte auch in Osteoblasten von TAR-Patienten die Proteinmenge von Y14 im Vergleich zu Kontrollpersonen bestimmt werden. Die Ausweitung der Analyse auf die Knochenbildung trägt zu einem besseren Verständnis der Ätiologie des TAR-Syndroms bei.

Die Hypothese der vorliegenden Arbeit: „Eine Mutation der Mikrodeletionsgene des nicht betroffenen Allels trägt zur Ausprägung des TAR-Syndroms bei“ wurde durch den SNP in RBM8A bei TAR-Patienten bestätigt. Die Untersuchungen in LCLs konnten jedoch keinen Hinweis auf diese Promotermutation von RBM8A geben. Eine Erklärung dafür ist, dass Evi-1 laut Gewebeatlas in MKs exprimiert wird, aber nicht in LCLs. Daher kann Evi-1 nicht repressorisch auf RBM8A in LCLs der TAR-Patienten wirken und der Effekt bleibt dort unbeobachtet.

Funktion von RBM8A

Y14 ist neben den Proteinen Magoh, eIF4AIII und TAP (mRNA Exportfaktor) Teil vom *Exon junction complex* [135]. Nicht nur Y14, auch Magoh reguliert die STAT3-Aktivierung [137]. Der *Exon junction complex* wird während des Spleißens der mRNA angelagert und erhöht den mRNA-Export sowie die Translationseffizienz. Eine Depletion von Y14 inhibiert die erhöhte Translationseffizienz gespleißter mRNA gegenüber intronloser mRNA [151]. Der *Exon junction complex* hat eine Funktion im sogenannten *nonsense mediated mRNA decay*-Mechanismus, wodurch in eukaryotischen Zellen mRNAs mit einem vorzeitigen *Stopcodon* abgebaut werden [136]. Vielleicht trägt die reduzierte Proteinmenge von Y14 zur Störung des *nonsense mediated mRNA decay*-Mechanismus oder zu einer niedrigen Translationseffizienz und so zur Pathogenese des TAR-Syndroms bei.

Der SNP in der regulatorischen Region von RBM8A reprimiert zwar die Expression von Y14, aber beeinflusst vermutlich nicht dessen Proteinfunktion. In der Literatur sind mindestens zwei Erkrankungen von BMFSs bekannt, bei der eine Genmutation die Proteinfunktion und Translation beeinträchtigt. In Patienten mit dem autosomal

rezessiven Shwachman-Diamond-Syndrom treten Mutationen im *Shwachman-Bodian-Diamond-Syndrome-Gen* auf und verursachen einen defekten Aufbau der Ribosomen [152]. Eine Vielzahl von Mutation der ribosomalen Proteine sind in über der Hälfte der Patienten mit dem Diamond-Blackfan-Syndrom nachgewiesen worden. Die Mutationen verursachen eine ribosomale Haploinsuffizienz, welche die Translationseffizienz von mRNAs reduziert [153].

4.6 Ausblick

Die vorliegende Arbeit postuliert, dass das TAR-Syndrom mit einer *loss of function*-Mutation und einem SNP in RBM8A auf dem verbleibenden Allel assoziiert ist. Letzterer wird von einem Elternteil vererbt. Zu 75% erhält der TAR-Patient die *loss of function*-Mutation von RBM8A in Form der Mikrodeletion von dem anderen Elternteil. Zu 25% entsteht die Mikrodeletion *de novo*. Diese Erkenntnis wird künftig bei der genetischen Beratung von TAR-Patienten Anwendung finden. Den Patienten und deren Angehörigen kann eine Vorhersage über die Wahrscheinlichkeit der Ausprägung des TAR-Syndroms bei bestehendem Kinderwunsch gegeben werden.

In Zukunft sollte die Funktion von Y14 besser charakterisiert werden. Dazu stehen die Techniken der Überexpression und der Depletion von Y14 zur Verfügung. Letztere ist weitaus interessanter, da dies der Situation in Patienten mit TAR-Syndrom entspricht. Der Einfluss der reduzierten Proteinmenge von Y14 auf die Entwicklung der Gliedmaßen und der HSCs während der Embryogenese zwischen der 8. und 12. Schwangerschaftswoche, sowie auf die MK-Entwicklung sollte untersucht werden. Dadurch könnte man klären, ob eine reduzierte Proteinmenge von Y14 zur Thrombozytopenie und der Radiusaplasie der TAR-Patienten beiträgt. Dazu stehen mehrere Modellorganismen zur Verfügung.

CD34⁺ HSCs könnten *in vitro* zu MKs differenziert werden. Interessant ist, ob die Depletion von Y14 diese Entwicklung stört. Zebrabärblinge mit depletiertem Y14-Homolog *wigh* sind embryonal letal (persönliche Mitteilung der Kooperationspartner). Jedoch könnte die Depletion von *wigh* mittels Morpholino oligos in Zebrabärblingen neue Erkenntnisse der Thrombopoese hervorbringen. Künftig sollten auch die Knochenfehlbildungen der TAR-Patienten näher charakterisiert werden. Dafür sind konditionale RBM8A^{-/-}-Mäuse unumgänglich.

Rowley *et al.* stellen eine etablierte Technik zur Bestimmung des Transkriptoms von Thrombozyten vor. Dazu wird RNA aus Thrombozyten isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels *Next generation sequencing* das Transkriptom bestimmt [148]. Mit dieser Methode könnten zwischen TAR-Patienten, del-Trägern und Kontrollpersonen Unterschiede der Genexpression auf RNA-Ebene und differenzielle Spleißvarianten detektiert werden, um weitere Faktoren aufzudecken, die zur Ausprägung des TAR-Syndroms beitragen.

