

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

DISSERTATION

Klinische und funktionelle Untersuchungen zur Hämatopoese  
beim *Thrombocytopenia Absent Radii* (TAR-) Syndrom

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Hendrik Bösing  
aus Haltern am See

Datum der Promotion: 16. Juni 2018

# Inhaltsverzeichnis

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	<u>II</u>
---------------------------	-----------

<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	<u>VII</u>
------------------------------	------------

<u>1 Abstract</u>	<u>1</u>
-------------------	----------

<u>2 Einleitung</u>	<u>3</u>
---------------------	----------

2.1 Hämatopoese: Entwicklung der Blutzellen	3
---	---

2.1.1 Die Megakaryopoese	4
--------------------------	---

2.1.1.1 Thrombopoietin (THPO)	5
-------------------------------	---

2.2 TAR-Syndrom	6
-----------------	---

2.2.1 Klinik des TAR	6
----------------------	---

2.2.2 Genetik	8
---------------	---

2.2.3 Hämatopoese im TAR-Syndrom	10
----------------------------------	----

2.2.4 Therapieoptionen	10
------------------------	----

2.3 <i>RBM8A</i> und Y14	11
--------------------------	----

2.3.1 Y14 – Teil des <i>Exon Junction Complexes</i>	11
---	----

2.3.2 Das Protein Y14	13
-----------------------	----

2.3.2.1 Y14 und neurologische Entwicklung	14
---	----

2.3.3 Bedeutung der Veränderung im <i>RBM8A</i> -Gen	15
--	----

2.4 Evi-1	16
-----------	----

2.5 Zielsetzung der Arbeit	17
----------------------------	----

<u>3 Material, Methoden und Patienten</u>	<u>18</u>
---	-----------

3.1 Material	18
--------------	----

3.1.1 Antikörper	18
------------------	----

3.1.2	Verwendete Oligonukleotide	18
3.2	Patienten und Erhebung der Blutwerte	19
3.3	Molekularbiologische Methoden	19
3.3.1	Isolierung von genomischer DNA	19
3.3.2	Messung der DNA-Konzentration	20
3.3.3	Polymerase Kettenreaktion	20
3.3.3.1	Sangersequenzierung	20
3.3.4	Isolation von RNA aus Zellen	21
3.3.5	Reverse Transkription der RNA in cDNA	21
3.3.6	Analyse mittels quantitativer <i>Real Time</i> -PCR	21
3.3.6.1	Reaktionsbedingungen	21
3.3.6.2	Auswertung	22
3.3.6.3	Primereffizienz	23
3.3.7	Herstellung von Proteinlysaten	23
3.3.8	Proteinkonzentrationsmessung mittels Bradford	23
3.3.9	<i>Western Blotting</i>	23
3.3.10	Proteinnachweis mittels Antikörper	25
3.4	Klonierung und Plasmide	25
3.4.1	Transformation in chemisch kompetente Zellen	25
3.4.2	Isolation von Plasmid-DNA	26
3.4.3	Glycerolstock	26
3.4.4	Verdau von DNA mittels Restriktionsenzymen und Gelextraktion	26
3.4.5	TOPO-Kloning	26
3.4.6	Plasmidkonstruktion	27
3.4.6.1	Ligation und Transformation in pMig	27
3.4.7	Verwendete Plasmide	28
3.4.7.1	Retrovirale Vektorkonstrukte für Überexpression	29
3.4.7.2	Lentivirale Vektorkonstrukte mit <i>short hairpin</i> RNA	29
3.5	Zellkultur	30

3.5.1	Verwendete Zelllinien	30
3.5.2	Differenzierung der K562-Zellen	31
3.5.3	Transfektion von adhärennten 293T-Zellen	31
3.5.3.1	Virusproduktion	31
3.5.4	Virale Transduktion von Zelllinien	32
3.5.5	Puromycin-Selektion	32
3.5.6	Herkunft der CD34+-Zellen	33
3.5.7	Protokoll zur Differenzierung von CD34+-Zellen	33
3.6	Durchflusszytometrische Untersuchungen am BD FACS Cantoll	33
3.6.1	Allgemeines	33
3.6.2	Färbung	34
3.6.3	AnnexinV-Test	34
3.6.4	Auswertung	34
3.7	May-Grünwald-Färbung	34
3.7.1	Zytospin	34
3.7.2	May-Grünwald-Färbung	35
3.7.3	Aufnahmen	35
3.8	Immunfluoreszenzfärbungen und Laserscanning- Immunfluoreszenzmikroskopie	35
3.8.1	Färbung	35
3.8.2	Aufnahme	35
3.9	Verwendete Software	36
<b>4</b>	<b><u>Ergebnisse</u></b>	<b>37</b>
4.1	Patienten	37
4.1.1	Diagnose des TAR-Syndroms	37
4.1.2	Veränderungen des Blutbildes bei TAR-Patienten	39
4.1.2.1	Thrombozyten	42

4.1.2.2	Erythrozyten	46
4.1.2.3	Leukozyten	47
4.1.3	SNP und Fehlbildungen	48
4.2	K562 Differenzierung	50
4.2.1	Überprüfung der Differenzierung	50
4.2.2	Daten zu Evi-1 und Y14 in K562	53
4.3	Y14-Depletion mittels RNA-Interferenz	56
4.3.1	Austestung der verschiedenen shRNAs	57
4.3.2	Transduktion einer hämatopoetischen Zelllinie	59
4.3.3	Apoptose und Differenzierung von transduzierten K562-Zellen	62
4.4	Etablierung der Überexpression von Y14	65
4.4.1	Transfektion / Transduktion des Y14 Plasmides	65
4.5	Etablierung eines Modells aus humanen HSZ	66
<b>5</b>	<b><u>Diskussion</u></b>	<b>70</b>
5.1	Auswirkungen des SNPs auf Blutwerte	70
5.1.1	Einfluss durch die Art der Datenerhebung	70
5.1.2	Thrombozytenzahl abhängig vom jeweiligen SNP	72
5.1.3	Patienten mit 5'UTR-SNP neigen zu Anämien	74
5.1.4	Kein SNP-abhängiger Einfluss in der Leukozyten-Ausreifung	75
5.1.5	Einfluss der SNPs	76
5.1.6	Relevanz der genetischen Befundung	77
5.2	Zellkultur-basierte Untersuchungen	77
5.2.1	Differenzierung von K562 Modell	77
5.2.2	Y14-Herunterregulation und Differenzierung	80
5.2.3	Relevanz von Modellen mit primären hämatopoetischen Zellen	82
5.3	Ausblick	83
5.3.1	Mausmodelle zum TAR-Syndrom	83

Inhaltsverzeichnis	VI
5.3.2 Induzierte pluripotente Stammzellen	85
5.3.3 Gentherapie beim TAR-Syndrom?	85
<u>6 Anhang</u>	<u>87</u>
<u>7 Literaturverzeichnis</u>	<u>92</u>
<u>8 Eidesstattliche Versicherung</u>	<u>100</u>
<u>9 Lebenslauf</u>	<u>102</u>
<u>10 Komplette Publikationsliste</u>	<u>103</u>
<u>11 Danksagung</u>	<u>104</u>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
BMFS	<i>Bone-marrow-failure</i> -Syndrome
ca.	circa
CAMT	kongenitale amegakaryozytäre Thrombozytopenie
CD	<i>cluster of differentiation</i>
c-mpl	<i>cellular myeloproliferative leukemia virus oncogene</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cDNA	kopierte DNA nach reverser Transkription
gDNA	genomische DNA
EJC	<i>Exon junction complex</i>
EMSA	<i>Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay</i>
Evi-1	<i>ecotropic virus integration site 1</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i> (Vorwärtsscatter)
Hb	Hämoglobin
HSZ	hämatopoetische Stammzellen
IL	Interleukin
IPF	<i>immature platelet fraction</i>
IPS	induzierte pluripotente Stammzellen
geoMFI	geometrische mittlere Fluoreszenzintensität
LSM	Laserscanning-Immunofluoreszenzmikroskop
MK	Megakaryozyt
MKs	Megakaryozyten