5 Zusammenfassung

Thrombozyten sind zellulärer Bestandteil des Blutes und essentiell für die primäre Hämostase. Das *Thrombocytopenia-absent radii* (TAR)-Syndrom ist eine seltene angeborene Erkrankung, die durch Mangel an Thrombozyten (Thrombozytopenie) und Radiusaplasie gekennzeichnet ist. Die Mehrheit der TAR-Patienten zeigte nach den ersten zwei Lebensjahren einen Anstieg der Thrombozytenzahlen auf, bei einem Viertel waren diese zum Teil noch als Erwachsene anhaltend niedrig. Alle Patienten weisen eine Mikrodeletion auf Chromosom 1q21 auf. Zu 75% wird diese von einem gesunden Elternteil vererbt. Somit ist die Deletion zur Ausprägung des TAR-Syndroms notwendig, aber nicht ausreichend. Die molekularen Ursachen der Erkrankung sind bislang kaum verstanden. In dieser Arbeit wurde die Thrombopoietin (TPO)-induzierte Signaltransduktion in Thrombozyten von TAR-Patienten für ein besseres Verständnis der Thrombozytenbiogenese charakterisiert.

In zwölf TAR-Patienten unter 18 Jahren mit sehr geringen Thrombozytenzahlen wurde eine defekte TPO-induzierte Signaltransduktion des Jak/STAT-, PI3K/Akt- und Raf/Erk-Signalwegs in Thrombozyten nachgewiesen (Muster #1). Ursächlich dafür ist die nicht phosphorylierbare Januskinase 2. Diese konnte erstmals *ex vivo* als Schlüsselkinase der TPO-induzierten Signaltransduktion bestätigt werden.

Elf TAR-Patienten über 18 Jahren zeigten eine unauffällige TPO-induzierte Signaltransduktion (Muster #2). Trotzdem weisen diese Patienten Thrombozytenzahlen unterhalb des Referenzbereichs auf. In gesunden Elternteilen der TAR-Patienten (mit und ohne Mikrodeletion) wurde in den Thrombozyten eine unauffällige TPO-induzierte Signaltransduktion detektiert. Somit hat die Mikrodeletion allein keinen negativen Einfluss auf die Thrombozytenbiogenese.

In der vorliegenden Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass c-Mpl (der Rezeptor für TPO) in Thrombozyten von TAR-Patienten mit Muster #1 etwas reduziert war, was ebenfalls zur verminderten Reaktivität der TPO-induzierten Signaltransduktion beitragen kann. Da aber Patienten mit Muster #2 und Kontrollpersonen vergleichbare Mengen des Proteins in Thrombozyten aufweisen, ist eine reduzierte Menge an c-Mpl als Ursache für die Thrombozytopenie beim TAR-Syndrom unwahrscheinlich. Der Wechsel zwischen Muster #1 und #2 erfolgt viele Jahre später als der Anstieg der Thrombozytenzahlen, was eine Entkopplung

zwischen TPO-Reaktivität und Thrombozytenbiogenese beim TAR-Syndrom nahelegt.

Mittels *Next generation sequencing* wurden in der DNA von TAR-Patienten zwei seltene Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) in regulatorischen Gensequenzen von *RNA binding motif protein 8A* (RBM8A), einem Gen innerhalb der Mikrodeletion, identifiziert. Liegt einer dieser SNPs zusammen mit dem funktionalen Verlust von RBM8A auf dem anderen Allel vor, so verursachen diese mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit das TAR-Syndrom. Patienten erhalten einen der beiden SNPs in RBM8A von einem Elternteil und zu 75% vom anderen Elternteil die Mikrodeletion. Zu 25% entsteht sie *de novo*. Durch den SNP im 5'-UTR-Bereich ergibt sich eine zusätzliche Bindungsstelle für den gewebespezifisch-exprimierten transkriptionellen Repressor *Ecotropic viral insertion 1*. In TAR-Patienten ist die Proteinmenge von RBM8A reduziert. Inwieweit dies zur Thrombozytenbiogenese (und Radiusaplasie) beiträgt, sollte in Zukunft geklärt werden.

Stichworte: Thrombopoietin / Thrombozyten / Signaltransduktion / *RNA binding motif protein 8A*

6 Abstract

Platelets are cellular blood components and essential for primary hemostasis. Thrombocytopenia-absent radii (TAR)-syndrome is a rare congenital disorder with a lack of platelets (thrombocytopenia) and bilateral radius aplasia. While most TAR-patients show ameliorated platelet counts within the first two years of life, about one quart suffers from very low platelet even into adulthood. All patients harbor a microdeletion on chromosome 1q21. In 75% of patients the microdeletion is inherited by one healthy parent implying that it is essential but not sufficient for causing TAR-syndrome. So far, the molecular causes underlying the disease are ill-defined. In this work the thrombopoietin (TPO)-induced signaling in platelets was characterized for a better understanding of regulation of thrombopoiesis in TAR-patients.

12 TAR-patients under 18 years with very low platelet counts showed a defective TPO-dependent Jak/STAT-, PI3K/Akt- und Raf/Erk signaling in platelets (pattern #1). The cause therefor is nonphosphorylatable Januskinase 2. It could be shown *ex vivo* that Januskinase 2 is the keyregulator for TPO-induced signaling. In contrast, inconspicuous TPO-dependent Jak/STAT-, PI3K/Akt- und Raf/Erk signaling was detected in 11 TAR-patients over 18 years (pattern #2). Despite normal signaling, these TAR-patients still have low platelet counts. Parents of the patients (with and without microdeletion) showed normal TPO-dependent signaling and platelet counts. Thus the microdeletion itself does not negatively contribute to the platelet production. Patients with pattern #1 show a slightly reduced protein level of the TPO receptor c-Mpl in platelets, which could contribute to the platelet production defect. However, patients with pattern #2 and controls have comparable c-Mpl-levels but differ in platelet production. Thus, a reduced c-Mpl protein level as cause for the TAR-syndrom is unlikely. The switch from pattern #1 to #2 was observed many years later than the increase in platelet counts, implying that TPO-reactivity and platelet production might be uncoupled in TAR syndrome.

Via Next generation sequencing two rare single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the regulatory gene sequence of RNA binding motif protein 8A (RBM8A), a gene within the microdeletion, were discovered in all TAR-patients analyzed. One of these SNPs together with the functional loss of RBM8A on the other allele cause TAR-syndrome. We could show that the SNP is inherited from one parent while the microdeletion is inherited to 75% from the other parent and occurs *de novo* in 25% of

patients. In this work I could show that one of the SNPs generates a new binding site for the tissue specific-expressed transcriptional repressor Ecotropic viral insertion 1. Patients have reduced expression of RBM8A protein level in platelets. How far these findings contribute to the thrombocytopenia (and radius aplasia) in TAR-syndrome should be analyzed in the future.

Key words: Thrombopoietin / Platelet / Signal transduction / RNA binding motif protein 8A

7 Anhang – Charakteristika der TAR-Patienten und Übersicht der Phosphorylierungs- und SNP-Studien

Tabelle 8: Charakteristika der TAR-Patienten und Übersicht der Phosphorylierungs- und SNP-Studien. ID gibt die Identitätsnummer der Patienten an. Vorab beschriebene Patienten sind mit [§] [83] bzw. [†] [73] gekennzeichnet. Das Geschlecht der Patienten wird durch f = weiblich bzw. m = männlich angegeben. Die Mikrodeletion entsteht entweder *de novo*, wird vom Vater (paternal) oder von der Mutter (maternal) vererbt. ND symbolisiert keine Analyse der Vererbung. pJak2 gibt das identifizierte Muster #1 bzw. #2 der untersuchten TAR-Patienten in Abb. 13 an. n# steht für die Anzahl der einbezogenen Thrombozytenwerte der Patienten in Abb. 10. Weiterhin werden das Alter (in Jahren) und die Thrombozytenzahl bei der Blutabnahme der TAR-Patienten angegeben. In der DNA von TAR-Patienten wird entweder ein 5'-UTR-SNP oder ein SNP im ersten Intron von RBM8A nachgewiesen. Die SNP-Daten wurden in Zusammenarbeit mit Kees Albers vom Sanger-Institut in Cambridge erhoben. Nicht bestimmte Werte werden durch „---“ gekennzeichnet.

ID	Geschlecht	Vererbung	pJak2	n#	Alter (Jahre)	Thrombozyten (/nL)	SNP
01 [§]	f	maternal	#2	3	29	114	Intron
02 [§]	f	maternal	#2	1	20	146	---
03 ^{†,§}	f	maternal	#1	5	18	34	5'-UTR
			#2		21	59	---
04 [§]	f	maternal	---	1	0	20	5'-UTR
08 [§]	m	ND	---	12	1	19	---
10 ^{†,§}	f	paternal	---	17	4	64	5'-UTR
11 ^{†,§}	f	<i>de novo</i>	#2	7	4	41	5'-UTR
12 [§]	m	<i>de novo</i>	---	10	0,4	70	5'-UTR
14 ^{†,§}	m	<i>de novo</i>	---	3	0,2	25	---
15 [§]	m	ND	#2	1	26	163	Intron
17	w	maternal	---	---	16	---	5'-UTR
20	w	maternal	---	---	35	---	Intron
21 [§]	f	ND	---	1	0	11	---
25 [§]	m	maternal	#1	7	26	118	Intron
26 [§]	m	maternal	#2	6	22	155	Intron
27 [§]	f	maternal	#2	9	33	108	Intron
31	m	<i>de novo</i>	---	1	1	87	Intron
32	f	paternal	#1	4	0,4	140	5'-UTR
34	f	paternal	#1	6	18	64	5'-UTR
35	m	non-maternal	#2	11	39	114	5'-UTR
36	m	maternal	#1	9	2	79	5'-UTR
37	f	ND	#2	2	36	136	5'-UTR
38	f	<i>de novo</i>	#1	1	0,2	167	Intron
39	f	paternal	#1	1	4	34	5'-UTR
40	m	<i>de novo</i>	#1	1	8	88	5'-UTR
41	m	maternal	#1	8	1,5	26	5'-UTR
42	m	ND	#1	14	6	100	5'-UTR
43	f	<i>de novo</i>	#1	9	4	29	5'-UTR
44	f	maternal	#1	20	18	42	5'-UTR
46	f	ND	#2	3	20	139	---
47	f	ND	#2	3	18	100	---
51	f	maternal	#1	1	0,8	136	---

8 Literaturverzeichnis

1. Orkin, S.H. and L.I. Zon, Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*, 2008. 132(4): p. 631-44.
2. Akashi, K., *et al.*, A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*, 2000. 404(6774): p. 193-7.
3. Sharpless, N.E. and R.A. DePinho, How stem cells age and why this makes us grow old. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. 8(9): p. 703-13.
4. Cheshier, S.H., *et al.*, In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(6): p. 3120-5.
5. Kaushansky, K., Thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. *Blood*, 1995. 86(2): p. 419-31.
6. <http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de>, Reifestadien der MKs, 2010.
7. Debili, N., *et al.*, The Mpl receptor is expressed in the megakaryocytic lineage from late progenitors to platelets. *Blood*, 1995. 85(2): p. 391-401.
8. 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): p. 2722-7.
9. Jones, O.P., Origin of megakaryocyte granules from Golgi vesicles. *Anat Rec*, 1960. 138: p. 105-13.
10. Youssefian, T. and E.M. Cramer, Megakaryocyte dense granule components are sorted in multivesicular bodies. *Blood*, 2000. 95(12): p. 4004-7.
11. Italiano, J.E., Jr., *et al.*, Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J Cell Biol*, 1999. 147(6): p. 1299-312.
12. Semple, J.W. and J. Freedman, Platelets and innate immunity. *Cell Mol Life Sci*, 2010. 67(4): p. 499-511.
13. de Sauvage, F.J., *et al.*, Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature*, 1994. 369(6481): p. 533-8.
14. Bartley, T.D., *et al.*, Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. *Cell*, 1994. 77(7): p. 1117-24.
15. Lok, S., *et al.*, Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production in vivo. *Nature*, 1994. 369(6481): p. 565-8.
16. Kuter, D.J., D.L. Beeler, and R.D. Rosenberg, The purification of megapoeitin: a physiological regulator of megakaryocyte growth and platelet production. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(23): p. 11104-8.
17. Kato, T., *et al.*, Purification and characterization of thrombopoietin. *J Biochem*, 1995. 118(1): p. 229-36.