MAF	<i>minor allele frequency</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MYH 9	<i>myosin heavy chain 9</i>
NMD	<i>Nonsense mediated decay</i>
PF	<i>platelet factor</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
qRT-PCR	<i>Real Time-PCR</i>
RBM8A	<i>RNA-binding-motif 8A</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SCF	<i>stem cell factor</i>
SDHA	<i>succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SSC	<i>Side Scatter (Seitwärtsscatter)</i>
Tab.	Tabelle
TAR	<i>Thrombocytopenia Absent Radii</i>
TPA	Tetradecanoylphorbol-acetat
THPO	Thrombopoietin
UTR	<i>untranslated region</i>
WAS	Wiskott-Aldrich-Syndrom



## 1 Abstract

Das *Thrombocytopenia absent radii* (TAR-) Syndrom ist eine seltene kongenitale Erkrankung, die durch Thrombozytopenie und bilaterale Radiusaplasie charakterisiert wird. Ursächlich ist eine bi-allelische Veränderung: neben einer Mikrodeletion auf Chromosom 1q21 findet sich im 5'UTR (*untranslated region*) oder ersten Intron des Genes *RBM8A* ein *single-nucleotide-polymorphism* (SNP). Das Gen liegt innerhalb des Mikrodeletionsbereiches und codiert für das Protein Y14. Y14 ist Teil des *Exon-junction-complexes* (EJC), der beim *nonsense-mediated-decay* (NMD) eine zentrale Rolle spielt. Damit ist das Protein Teil eines Prozesses, der dafür sorgt, dass eine falsch transkribierte *messenger RNA* (mRNA) abgebaut und somit nicht translatiert wird. Die genetische Kombination führt wahrscheinlich zu einer unzureichenden Y14 Expression, unter anderem in Megakaryozyten (MKs). Diese sind somit nicht mehr in der Lage auszureifen und ausreichend Thrombozyten zu produzieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der beiden unterschiedlichen SNPs auf die Hämatopoese im TAR-Syndrom an einer Kohorte von 38 Patienten (24 Patienten mit SNP im 5'UTR, 14 Patienten mit SNP im Intron 1) untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit 5'UTR-SNP signifikant niedrigere Thrombozytenwerte aufweisen und zur Anämien neigen. Innerhalb der ersten Lebensjahre ist dieser Unterschied zu Patienten mit SNP im Intron 1 besonders auffällig. Die Anämie erholt sich stets innerhalb der ersten Lebensjahre. Bei der typischen postnatal auftretenden leukomoiden Reaktion zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss des Proteins Y14 innerhalb der Hämatopoese untersucht. Dazu wurde ein Differenzierungsmodell mit der Zelllinie K562 etabliert. Im ersten Schritt konnte gezeigt werden, dass Y14 bei einer megakaryozytären Differenzierung im Vergleich zur Kontrolle deutlich schwächer exprimiert wird und in einigen Zellen nicht nachweisbar ist. Im zweiten Schritt wurde das Protein Y14 mittels lentiviral eingebrachter short-hairpin RNA in K562-Zellen herunterreguliert. K562-Zellen differenzieren auch nach Herunterregulation von Y14 vergleichbar zur gewählten Kontrolle. Im letzten Teil der Arbeit wurde die Überexpression von Y14 und ein Differenzierungsmodell von hämatopoetischen Stammzellen etabliert. Mit diesem Element sind weitere Untersuchungen an hämatopoetischen Stammzellen möglich.

Thrombocytopenia absent radii (TAR)-syndrome is a rare congenital disorder, which is characterized by thrombocytopenia and bilateral radial aplasia. It is caused by a microdeletion on chromosome 1q21 and a single nucleotide polymorphism (SNP) in the 5'UTR (untranslated region) or within the first intron of *RBM8A*. *RBM8A* is located in the microdeletion region and encoding the protein Y14. Y14 is part of the exon-junction-complex (EJC), which is involved in nonsense-mediated-decay (NMD). Therefore, the protein is part of a normal cellular process, controlling transcribed messenger RNA (mRNA) and reducing incorrect mRNA before translation. The current model suggests that Y14 expression is reduced in megakaryocytes (MKs) due to the described genetic variations in TAR-syndrome. For this reason, MKs might poorly differentiate and are not able to produce a sufficient amount of platelets.

In this thesis, the influence of the two different SNPs on haematopoietic variants in patients with TAR-syndrome was investigated for all blood cell lineages. Our patient cohort comprises 38 patients (24 with 5'UTR-SNP, 14 with intron 1-SNP) that were studied. Platelet counts of individuals with 5'UTR-SNP are significantly lower compared to patients with intron 1-SNP, especially during the first years of life. Lower haemoglobin levels for patients with 5'UTR-SNP than for patients with intron 1-SNP were recognized. Some TAR-patients show an extremely elevated high white blood cell count after birth. The occurrence of this leukaemoid reaction did not correlate with the two underlying genetic variants.

Furthermore, the K562 cell line was established as a model for differentiating haematopoietic cells to further study the influence of Y14 expression levels in haematopoiesis. During megakaryocytic differentiation Y14 protein is expressed on a lower level compared to controls. In some cells Y14 was not detectable. After short-hairpin RNA-induced reduction of Y14 K562-cells still differentiated similar to control. Finally, a cellular system for overexpression of Y14 was investigated and a model with haematopoietic stem cells was established.

## 2 Einleitung

### 2.1 Hämatopoese: Entwicklung der Blutzellen

Als Hämatopoese wird die Bildung der Blutzellen bezeichnet. Diese findet während der Embryonalzeit hauptsächlich in der Leber, später im Knochenmark nahezu aller Knochen statt. Mit dem Älterwerden begrenzt sich die Hämatopoese auf flache Knochen, wie zum Beispiel das Becken, den Schädel oder die Wirbelkörper. In Fällen von starker Aktivierung des Knochenmarks, zum Beispiel bei starkem Blutverlust, kann sich die Hämatopoese wieder auf andere Knochen oder auf andere Organe (extramedulläre Hämatopoese, vor allem in Leber und Milz) ausbreiten. Diese Unterscheidung lässt sich auch makroskopisch feststellen. So stellt sich das blutbildende Knochenmark auch post mortem noch rötlich dar (*Medulla ossium rubra*), während sich das hämatopoetisch nicht mehr aktive Knochenmark mit Fett füllt und dadurch gelblich erscheint (*Medulla ossium flava*).

Alle Blutzellen stammen von pluripotenten Zellen des Knochenmarks, sogenannten hämatopoetischen Stammzellen (HSZ), ab [1]. Die Ausreifung in über zehn verschiedene Zelltypen, die sich im peripheren Blut nachweisen lassen, spaltet sich zu Beginn in die lymphoide und die myeloide Reihe. Die lymphoide Reihe differenziert zu B- und T-Lymphozyten sowie NK-Zellen aus, während der gemeinsame Vorläufer der myeloiden Reihe über mehrere Stufen zu allen anderen hämatopoetischen Zellen des Knochenmarks ausdifferenziert, unter anderem auch Erythrozyten und Megakaryozyten (MKs). Die einzelnen Prozesse werden von einer Vielzahl verschiedener Wachstumsfaktoren gesteuert. *Stem cell factor* (SCF) und Interleukin 3 (IL-3) sind die beiden wichtigsten Faktoren zur stetigen Selbsterneuerung der HSZ und zur weiteren Ausdifferenzierung in die myeloide Reihe. Für die Entwicklung von Thrombozyten beziehungsweise deren Vorläuferzellen im Knochenmark, MKs, ist insbesondere Thrombopoietin (THPO) von Bedeutung [2].

Einzelne Wachstumsfaktoren nehmen nicht nur Einfluss auf die Hämatopoese, sondern aktivieren auch ausgereifte Blutzellen im peripheren Blut, zum Beispiel fördert THPO die Ausreifung der HSZ zu MKs und ist gleichzeitig in der Lage periphere Thrombozyten zu aktivieren [3].

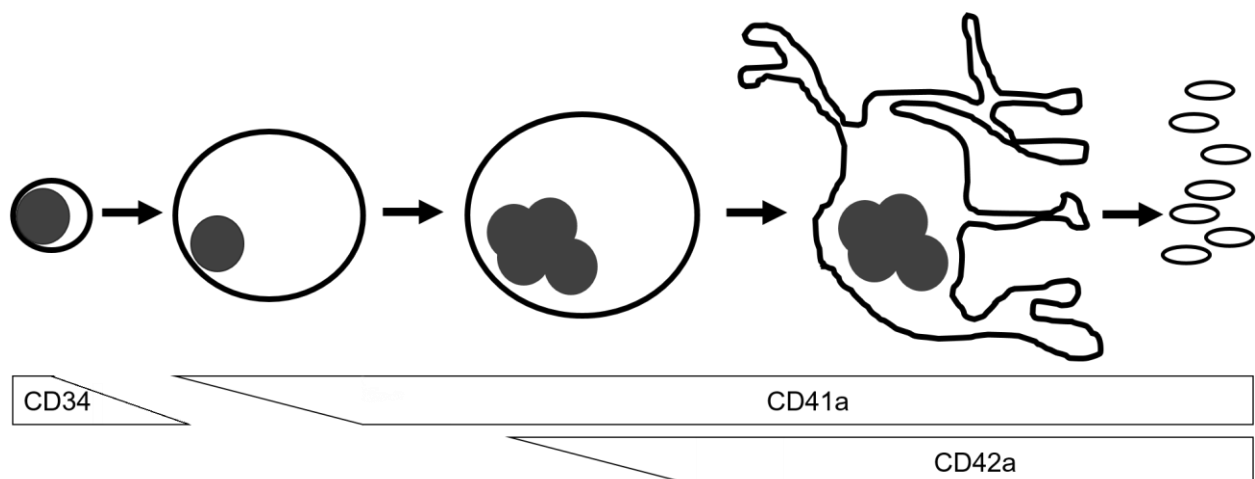
### 2.1.1 Die Megakaryopoese

MKs stellen eine eigene Zellreihe dar, reife Zellen reorganisieren ihr Zytoplasma und spalten dabei Thrombozyten ab. MKs heben sich schon allein aufgrund ihrer Größe (ca. 40 µm Durchmesser im Durchschnitt) mikroskopisch von anderen Zellen im Knochenmark ab, sie machen jedoch nur ca. 0,1% aller kernhaltigen Zellen im Knochenmark aus [3]. Während der Reifung von der HSZ zum Megakaryozyten (MK), die als Megakaryopoese bezeichnet wird, lassen sich mikroskopisch vier verschiedene Stadien unterscheiden: der Megakaryoblast (Stadium I), der Promegakaryozyt (Stadium II), der Megakaryozyt (Stadium III) und der Proplättchen bildende Megakaryozyt (Stadium IV). Als Proplättchen werden lange Tubulinfilamente bezeichnet, die in die Blutgefäße des Knochenmarks hineinreichen und dort Thrombozyten ins periphere Blut abgeben [4-6].

Neben den Unterschieden, die sich in den klassischen Färbetechniken darstellen lassen, wie zum Beispiel Größe, Kerngröße und Granulierung, verändern sich weitere wesentliche Merkmale im Verlauf der Megakaryopoese: zum Beispiel Proteinexpression und die Präsentation von Oberflächenantigenen. Zu beachten ist, dass nicht alle Veränderungen stets direkt mit einer Entwicklungsstufe verbunden sind. Mikroskopisch lässt sich die Größenzunahme leicht darstellen: So hat ein Megakaryoblast eine Größe von 15 bis 50 µm, ein Promegakaryozyt kann einen Durchmesser von bis zu 80 µm erreichen. Neben der gesamten Zelle vergrößert auch der Zellkern sein Volumen, dies weist auf die Ausbildung von Polyploidie hin. Die Anzahl der Chromosomensätze wird bis zu sechs Mal auf den 128fachen Chromosomensatz verdoppelt, ohne dass sich die Zelle teilt (Zytokinese) oder andere Teile des Erbgutes abgibt [7]. Dieser Prozess wird auch als Endomitose bezeichnet.

Oberflächenantigene sind in der Hämatologie wichtige Differenzierungsmarker, die zudem eine klinische Relevanz haben. Zum Beispiel können T-Zellen anhand der Expression von CD4- und CD8 in T-Helferzellen und zytotoxische Zellen differenziert werden. Die Liste der sogenannten *cluster of differentiation* (CD) umfasst inzwischen mehr als 300 verschiedene Antigene. Einzelne sind sehr spezifisch für eine Zellreihe und Entwicklungsstadium, andere eher ubiquitär exprimiert. Es existieren viele hochspezifische Antikörper zum Nachweis dieser Antigene. Neben der Bedeutung zur Differenzierung physiologischer Zellen wird das System ebenfalls dazu genutzt, Leukämieformen gegeneinander abzugrenzen (Immunophänotypisierung) [8]. Im

Folgenden werden ausgewählte CD-Antigene beschrieben. CD34 charakterisiert die HSZ, mit Beginn der Differenzierung verschwindet dieses Antigen langsam von der Zelle [9]. Als erster megakaryozytärer Oberflächenmarker wird CD41, das  $\alpha$ IIb-Integrin, beschrieben, wobei sich eine CD41-positive Zelle noch zu Erythrozyten entwickeln kann [10]. CD61, die  $\beta$ 3-Integrinkette, bildet gemeinsam mit CD41 das Heterodimer des Fibrinogenrezeptors. Die gemeinsame Expression gilt als frühester linienspezifischer Marker. Später kommen weitere MK-spezifische Rezeptoren dazu, wovon CD42 (von Willebrand Faktor-Rezeptor) wahrscheinlich einer der bekanntesten ist [11, 12]. Eine schematische Darstellung findet sich in Abbildung (Abb.) 1.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der Megakaryopoese. Die hämatopoetische Stammzelle (links) entwickelt sich in Gegenwart von Thrombopoietin zu einem Proplättchen-bildenden reifen Megakaryozyten. Währenddessen vergrößert sich die Zelle, bildet einen pluripotenten Kern und die Zusammensetzung der Oberflächenantigene verändert sich. Hier sind beispielsweise drei Marker gezeigt: CD34 für die hämatopoetische Stammzelle, CD41a ein früher Marker der Megakaryopoese und CD42a. Ganz rechts sind reife Thrombozyten gezeigt.