18. Foster, D.C., *et al.*, Human thrombopoietin: gene structure, cDNA sequence, expression, and chromosomal localization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(26): p. 13023-7.
19. Kuter, D.J. and R.D. Rosenberg, 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): p. 2720-30.
20. Vigon, I., *et al.*, Molecular cloning and characterization of MPL, the human homolog of the v-mpl oncogene: identification of a member of the hematopoietic growth factor receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. 89(12): p. 5640-4.
21. Methia, N., *et al.*, Oligodeoxynucleotides antisense to the proto-oncogene c-mpl specifically inhibit in vitro megakaryocytopoiesis. *Blood*, 1993. 82(5): p. 1395-401.
22. Mignotte, V., *et al.*, Structure and transcription of the human c-mpl gene (MPL). *Genomics*, 1994. 20(1): p. 5-12.
23. Vigon, I., *et al.*, Characterization of the murine Mpl proto-oncogene, a member of the hematopoietic cytokine receptor family: molecular cloning, chromosomal location and evidence for a function in cell growth. *Oncogene*, 1993. 8(10): p. 2607-15.
24. Skoda, R.C., *et al.*, Murine c-mpl: a member of the hematopoietic growth factor receptor superfamily that transduces a proliferative signal. *EMBO J*, 1993. 12(7): p. 2645-53.
25. Li, J., D.F. Sabath, and D.J. Kuter, Cloning and functional characterization of a novel c-mpl variant expressed in human CD34 cells and platelets. *Cytokine*, 2000. 12(7): p. 835-44.
26. Bazan, J.F., Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. 87(18): p. 6934-8.
27. Chen, W.M., *et al.*, Identification of the residues in the extracellular domain of thrombopoietin receptor involved in the binding of thrombopoietin and a nuclear distribution protein (human NUDC). *J Biol Chem*, 2010. 285(34): p. 26697-709.
28. Hitchcock, I.S., *et al.*, YRRL motifs in the cytoplasmic domain of the thrombopoietin receptor regulate receptor internalization and degradation. *Blood*, 2008. 112(6): p. 2222-31.
29. Dorsch, M., *et al.*, The thrombopoietin receptor can mediate proliferation without activation of the Jak-STAT pathway. *J Exp Med*, 1997. 186(12): p. 1947-55.
30. Alexander, W.S., D. Metcalf, and A.R. Dunn, Point mutations within a dimer interface homology domain of c-Mpl induce constitutive receptor activity and tumorigenicity. *EMBO J*, 1995. 14(22): p. 5569-78.
31. Feng, J., *et al.*, Activation of Jak2 catalytic activity requires phosphorylation of Y1007 in the kinase activation loop. *Mol Cell Biol*, 1997. 17(5): p. 2497-501.
32. Drachman, J.G., K.M. Millett, and K. Kaushansky, Thrombopoietin signal transduction requires functional JAK2, not TYK2. *J Biol Chem*, 1999. 274(19): p. 13480-4.

33. Giordanetto, F. and R.T. Kroemer, Prediction of the structure of human Janus kinase 2 (JAK2) comprising JAK homology domains 1 through 7. *Protein Eng*, 2002. 15(9): p. 727-37.
34. Saharinen, P. and O. Silvennoinen, The pseudokinase domain is required for suppression of basal activity of Jak2 and Jak3 tyrosine kinases and for cytokine-inducible activation of signal transduction. *J Biol Chem*, 2002. 277(49): p. 47954-63.
35. Ungureanu, D., *et al.*, The pseudokinase domain of JAK2 is a dual-specificity protein kinase that negatively regulates cytokine signaling. *Nat Struct Mol Biol*, 2011. 18(9): p. 971-6.
36. Drachman, J.G., J.D. Griffin, and K. Kaushansky, The c-Mpl ligand (thrombopoietin) stimulates tyrosine phosphorylation of Jak2, Shc, and c-Mpl. *J Biol Chem*, 1995. 270(10): p. 4979-82.
37. Matsumura, I., *et al.*, Involvement of prolonged ras activation in thrombopoietin-induced megakaryocytic differentiation of a human factor-dependent hematopoietic cell line. *Mol Cell Biol*, 1998. 18(7): p. 4282-90.
38. Guerriero, R., *et al.*, 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): p. 744-52.
39. Ezumi, Y., H. Takayama, and M. Okuma, Thrombopoietin, c-Mpl ligand, induces tyrosine phosphorylation of Tyk2, JAK2, and STAT3, and enhances agonists-induced aggregation in platelets in vitro. *FEBS Lett*, 1995. 374(1): p. 48-52.
40. Schulze, H., *et al.*, 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): p. 294-304.
41. Kirito, K., N. Fox, and K. Kaushansky, Thrombopoietin stimulates Hoxb4 expression: an explanation for the favorable effects of TPO on hematopoietic stem cells. *Blood*, 2003. 102(9): p. 3172-8.
42. Hong, Y., *et al.*, Protein kinase C mediates the mitogenic action of thrombopoietin in c-Mpl-expressing UT-7 cells. *Blood*, 1998. 91(3): p. 813-22.
43. Banfic, H., *et al.*, A novel integrin-activated pathway forms PKB/Akt-stimulatory phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate via phosphatidylinositol 3-phosphate in platelets. *J Biol Chem*, 1998. 273(1): p. 13-6.
44. Yasukawa, H., *et al.*, The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *EMBO J*, 1999. 18(5): p. 1309-20.
45. Pluskey, S., *et al.*, Potent stimulation of SH-PTP2 phosphatase activity by simultaneous occupancy of both SH2 domains. *J Biol Chem*, 1995. 270(7): p. 2897-900.
46. Myers, M.P., *et al.*, TYK2 and JAK2 are substrates of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J Biol Chem*, 2001. 276(51): p. 47771-4.
47. Irie-Sasaki, J., *et al.*, CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling. *Nature*, 2001. 409(6818): p. 349-54.