#### 2.1.1.1 Thrombopoietin (THPO)

Die Hämatopoese wird wie oben beschrieben von verschiedenen Wachstumsfaktoren gesteuert. THPO fördert auf späteren Stufen der Megakaryopoese die Ausdifferenzierung und Bildung von Proplättchen und somit die Bildung von Thrombozyten. THPO wird konstitutiv in der Leber gebildet. THPO-Rezeptoren wurden 1990 als murines Onkogen beschrieben, welches zu einer Immortalisierung von HSZ führt und als *cellular myeloproliferative leukemia virus oncogene* (c-mpl) bezeichnet wird. Zwei Jahre später konnte erstmals das humane homologe Protein kloniert werden [13]. Thrombozyten exprimieren c-mpl und binden das frei zirkulierende THPO. Kommt es also zu einem Mangel an Thrombozyten, einer sogenannten Thrombozytopenie, wird relativ wenig THPO gebunden. Im gesunden Organismus bleibt die Produktion von THPO konstant

und der Spiegel im Plasma steigt. In Folge werden mehr HSZ zu MKs ausdifferenziert. Dieser Regulationsmechanismus ist unter anderem bei schwerer Leberzirrhose außer Kraft, wenn es durch die mangelnde Syntheseleistung der Leber zu einem THPO-Mangel kommt und damit zu einer sekundären Thrombozytopenie. Neben dieser namensgebenden Funktion wirkt THPO auch auf die frühe HSZ indem es eine Ausdifferenzierung verhindert und so deren stete Erneuerung fördert [13, 14].

Bei der kongenitalen amegakaryozytären Thrombozytopenie (CAMT) haben die betroffenen Kinder einen Gendefekt im THPO-Rezeptor c-mpl. Dadurch kann THPO weder auf MKs und Thrombozyten noch auf den HSZ binden. Die Kinder fallen zuerst mit schweren Symptomen einer Thrombozytopenie auf, z.B. mit Petechien bis hin zu schwer kontrollierbaren Blutungen. In einer Knochenmarkpunktion lassen sich quasi keine MKs nachweisen. Bei fehlender Behandlung (Stammzelltransplantation) entwickeln diese Kinder im Verlauf einen Ausfall aller Reihen (Panzytopenie), welche die Wirkung des THPO auf frühe HSZ widerspiegelt [14, 15].

## 2.2 TAR-Syndrom

Eine weitere Erkrankung, in der eine angeborene Thrombozytopenie ein wesentliches Krankheitsmerkmal darstellt, ist das *Thrombocytopenia Absent Radii* (TAR-) Syndrom. Die Veränderung des Blutbildes geht hier stets mit einer Aplasie beider Radiusknochen einher.

Das TAR-Syndrom gehört mit einer Inzidenz von 0,5-1 Fällen pro 100.000 Lebendgeborenen zu den (sehr) seltenen kongenitalen Erkrankungen. 1929 wurden einzelne Fälle des noch unbekanntes TAR-Syndrom beschrieben [16], die ersten systematischen Beschreibungen stammen von Shall und Oliver aus dem Jahr 1959 [17]. Die Kinderärztin J. G. Hall fasste zehn Jahre später die in der Literatur beschriebenen Fälle zusammen, fügte neue hinzu und definierte erstmals diagnostische Kriterien und prägte somit den Begriff des TAR-Syndroms [18]. Hedberg veröffentlichte 1988 einen Übersichtsartikel mit der bislang größten Kohorte von 100 Patienten [19].

### 2.2.1 Klinik des TAR

Neben den beiden namensgebenden Hauptmerkmalen, der Thrombozytopenie und der beidseitigen Radiusaplasie, werden gehäuft andere skeletale Fehlbildungen und Anomalien beschrieben. Oftmals sind Ulnahypoplasie und Humerushypoplasie bis hin

zur Phocomelie zu beobachten, gelegentlich ist auch die untere Extremität von Hypoplasien betroffen [20, 21]. Bei den Missbildungen der oberen Extremität ist zu beachten, dass der Daumen stets unversehrt und vollständig erhalten ist. Diese Beobachtung grenzt das TAR-Syndrom gegenüber möglichen Differentialdiagnosen ab. Zu nennen ist zum einen die Fanconi-Anämie, die sich durch eine Panzytopenie und verschiedenen Fehlbildungen, unter anderem Daumen- und Radiusaplasien, auszeichnen kann. Des Weiteren sei auf das Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS) hingewiesen, eine angeborene Erkrankung des Immunsystems und der Thrombozyten.

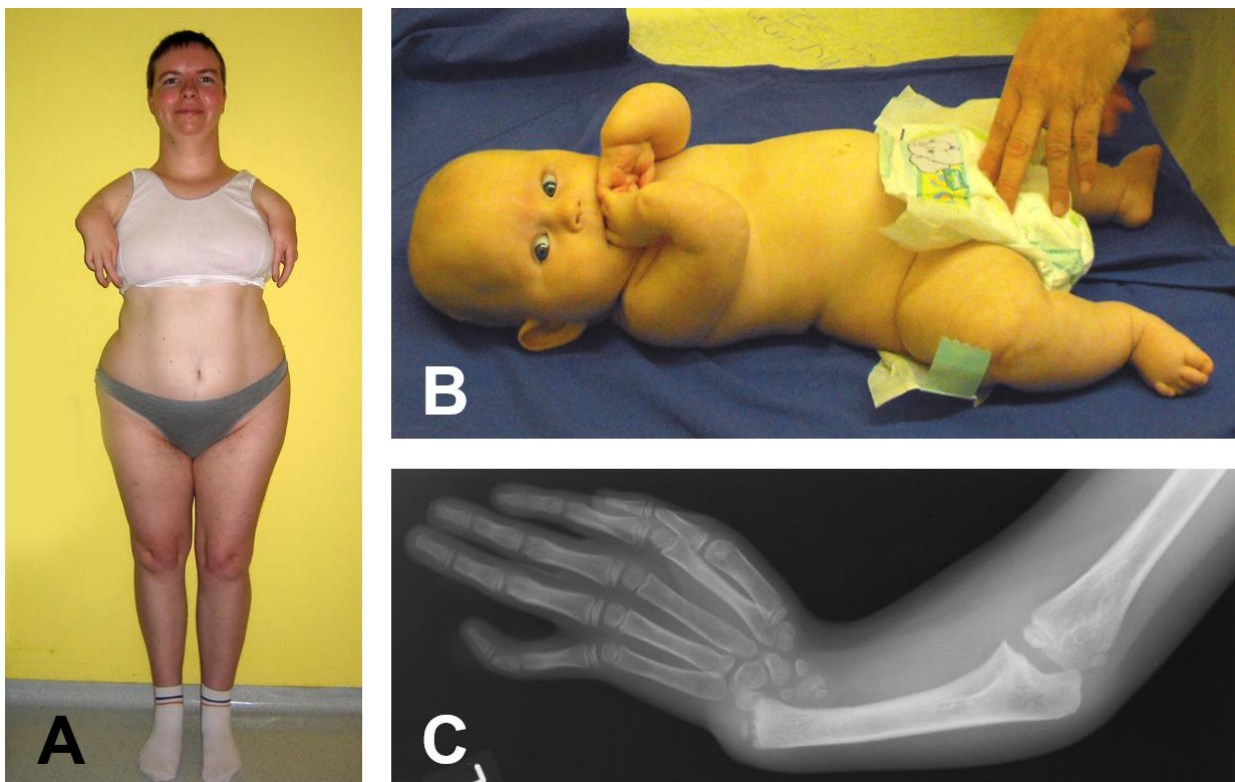
**Tabelle 1:** Mögliche Differentialdiagnosen zum TAR-Syndrom. [22, 23]