48. Bousquet, C., C. Susini, and S. Melmed, Inhibitory roles for SHP-1 and SOCS-3 following pituitary proopiomelanocortin induction by leukemia inhibitory factor. *J Clin Invest*, 1999. 104(9): p. 1277-85.
49. Lannutti, B.J., *et al.*, Increased megakaryocytopoiesis in Lyn-deficient mice. *Oncogene*, 2006. 25(23): p. 3316-24.
50. Tong, W. and H.F. Lodish, Lnk inhibits Tpo-mpl signaling and Tpo-mediated megakaryocytopoiesis. *J Exp Med*, 2004. 200(5): p. 569-80.
51. Hitchcock, I.S., *et al.*, Roles of focal adhesion kinase (FAK) in megakaryopoiesis and platelet function: studies using a megakaryocyte lineage specific FAK knockout. *Blood*, 2008. 111(2): p. 596-604.
52. Chung, C.D., *et al.*, Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science*, 1997. 278(5344): p. 1803-5.
53. de Sauvage, F.J., *et al.*, Physiological regulation of early and late stages of megakaryocytopoiesis by thrombopoietin. *J Exp Med*, 1996. 183(2): p. 651-6.
54. Gurney, A.L., *et al.*, Thrombocytopenia in c-mpl-deficient mice. *Science*, 1994. 265(5177): p. 1445-7.
55. Alexander, W.S., *et al.*, Deficiencies in progenitor cells of multiple hematopoietic lineages and defective megakaryocytopoiesis in mice lacking the thrombopoietic receptor c-Mpl. *Blood*, 1996. 87(6): p. 2162-70.
56. Winter, O., *et al.*, Megakaryocytes constitute a functional component of a plasma cell niche in the bone marrow. *Blood*, 2010. 116(11): p. 1867-75.
57. Bunting, S., *et al.*, Normal platelets and megakaryocytes are produced in vivo in the absence of thrombopoietin. *Blood*, 1997. 90(9): p. 3423-9.
58. Chen, Q., *et al.*, IL-3 does not contribute to platelet production in c-Mpl-deficient mice. *Stem Cells*, 1998. 16 Suppl 2: p. 31-6.
59. Gainsford, T., *et al.*, The residual megakaryocyte and platelet production in c-mpl-deficient mice is not dependent on the actions of interleukin-6, interleukin-11, or leukemia inhibitory factor. *Blood*, 2000. 95(2): p. 528-34.
60. Levin, J., *et al.*, Thrombocytopenic c-mpl(-/-) mice can produce a normal level of platelets after administration of 5-fluorouracil: the effect of age on the response. *Blood*, 2001. 98(4): p. 1019-27.
61. Avecilla, S.T., *et al.*, Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat Med*, 2004. 10(1): p. 64-71.
62. Hamada, T., *et al.*, Transendothelial migration of megakaryocytes in response to stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) enhances platelet formation. *J Exp Med*, 1998. 188(3): p. 539-48.
63. Pan, R.M., *et al.*, A microtubule associated protein (hNUDC) binds to the extracellular domain of thrombopoietin receptor (Mpl). *J Cell Biochem*, 2005. 96(4): p. 741-50.
64. Jung, A.S., *et al.*, Tensin2 is a novel mediator in thrombopoietin (TPO)-induced cellular proliferation by promoting Akt signaling. *Cell Cycle*, 2011. 10(11): p. 1838-44.

65. Zhang, Y.P., *et al.*, Regulation of cell differentiation by hNUDC via a Mpl-dependent mechanism in NIH 3T3 cells. *Exp Cell Res*, 2007. 313(15): p. 3210-21.
66. Tang, Y.S., Y.P. Zhang, and P. Xu, hNUDC promotes the cell proliferation and differentiation in a leukemic cell line via activation of the thrombopoietin receptor (Mpl). *Leukemia*, 2008. 22(5): p. 1018-25.
67. Wei, M.X., *et al.*, Functional characterization of hNUDC as a novel accumulator that specifically acts on in vitro megakaryocytopoiesis and in vivo platelet production. *J Cell Biochem*, 2006. 98(2): p. 429-39.
68. Alter, B.P., Bone marrow failure syndromes in children. *Pediatr Clin North Am*, 2002. 49(5): p. 973-88.
69. Herklotz, R., *et al.*, Referenzbereiche in der Hämatologie. *Therapeutische Umschau*, 2006. 63(1).
70. Gadner, H.G., G.; Niemeyer, C.; Ritter, J., *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*, ed. S. Verlag 2006.
71. Ihara, K., *et al.*, Identification of mutations in the c-mpl gene in congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(6): p. 3132-6.
72. Ballmaier, M., *et al.*, c-mpl mutations are the cause of congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Blood*, 2001. 97(1): p. 139-46.
73. Ballmaier, M., *et al.*, Thrombopoietin in patients with congenital thrombocytopenia and absent radii: elevated serum levels, normal receptor expression, but defective reactivity to thrombopoietin. *Blood*, 1997. 90(2): p. 612-9.
74. Ballmaier, M., *et al.*, Defective c-Mpl signaling in the syndrome of thrombocytopenia with absent radii. *Stem Cells*, 1998. 16 Suppl 2: p. 177-84.
75. Greenwald HM, S., I., Congenital essential thrombocytopenia. *Am J Dis Child.*, 1929. 38: p. 1245-51.
76. Hall, J.G., *et al.*, Thrombocytopenia with absent radius (TAR). *Medicine (Baltimore)*, 1969. 48(6): p. 411-39.
77. Greenhalgh, K.L., *et al.*, Thrombocytopenia-absent radius syndrome: a clinical genetic study. *J Med Genet*, 2002. 39(12): p. 876-81.
78. Hedberg, V.A. and J.M. Lipton, Thrombocytopenia with absent radii. A review of 100 cases. *Am J Pediatr Hematol Oncol*, 1988. 10(1): p. 51-64.
79. de Alarcon, P.A., *et al.*, Thrombocytopenia and absent radii syndrome: defective megakaryocytopoiesis-thrombocytopoiesis. *Am J Pediatr Hematol Oncol*, 1991. 13(1): p. 77-83.
80. Letestu, R., *et al.*, Existence of a differentiation blockage at the stage of a megakaryocyte precursor in the thrombocytopenia and absent radii (TAR) syndrome. *Blood*, 2000. 95(5): p. 1633-41.
81. Strippoli, P., *et al.*, Mutational screening of thrombopoietin receptor gene (c-mpl) in patients with congenital thrombocytopenia and absent radii (TAR). *Br J Haematol*, 1998. 103(2): p. 311-4.

82. Cremer, M., *et al.*, Serum levels of thrombopoietin, IL-11, and IL-6 in pediatric thrombocytopenias. *Ann Hematol*, 1999. 78(9): p. 401-7.
83. Klopocki, E., *et al.*, Complex inheritance pattern resembling autosomal recessive inheritance involving a microdeletion in thrombocytopenia-absent radius syndrome. *Am J Hum Genet*, 2007. 80(2): p. 232-40.
84. Davis, A.P., *et al.*, Absence of radius and ulna in mice lacking *hoxa-11* and *hoxd-11*. *Nature*, 1995. 375(6534): p. 791-5.
85. Fleischman, R.A., *et al.*, Absence of mutations in the *HoxA10*, *HoxA11* and *HoxD11* nucleotide coding sequences in thrombocytopenia with absent radius syndrome. *Br J Haematol*, 2002. 116(2): p. 367-75.
86. Ohbayashi, N., *et al.*, An RNA binding protein, Y14 interacts with and modulates STAT3 activation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. 372(3): p. 475-9.
87. Miyakawa, Y., *et al.*, Recombinant thrombopoietin induces rapid protein tyrosine phosphorylation of Janus kinase 2 and Shc in human blood platelets. *Blood*, 1995. 86(1): p. 23-7.
88. Pfaffl, M.W., A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 2001. 29(9): p. e45.
89. Pastos, K.M., *et al.*, Differential effects of recombinant thrombopoietin and bone marrow stromal-conditioned media on neonatal versus adult megakaryocytes. *Blood*, 2006. 108(10): p. 3360-2.
90. Ferrer-Marin, F., *et al.*, Effects of in vitro adult platelet transfusions on neonatal hemostasis. *J Thromb Haemost*, 2011. 9(5): p. 1020-8.
91. Wannack, M., Pathophysiologie der Blutbildung bei Patienten mit Thrombocytopenia absent radii (TAR)-Syndrom, Dissertation 2011
92. Briggs, C., *et al.*, Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. *Br J Haematol*, 2004. 126(1): p. 93-9.
93. Hodohara, K., *et al.*, Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) acts together with thrombopoietin to enhance the development of megakaryocytic progenitor cells (CFU-MK). *Blood*, 2000. 95(3): p. 769-75.
94. Faurholm, B., R.P. Millar, and A.A. Katz, The genes encoding the type II gonadotropin-releasing hormone receptor and the ribonucleoprotein RBM8A in humans overlap in two genomic loci. *Genomics*, 2001. 78(1-2): p. 15-8.
95. <http://www.cambridgebioresource.org.uk>, Cambridge BioResource.
96. Cartharius, K., *et al.*, MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics*, 2005. 21(13): p. 2933-42.
97. Geddis, A.E., Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia and thrombocytopenia with absent radii. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2009. 23(2): p. 321-31.
98. Nathan and Oski's, Hematology of Infancy and Childhood Vol. 7. 2009.
99. Alter, B.P., Diagnosis, genetics, and management of inherited bone marrow failure syndromes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2007: p. 29-39.