	Hämatologische Veränderungen	Skeletale Veränderungen
TAR-Syndrom	Thrombozytopenie	Bilaterale Aplasie des Radius mit Erhaltung der Daumen; Oftmals weitere skeletale Veränderungen
Thrombozytopenie mit radioulnärer Synostose	Thrombozytopenie mit Übergang in Panzytopenie	Radioulnäre Synostose
Roberts Syndrom	keine	Malformationen der Hand unter Beteiligung des Daumens
Holt-Oram Syndrom	keine	Veränderung der oberen Extremität mit Dysplasie oder Aplasie des Daumens
VACTERL - Assoziation	keine	Bei Veränderungen der oberen Extremität ist Daumen mitbetroffen (oft aplastisch); Hüft-Anomalien
Wiskott-Aldrich Syndrom	Thrombozytopenie, abnormale Lymphozyten mit Immunschwäche	keine
Fanconi Anämie	Knochenmarksversagen (Panzytopenie), hohes Risiko einer malignen Entartung	Malformation der oberen Extremität mit Beteiligung des Daumens; geringe Körpergröße

Die Schwere der Thrombozytopenie beim TAR-Syndrom nimmt in den ersten beiden Lebensjahren bei mehr als der Hälfte der Betroffenen ab, Normwerte (150 bis 400 Zellen pro nL) werden jedoch auch in späteren Jahren nur sehr selten erreicht [24]. Dies hat bei vielen Patienten eine erhöhte Blutungsneigung zur Folge, welche sich in manchen Fällen über einen sehr langen Zeitraum erstreckt. Zusätzlich werden eine direkt nach der Geburt bestehende Leukozytose und Eosinophilie beschrieben [18]. Aufgetretene Anämien sind

nachgewiesen, ob hier eine primäre (hämatologische) oder sekundäre Genese infolge vermehrter Blutungen zu Grunde liegt, konnte bisher nicht aufgeklärt werden.

Neben den skeletalen und hämatologischen Besonderheiten werden überdurchschnittlich häufig auch Fehlbildungen des Herzens, der Niere und des Urogenitals diagnostiziert. Fast die Hälfte der Patienten leidet unter einer Kuhmilchallergie [25, 26]. Das Verhältnis zwischen weiblichen Patienten und männlichen Patienten liegt je nach beschriebener Kohorte zwischen 1,7 bis 3,8 zu 1 [18, 27].



**Abbildung 2:** Patienten mit TAR-Syndrom haben unterschiedliche Phänotypen. **A** Die Patientin weist neben der Radiusaplasie eine deutliche Phacomelie auf [28]. **B** Die Patientin ist fünf Monate alt. Neben der Klumphandstellung ist auf dem Foto auch eine Hüftdysplasie mit übermäßig stark außenrotierter und flektierter Hüfte zu erkennen [29] **C** Auf dem Röntgenbild eines TAR-Patienten erkennt man die Aplasie des Radius und die Klumphandstellung [30].

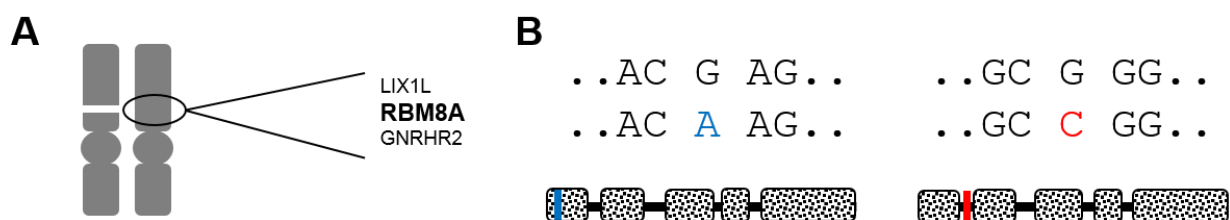
### 2.2.2 Genetik

Im Jahr 2007 wurde bei einer Kohorte von 30 Patienten eine Mikrodeletion im Bereich des langen Armes von Chromosom 1 (1q21.1) nachgewiesen. Bei 28 Patienten ist die Mikrodeletion gleich lang. Zudem wird eine längere und eine kürze Mikrodeletion beschrieben. Die kurze nachgewiesene Deletion hat einen Umfang von ca. 200.000 Basenpaaren. In 75% der Fälle konnte die Mikrodeletion auch bei einem der Eltern gefunden werden. Da das jeweilige Elternteil mit der Mikrodeletion in allen Fällen einen normalen Phänotyp besaß, konnte geschlussfolgert werden, dass es noch einen weiteren



Faktor benötigt, um das TAR-Syndrom auszulösen. Die Mikrodeletion wurde somit als notwendige, aber nicht hinreichende genetische Erklärung für die Entwicklung des TAR-Syndroms beschrieben [28].

In dem oben beschriebenen minimal deletierten Bereich liegen insgesamt elf verschiedene Gene, unter anderem das *RBM8A*-Gen (RNA-binding-motif 8A). Bei Analysen wurden bei Patienten in diesem Gen, welches für die Patienten hemizygot vorliegt, zwei verschiedene Polymorphismen, sogenannte *single-nucleotide-polymorphisms* (SNP) gefunden. Der eine Teil der Patienten besitzt ein Adenin anstatt eines Guanins im 5'UTR-Bereich (*untranslated region*), ein kleinerer Teil der Patienten hat im ersten Intron ein Cytosin an Stelle eines Guanins. In weiteren genetischen Untersuchungen konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei der Kombination aus Punktmutation und Mikrodeletion um einen Zufallsbefund handelt. Zu beachten ist, dass die Punktmutation im 5'UTR eine *minor allele frequency* (MAF) von ca. 3% und die Mutation im ersten Intron eine MAF von ca. 0,5% aufweist. Die MAF gibt Auskunft darüber, wie viele aller humanen Chromosome in einer Population diesen SNP aufweisen [31]. Damit konnte die zweite genetische Bedingung für die Entwicklung des TAR-Syndroms statistisch bewiesen werden.



**Abbildung 3:** Die Abbildung zeigt die Genetik bei Patienten mit TAR-Syndrom. Links (**A**) sind die zwei Chromosome 1 dargestellt, wovon eines beim TAR-Syndrom eine Deletion im langen Arm aufweist (hier verdeutlicht durch die Unterbrechung). Innerhalb dieser Region liegt unter anderem das Gen *RBM8A*. Dieses ist in **B** unten zweimal mit seinen fünf Exonen (gemusterte Blöcke) dargestellt. Zudem sind die beiden beschriebenen SNPs in Blau (5'UTR) und Rot (Intron) markiert. Darüber findet sich die entsprechende Wildtyp-Frequenz.

In der Literatur wurden bisher zwei Fälle von Patienten mit TAR-Syndrom beschrieben, die keine Mikrodeletion aufweisen, sondern stattdessen zwei unterschiedliche Mutationen im verbleibenden *RBM8A*-Gen. Die Mutationen ergeben ein vorzeitiges Stoppcodon oder eine *nonsense*-Mutation mit Verschiebung des Leserasters, sodass in beiden Fällen ein unvollständiges Y14-Protein codiert wird. Aktuell sind in der Literatur drei Fälle beschrieben, die neben der Mikrodeletion keinen der beiden oben

beschriebenen SNPs aufweisen: eine betroffene Mutter, ihr intrauterin verstorbenen Fötus [31] und ein Patient, der im späteren Verlauf ein MDS entwickelte [32].

### **2.2.3 Hämatopoese im TAR-Syndrom**

Da der klinische Verdacht auf ein TAR-Syndrom bei Betroffenen heutzutage genetisch bestätigt werden kann, ist die Knochenmarkpunktion zur Diagnostik und differentialdiagnostischen Abgrenzung nicht mehr standardmäßig üblich. Daher gibt es nur sehr wenige Untersuchungen des Knochenmarks von TAR-Patienten. Dies hat zur Folge, dass viele Untersuchungen zur Hämatopoese im TAR-Syndrom sehr alt sind, zudem zeigen sie uneinheitliche Ergebnisse. Zum einen konnte nachgewiesen werden, dass sich wesentlich weniger MKs im Knochenmark finden lassen [33, 34], zum anderen wurde gezeigt, dass die MK-Kolonien in Stammzellassays zellreicher sind, aber nicht die Größe von MKs in gesundem Knochenmark erreichen [35]. Letestu *et al.* haben einen Differenzierungsstopp der Megakaryopoese auf Ebene der CD41+/CD42+-Zellen nachweisen können [36].

Die Entwicklung von Knochenmarksversagen und Leukämien innerhalb des TAR-Syndroms wird in der Diskussion (Abschnitt 5.1.4) beschrieben.

### **2.2.4 Therapieoptionen**

Die wichtigste Therapie des TAR-Syndroms ist eine umfassende Aufklärung und Betreuung der Betroffenen und deren Eltern, sowie die genetische Beratung im Hinblick auf einen (weiteren) Kinderwunsch. Häufig auftretende Thrombozytopenien und akute Blutungen werden symptomatisch behandelt, z.B. mit der Gabe von Thrombozytenkonzentraten. Eine Anregung der Megakaryopoese mit IL-6 [37] oder humanem Thrombopoetin [38] kann zu einer kurzfristigen Steigerung der Thrombozytenzahlen genutzt werden. Langfristig wurde jedoch keine Wirkung beobachtet, sodass die Dauertherapie aufgrund starker Nebenwirkungen nicht zu empfehlen ist. Eine kausale Therapie für die niedrige Thrombozytenzahl wäre eine Knochenmarktransplantation. Diese wird ebenfalls aufgrund der hohen Risiken der Therapie und der Stabilisierung der Thrombozytenzahlen ab dem zweiten Lebensjahr nur in Ausnahmefällen durchgeführt [39]. Die Möglichkeit einer Gentherapie wird in Abschnitt 5.3.3 diskutiert. Des Weiteren besteht die Möglichkeit der chirurgischen Therapie von Handfehlstellungen, die aus der Radiusaplasie resultieren. Zu beachten ist hier, dass nicht immer eine funktionelle Verbesserung erreicht werden kann. Zusammenfassend

lässt sich sagen, dass das TAR-Syndrom lediglich symptomatisch behandelt wird und je nach Verlauf, zum Beispiel bei gehäuften Blutungen, eine enge Betreuung der Patienten notwendig oder hilfreich ist.

## 2.3 *RBM8A* und Y14

### 2.3.1 Y14 – Teil des *Exon Junction Complexes*

Das Gen *RBM8A* (*RNA-binding-motif 8A*) codiert für das Protein Y14. Erstmals beschrieben wurde es im Jahr 2000 von verschiedenen Arbeitsgruppen [40-42]. Das Gen und das dazugehörige Protein lassen sich in verschiedenen Spezies nachweisen, unter anderem in der Familie der Tauffliegen (*Drosophila*) [41]. Es ist ca. 19 kDa groß und gehört zum *Exon-junction-complex* (EJC). Dieser ist Teil des *Nonsense-mediated-mRNA-decay* (NMD), der beim Spleißen eingreift. Das Protein hat also eine zentrale Bedeutung in allen Zellen, insbesondere in solchen mit starker Translation.

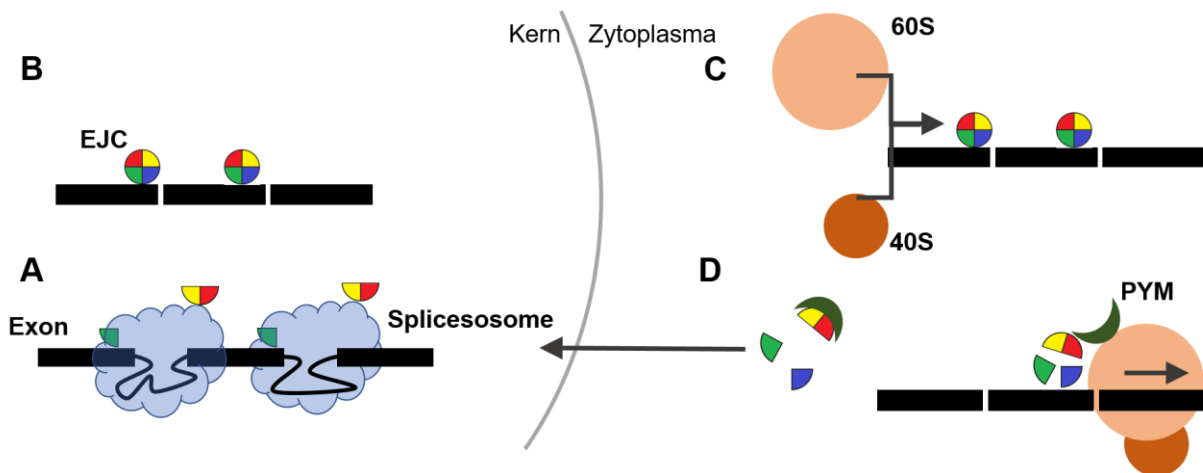
Der NMD ist ein mehrere Stufen übergreifender Prozess in allen eukaryotischen Zellen, der irreguläre oder falsche *messenger RNA* (mRNA) abbaut. Transkribierte mRNA wird über verschiedene Mechanismen qualitativ geprüft und zum Beispiel bei enthaltenen vorzeitigen Stoppcodons frühzeitig abgebaut. Bei letztgenannter Funktion ist der NMD mit dem EJC von großer Bedeutung. Beim Spleißen, auch beim alternativen Spleißen, bindet der EJC sich noch vor dem Herausschneiden der Introne an die mRNA. So bleiben alle Exon-Exon-Grenzen markiert. Gemeinsam werden mRNA und EJC in das Zytoplasma exportiert, wo die Translation einsetzt. Während des Translationsvorganges wird der EJC vom ablesenden Ribosom entfernt [43] und der Proteinkomplex in Einzelteilen in den Zellkern zurück transportiert [42]. Aktive Zellen sind aufgrund des hohen Umsatzes auf dieses Recycling angewiesen [44]. Befindet sich nun ein vorzeitiges Stoppcodon in der mRNA, wird dieses nicht bis zum Ende translatiert und der EJC wird nicht abgetrennt. Diese weiterbestehende Verbindung ist der Auslöser für den Abbau der mRNA, sodass diese nicht wiederholt abgelesen werden und es zu keiner relevanten Expression eines fehlerhaften Proteins kommen kann. Auch das fehlerhafte Protein wird seinerseits durch Proteinasen verdaut [45].