100. Dempfle, C.E., *et al.*, Increase in platelet count in response to rHuEpo in a patient with thrombocytopenia and absent radii syndrome. *Blood*, 2001. 97(7): p. 2189-90.
101. Aquino, V.M., *et al.*, Recombinant interleukin-6 in the treatment of congenital thrombocytopenia associated with absent radii. *J Pediatr Hematol Oncol*, 1998. 20(5): p. 474-6.
102. Wickenden, J.A. and C.J. Watson, Key signalling nodes in mammary gland development and cancer. Signalling downstream of PI3 kinase in mammary epithelium: a play in 3 Akts. *Breast Cancer Res*, 2010. 12(2): p. 202.
103. Broudy, V.C., *et al.*, Human platelets display high-affinity receptors for thrombopoietin. *Blood*, 1997. 89(6): p. 1896-904.
104. Cox, D., S.W. Kerrigan, and S.P. Watson, Platelets and the innate immune system: mechanisms of bacterial-induced platelet activation. *J Thromb Haemost*, 2011. 9(6): p. 1097-107.
105. Abbott, C., *et al.*, Mouse monoclonal antibodies against human c-Mpl and characterization for flow cytometry applications. *Hybridoma (Larchmt)*, 2010. 29(2): p. 103-13.
106. Hyde, P. and D. Zucker-Franklin, Antigenic differences between human platelets and megakaryocytes. *Am J Pathol*, 1987. 127(2): p. 349-57.
107. Ballmaier, M. and M. Germeshausen, Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia: clinical presentation, diagnosis, and treatment. *Semin Thromb Hemost*, 2011. 37(6): p. 673-81.
108. Fiedler, J., *et al.*, Two patterns of thrombopoietin signaling suggest no coupling between platelet production and thrombopoietin reactivity in thrombocytopenia-absent radii syndrome. *Haematologica*, 2011.
109. Day, H.J. and H. Holmsen, Platelet adenine nucleotide "storage pool deficiency" in thrombocytopenic absent radii syndrome. *JAMA*, 1972. 221(9): p. 1053-4.
110. Sultan, Y., *et al.*, Abnormal platelet function, population, and survival-time in a boy with congenital absent radii and thrombocytopenia. *Lancet*, 1972. 2(7778): p. 653.
111. Mural, R.J., *et al.*, A comparison of whole-genome shotgun-derived mouse chromosome 16 and the human genome. *Science*, 2002. 296(5573): p. 1661-71.
112. Sanford, L.P., *et al.*, TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development*, 1997. 124(13): p. 2659-70.
113. Bonsi, L., *et al.*, Thrombocytopenia with absent radii (TAR) syndrome: from hemopoietic progenitor to mesenchymal stromal cell disease? *Exp Hematol*, 2009. 37(1): p. 1-7.
114. Thompson, A.A. and L.T. Nguyen, Amegakaryocytic thrombocytopenia and radio-ulnar synostosis are associated with HOXA11 mutation. *Nat Genet*, 2000. 26(4): p. 397-8.

115. Kyba, M., R.C. Perlingeiro, and G.Q. Daley, HoxB4 confers definitive lymphoid-myeloid engraftment potential on embryonic stem cell and yolk sac hematopoietic progenitors. *Cell*, 2002. 109(1): p. 29-37.
116. Antonchuk, J., G. Sauvageau, and R.K. Humphries, HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells *ex vivo*. *Cell*, 2002. 109(1): p. 39-45.
117. Parganas, E., *et al.*, Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell*, 1998. 93(3): p. 385-95.
118. Akira, S., Functional roles of STAT family proteins: lessons from knockout mice. *Stem Cells*, 1999. 17(3): p. 138-46.
119. Takeda, K., *et al.*, Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(8): p. 3801-4.
120. Huang, Z., *et al.*, STAT1 promotes megakaryopoiesis downstream of GATA-1 in mice. *J Clin Invest*, 2007. 117(12): p. 3890-9.
121. Halupa, A., *et al.*, A novel role for STAT1 in regulating murine erythropoiesis: deletion of STAT1 results in overall reduction of erythroid progenitors and alters their distribution. *Blood*, 2005. 105(2): p. 552-61.
122. Akira, S., Roles of STAT3 defined by tissue-specific gene targeting. *Oncogene*, 2000. 19(21): p. 2607-11.
123. Takeda, K., *et al.*, Stat3 activation is responsible for IL-6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis: generation and characterization of T cell-specific Stat3-deficient mice. *J Immunol*, 1998. 161(9): p. 4652-60.
124. Akaishi, H., *et al.*, Defective IL-2-mediated IL-2 receptor alpha chain expression in Stat3-deficient T lymphocytes. *Int Immunol*, 1998. 10(11): p. 1747-51.
125. Kirito, K., *et al.*, A functional role of Stat3 in *in vivo* megakaryopoiesis. *Blood*, 2002. 99(9): p. 3220-7.
126. Huang, F.W., *et al.*, A mouse model of juvenile hemochromatosis. *J Clin Invest*, 2005. 115(8): p. 2187-91.
127. De Domenico, I., *et al.*, The molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin down-regulation. *Mol Biol Cell*, 2007. 18(7): p. 2569-78.
128. Papanikolaou, G., *et al.*, Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet*, 2004. 36(1): p. 77-82.
129. Bodnar, J.S., *et al.*, Positional cloning of the combined hyperlipidemia gene *Hyp1*. *Nat Genet*, 2002. 30(1): p. 110-6.
130. Saxena, G., J. Chen, and A. Shalev, Intracellular shuttling and mitochondrial function of thioredoxin-interacting protein. *J Biol Chem*, 2010. 285(6): p. 3997-4005.
131. Jeong, M., *et al.*, Thioredoxin-interacting protein regulates hematopoietic stem cell quiescence and mobilization under stress conditions. *J Immunol*, 2009. 183(4): p. 2495-505.