Eine beispielhafte Erkrankung, die die Funktion des NMDs verdeutlicht, ist die  $\beta$ -Thalassämie. Der Erkrankung liegt zumeist eine Punktmutation innerhalb des  $\beta$ -Globins zugrunde, sodass es bei homozygoten Merkmalsträgern zu einer Funktionsstörung der

Erythrozyten kommt, die lediglich mit alpha-Ketten ausgestattet sind. Bei Heterozygotie wird genügend beta-Globulin gebildet, sodass es lediglich zur Ausbildung einer milden Variante, der Minorform kommt. In der Klinik präsentiert sich die Majorform (auch Cooley-Anämie) bei Homozygotie mit schwerer hämolytischer Anämie, begleitet durch Hepatosplenomegalie, Wachstumsstörungen und Knochenveränderungen. Die Minorform verläuft deutlich milder und fällt oftmals erst bei routinemäßig angeforderten Blutbildern auf. Interessanterweise gibt es neben diesen beiden hauptsächlich vorkommenden Verlaufsformen auch eine seltene Zwischenstufe, die sogenannte Thalassaemia intermedia. Diese zeichnet sich genetisch häufig durch eine heterozygote Form aus. Betrachtet man letztere nun genauer, fällt auf, dass alle hier beobachteten Mutationen ein vorzeitiges Stoppcodon im dritten und letzten oder am Ende des zweiten Exons entstehen lassen. Dieses wird daher vom NMD nicht erkannt, sodass ein fehlerhaftes beta-Globulin translatiert und eingebaut wird. Dies führt zu einem frühzeitigen Abbau der dysfunktionalen Erythrozyten, welcher wiederum für die Entwicklung von mittelschweren Symptomen verantwortlich ist [46, 47].

Y14 ist wie oben beschrieben ein Teil des EJC. Gemeinsam mit Magoh, eIF4AIII und Barentsz/Casc3 bildet es den Kernkomplex. eIF4AIII ist unter Verwendung von Adenosintriphosphat (ATP) der Hauptbindungsfaktor für mRNA. Die Hauptfunktion von Y14 und Magoh besteht darin, die Hydrolyse von ATP zu verhindern und damit die Bindung der mRNA zu stabilisieren. Fehlt die Inhibition der enzymatischen Eigenschaften durch Y14 und Magoh, wechselt eIF4AIII in eine offene Konformation [48]. Die Verbindung zur mRNA wird durch das Ribosom während der ersten Translation gelöst [43].

Ein wichtiger Bestandteil für die Lösung und den anschließenden Rücktransport in den Nucleus des Y14/Magoh-Komplexes ist das Protein *partner of Y14 and Magoh* (PYM). PYM ist in den meisten Fällen an das Ribosom gebunden und bindet sich während der Translation an den Y14/Magoh Komplex, löst diesen und verhindert eine erneute Bindung an mRNA im Zytoplasma. Gemeinsam wird dieser Proteinkomplex in den Nucleus transportiert. PYM ist ebenfalls ein wichtiger Faktor für die Ribosomen-unabhängige Lösung von der mRNA [49].



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der Funktion des EJC. Der EJC wird durch den Kreis dargestellt, die vier Untereinheiten sind farblich zueinander abgegrenzt: Y14 rot, Magoh gelb, eIF4a3 grün und Barentsz blau. **A** eIF4a3 bindet sich schon vor dem Splicesosome an die mRNA. **B** Y14/Magoh und Barentsz stabilisieren die Verbindung zur mRNA und markieren somit als ganzes die Exon-Exon-Grenzen. **C** Das Ribosom translatiert die mRNA. **D** Dabei wird der gebundene EJC Komplex gelöst und in seine Teile zerlegt. Von Bedeutung ist hier PYM. PYM ist ein an das Ribosom gebundenes Protein, welches sich an Y14/Magoh bindet, sodass es innerhalb des Zytoplasmas nicht zu einer erneuten Bindung an die mRNA kommen kann. Die einzelnen Komponenten werden zurück in den Kern transportiert [49-51].

### 2.3.2 Das Protein Y14

Neben der wesentlichen Rolle im EJC und damit im NMD gibt es weitere experimentelle Beobachtungen, die Y14 in einem Kontext unabhängig vom NMD beschreiben. Ishigaki *et al.* haben in einer humanen Zelllinie aus einem Lebertumor gezeigt, dass die Depletion von Y14 zu einem Zellzyklus-Arrest führt [52]. Zudem konnten sie zeigen, dass Y14 deutlich konzentriert im Nucleus nachzuweisen ist [53], diese Beschreibung deckt sich mit den Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen [54]. Der Großteil von Y14 liegt in phosphorylierter Form vor [55]. Bei Depletion von Y14 lässt sich zudem eine Verringerung der *p-body*-Anzahl feststellen. Die sogenannten *p-bodies*, *processing bodies*, sind mikroskopisch sichtbare Strukturen in eukaryotischen Zellen, die zu einem Großteil aus Enzymen bestehen, in denen der Abbau von mRNA stattfindet. Der Zellzyklus scheint durch die Depletion von Y14 erkennbar unterbrochen zu sein [56].

Y14 und Magoh haben einen gegensätzlichen Effekt auf den Transkriptionsfaktor STAT3. STAT-Proteine sind Signalmoleküle des JAK-STAT-Signalweges, einem in Säugetieren weit verbreiteten Signalweg. STAT3 spielt insbesondere bei der Immunantwort eine Rolle. Y14 beeinflusst die Phosphorylierung und damit die Aktivierung von STAT3, wohingegen die Gegenwart von Magoh diesen Effekt wieder auffängt [57, 58].

### 2.3.2.1 Y14 und neurologische Entwicklung

Ein weiteres gut untersuchtes Gebiet mit Einfluss des EJC ist die neuronale Entwicklung. Silver *et al.* konnten im Jahr 2010 zum ersten Mal zeigen, dass Mäuse mit einer Haploinsuffizienz für Magoh eine signifikante Reduktion der Körpergröße und zudem eine disproportionale Mikrozephalie aufweisen [59]. In den späteren Jahren wurden ähnliche Effekte auch für die weiteren Proteine des EJC-Kernkomplexes beobachtet [54, 60-62]. Lediglich bei der Haploinsuffizienz von Barentsz zeigen sich keine so gravierenden Unterschiede in der embryonalen Entwicklung im Vergleich zum Wildtyp [61]. Mao *et al.* haben bei diesen Untersuchungen auch Unterschiede in der Expressionsstärke in neuronalen Zellen an verschiedenen Gestationstagen festgestellt [54]. Der beschriebene Effekt der Haploinsuffizienz auf die Gehirnentwicklung kann interessanterweise durch einen vollständigen Verlust von p53 teilweise aufgehoben werden. Einen Zusammenhang zwischen der Expression von Y14 und Spleiß-Varianten von p53 fanden zudem auch Lu *et al.* Parallel zu oben beschriebenen Haploinsuffizienz-Analysen hat die Herunterregulation von Barentsz durch siRNAs in HeLa-Zellen im Gegensatz zu anderen EJC-Komponenten keinen Einfluss auf die registrierten Spleiß-Formen [63]. Alle Beobachtungen sind in vitro- oder in Mausmodellen gemacht worden.

Untersuchungen beim Menschen zeigen, dass eine Deletion im Bereich 1q21 vermehrt zu neuronalen Entwicklungsverzögerungen und geistigen Behinderungen führt [64]. Bei einigen der untersuchten Patienten liegt genau der Bereich, der auch bei TAR-Patienten betroffen ist, innerhalb der größeren Deletion. Interessanterweise lassen sich bei den Menschen mit klinisch und genetisch gesichertem TAR-Syndrom (auch aufgrund der geringen Fallzahl) keine Beobachtungen in dieser Hinsicht machen. Auch die Konkurrenten der Deletion sind klinisch unauffällig und es gibt keine Hinweise auf neuronale oder psychiatrische Erkrankungsbilder.