132. Donnelly, K.L., *et al.*, Increased lipogenesis and fatty acid reesterification contribute to hepatic triacylglycerol stores in hyperlipidemic Txnip^{-/-} mice. *J Nutr*, 2004. 134(6): p. 1475-80.
133. Haurie, V., *et al.*, Two isoforms of human RNA polymerase III with specific functions in cell growth and transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(9): p. 4176-81.
134. Swindell, E.C., *et al.*, Cloning and expression analysis of chicken Lix1, a founding member of a novel gene family. *Mech Dev*, 2001. 109(2): p. 405-8.
135. Kim, V.N., *et al.*, The Y14 protein communicates to the cytoplasm the position of exon-exon junctions. *EMBO J*, 2001. 20(8): p. 2062-8.
136. Bono, F. and N.H. Gehring, Assembly, disassembly and recycling: the dynamics of exon junction complexes. *RNA Biol*, 2011. 8(1): p. 24-9.
137. Muromoto, R., *et al.*, The exon-junction complex proteins, Y14 and MAGOH regulate STAT3 activation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. 382(1): p. 63-8.
138. Li, X., *et al.*, PEX11 beta deficiency is lethal and impairs neuronal migration but does not abrogate peroxisome function. *Mol Cell Biol*, 2002. 22(12): p. 4358-65.
139. Koch, J., *et al.*, PEX11 family members are membrane elongation factors that coordinate peroxisome proliferation and maintenance. *J Cell Sci*, 2010. 123(Pt 19): p. 3389-400.
140. Bengtsson, T., *et al.*, Loss of alpha10beta1 integrin expression leads to moderate dysfunction of growth plate chondrocytes. *J Cell Sci*, 2005. 118(Pt 5): p. 929-36.
141. Camper, L., U. Hellman, and E. Lundgren-Akerlund, Isolation, cloning, and sequence analysis of the integrin subunit alpha10, a beta1-associated collagen binding integrin expressed on chondrocytes. *J Biol Chem*, 1998. 273(32): p. 20383-9.
142. Schmidt, D. and S. Muller, PIAS/SUMO: new partners in transcriptional regulation. *Cell Mol Life Sci*, 2003. 60(12): p. 2561-74.
143. Shuai, K. and B. Liu, Regulation of gene-activation pathways by PIAS proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol*, 2005. 5(8): p. 593-605.
144. Kim, K., *et al.*, Protein inhibitor of activated STAT 3 modulates osteoclastogenesis by down-regulation of NFATc1 and osteoclast-associated receptor. *J Immunol*, 2007. 178(9): p. 5588-94.
145. Iwasaki, K., K. Hailemariam, and Y. Tsuji, PIAS3 interacts with ATF1 and regulates the human ferritin H gene through an antioxidant-responsive element. *J Biol Chem*, 2007. 282(31): p. 22335-43.
146. Dabir, S., A. Kluge, and A. Dowlati, The association and nuclear translocation of the PIAS3-STAT3 complex is ligand and time dependent. *Mol Cancer Res*, 2009. 7(11): p. 1854-60.
147. Dabir, S., *et al.*, Identification of STAT3-independent regulatory effects for protein inhibitor of activated STAT3 by binding to novel transcription factors. *Cancer Biol Ther*, 2011. 12(2): p. 139-51.

148. Rowley, J.W., *et al.*, Genome-wide RNA-seq analysis of human and mouse platelet transcriptomes. *Blood*, 2011. 118(14): p. e101-11.
149. Jin, H.O., *et al.*, TXNIP potentiates Redd1-induced mTOR suppression through stabilization of Redd1. *Oncogene*, 2011. 30(35): p. 3792-801.
150. Albers C*, *et al.*, Regulatory low-frequency modifier SNPs in the exon-junction complex subunit RBM8A cause TAR syndrome. *Nature Genetics*, 2012. Manuscript accepted for publication.
151. Lee, H.C., *et al.*, Exon junction complex enhances translation of spliced mRNAs at multiple steps. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. 384(3): p. 334-40.
152. Wong, C.C., *et al.*, Defective ribosome assembly in Shwachman-Diamond syndrome. *Blood*, 2011. 118(16): p. 4305-12.
153. Horos, R., *et al.*, Ribosomal deficiencies in Diamond-Blackfan anemia impair translation of transcripts essential for differentiation of murine and human erythroblasts. *Blood*, 2011.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen, als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen. Einige Daten wurden aus Prioritätsgründen bereits veröffentlicht [108, 150]. Teilabbildungen der Abbildung 16 sind aus der Dissertation von Martin Wannack [91] entnommen und entsprechend gekennzeichnet.

Ort, Datum

Unterschrift

Lebenslauf

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

Publikationen

- Albers C*, Paul D*, Schulze H*, Freson K, Stephens J, Cvejic A, Kostadima M, Bertone P, Breuning M, Debili N, Deloukas P, Favier R, **Fiedler J**, Hobbs C, Huang N, Hurles M, Jolley J, Krapels I, Nurden P, Ruivenkamp C, Sambrook J, Smethurst P, Strauß G, van Geet C, Newbury-Ecob R**, Ouwehand W**, Ghevaert C**. Regulatory low-frequency modifier SNPs in the exon-junction complex subunit RBM8A cause TAR syndrome. (*, ** joint authorship). *Nature Genetics*; Manuscript accepted for publication.

- **Fiedler J**, Strauß G, Wannack M, Schwiebert S, Seidel K, Henning K, Klopocki E, Schmutz M, Gaedicke G, Schulze H. Two patterns of thrombopoietin signaling suggest no coupling between platelet production and thrombopoietin reactivity in thrombocytopenia-absent radii syndrome, *Haematologica*. 2011, Epub doi:10.3324/haematol.2011.049619

- Kunert S, Meyer I, Fleischhauer S, Wannack M, **Fiedler J**, Shivdasani RA, Schulze H. The microtubule modulator RanBP10 plays a critical role in regulation of platelet discoid shape and degranulation. *Blood*. 2009 Dec 24;114(27):5532-40. Epub 2009 Oct 2.

Vortrag:

55. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung e.V. (GTH), Wiesbaden 2011

Fiedler J, Strauß G, Fleischhauer S, Wannack M, Seidel K, Henning K, Schulze H. Two thrombopoietin (TPO)-signaling patterns in patients with thrombocytopenia absent radii syndrome (TAR) suggest a TPO-dependent, but Jak2-independent mechanism for platelet biogenesis. *Hämostaseologie* 2011; 31: A7.

Poster:

52nd Annual Meeting, American Society of Hematology 2010 Orlando (Travel Award)

Fiedler J, Strauss G, Wannack M, Fleischhauer S, Seidel K, Klopocki E, Mundlos S, Schmutz M, Schulze H. The Abrogated Thrombopoietin (TPO) Signal Transduction In Pediatric Patients Suffering From Thrombocytopenia-Absent Radii Syndrome Is Restored In Adult Patients, Suggesting An Additional, c-Mpl-Jak2-Independent Mechanism for Platelet Biogenesis. *Blood* 2010; 116 (21):662

54. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung e.V. (GTH), Nürnberg 2010

Fiedler J, Wannack M, Strauss G, Schulze H. Impaired thrombopoietin signal transduction in thrombocytopenia absent radii (TAR)-syndrome ameliorates in older patients. *Hämostaseologie* 2010; 30: A71.