Über die verschiedenen Untersuchungen zurückblickend, die verschiedene Gruppen unabhängig voneinander durchgeführt haben, lässt sich festhalten, dass eine vollständige Depletion von *RBM8A* nicht mit der weiteren physiologischen Funktion der Zelle übereinzubringen ist. Beispielhaft sei die Depletion von *RBM8A* im Zebrafisch (*Danio rerio*) durch Morpholinos genannt. Diese zeigen zwei Tage nach der Fertilisation Missbildungen im Körper- und Extremitätenwachstum und versterben [31].

### 2.3.3 Bedeutung der Veränderung im *RBM8A*-Gen

Die Veränderungen im *RBM8A*-Gen beim TAR-Syndrom sind von ihrer Struktur her anders, als bei vielen anderen genetischen Erkrankungen (zum Beispiel bei der oben beschriebenen  $\beta$ -Thalassämie). Klinisch relevante Punktmutationen werden vor allem in codierenden Bereichen von Genen beobachtet. Hier kommt es entweder zu einem vorzeitigen Stoppcodon (*nonsense*-Mutation), sodass nur ein unvollständiges Protein synthetisiert wird, oder zu einem Austausch einer Aminosäure oder einem Fehler im Leseraster (*missense*-Mutation), sodass das Protein zwar vorhanden, aber nicht mehr funktionsfähig ist.

Die Mikrodeletion 1q21.1 führt nicht zu einem pathologischen Mangel an bestimmten Proteinen. Dies zeigen die nicht betroffenen Deletionsträger. Da die beiden beschriebenen SNPs nicht im codierenden Bereich liegen, kommt es zudem weder zu einer *nonsense*-, noch einer *missense*-Mutation.

Die Mutationen befinden sich, wie oben bereits beschrieben, im 5'UTR oder im ersten Intron. Dies sind zwei klassische Regionen, in denen sich Transkriptionsfaktoren an die DNA binden und die Transkription beeinflussen [65]. Theoretisch ist also denkbar, dass durch die veränderte Bindungsregion ein neuer Faktor binden kann bzw. ein bestehender schlechter binden kann. Diese Möglichkeit könnte zudem erklären, warum es zu einem variablen klinischen Bild kommt, bei dem der Radius und die Thrombozyten stets betroffen sind. Das Protein Y14 ist theoretisch in allen Zelltypen vorhanden und der EJC wichtiger Bestandteil jeder aktiven Zelle. Die spezifische Wirkung des Gendefektes in der Hämatopoese und in der Entwicklung der Radii könnte durch nur hier vorkommende bzw. in einer sensiblen Entwicklungsphase nur hier vorkommende Transkriptionsfaktoren erklärt werden. Diese könnten beispielsweise eine Translation von Y14 hemmen, sodass die Zelle in Apoptose geht, da ihre eigene Proteinbiosynthese nicht mehr uneingeschränkt funktionstüchtig ist.

Bei einer bioinformatisch gestützten Suche nach Transkriptionsfaktoren, die durch die oben beschriebenen Veränderungen ihr Bindungsverhalten zum entsprechenden Genabschnitt verändert haben könnten, wurden Evi-1, Mzf1 und RBPJ gefunden. Evi-1 ist ein inhibierender Faktor, der durch die Punktmutation im 5'URT eine Bindungsstelle erhält. Mzf1 und RBPJ sind transkriptionsfördernde Faktoren, die durch die Punktmutation im ersten Intron mit schlechterer Affinität binden könnten. Mittels

*Electrophoretic-Mobility-Shift-Assays* (EMSA) konnte gezeigt werden, dass die Mutation im 5'UTR in vitro eine zusätzliche Bindungsstelle für Evi-1 darstellt [31]. Für die anderen beiden beschriebenen Faktoren gelang dies nicht. In weiteren funktionellen Untersuchungen wurde zudem gezeigt, dass die Aktivität der Translation abhängig von der Zellreihe ist. So verursachen die Punktmutationen eine herabgesetzte Aktivität in megakaryozytären und osteoblastären Zelllinien. Zudem konnte mittels Immunoblot gezeigt werden, dass in Thrombozytenlysaten von TAR-Patienten im Vergleich zu nicht betroffenen Deletionsträgern und Gesundspendern weniger Y14 exprimiert wird [31].

## 2.4 Evi-1

Die *ecotropic viral integraton site-1* (*EVI1*) wurde erstmals 1988 als Ort zur Integration von viraler DNA in myeloiden Tumoren von Mäusen beschrieben [66]. Diese Eigenschaft war zudem namensgebend. Der *EVI1*-Locus liegt beim Menschen auf dem langen Arm des Chromosoms 3. Das von dem Gen codierte Protein Evi-1 ist ein nukleäres DNA-Bindungsprotein (Transkriptionsfaktor) mit mehreren Zinkfinger-Domänen, die in der Lage sind, bestimmte DNA-Sequenzen wiederzuerkennen und daran zu binden [67, 68]. Es sind verschiedene Transkriptionsvarianten von Evi-1 nachgewiesen worden, wichtig ist vor allem der sogenannte MECOM-Komplex. Dieser beschreibt einen Proteinkomplex aus Evi-1 und MDS1, die genetische Information zu *MDS1* liegt am 5'Ende von *EVI1* auf Chromosom 3. Während für Evi-1 viele Funktionen beschrieben sind, ist die Rolle des MECOM-Komplexes unklar. Beim Menschen wurde Evi-1 als Protoonkogen, insbesondere für die akute myeloide Leukämie (AML) beschrieben. *EVI1* kann beispielsweise durch chromosomale Translokation und Inversion übermäßig repliziert werden [68]. In der aktuellen WHO-Klassifikation stellt die AML mit folgender Genetik „*inv(3)(q21q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2)*“ eine spezielle Untergruppe dar [69]. Diese genetischen Aberrationen bedingen, dass ein fremder *Enhancer* unmittelbar dem *EVI1* vorgeschaltet wird und es so zu einer Überexpression von Evi-1 kommt [70]. Das europäische Leukämie Netzwerk teilt genetische Faktoren in drei Risikogruppen (günstig, intermediär und ungünstig) ein, da bekannt ist, dass neben dem Alter die Molekular-Zytogenetik prognosebestimmend ist. Eine Evi-1-Überexpression wird stets in die Gruppe mit ungünstiger Prognose einsortiert [8].

Im gesunden Organismus ist Evi-1 ein wichtiger Transkriptionsfaktor für die Erhaltung der HSZ. In diesen CD34-positiven Zellen konnten hohe Expressionslevel nachgewiesen



werden [71]. *EVI1*-Knockout-Mäuse zeigen ein Defizit in der Hämatopoese, insbesondere bei den HSZ. In diesen Versuchen war zudem auffällig, dass sich vor allem die Anzahl der Thrombozyten deutlich von der einer Wildtyp-Maus unterscheidet. Eine etwas mildere Variante der Thrombozytopenie zeigte die heterogene Knockout-Maus [72].

## 2.5 Zielsetzung der Arbeit

Das TAR-Syndrom ist eine seltene kongenitale Erkrankung, die durch eine Radiusaplasie und eine Thrombozytopenie gekennzeichnet ist. Insbesondere letztere ist für die Kinder in den ersten Lebensjahren oftmals das deutlich gefährlichere Symptom ihrer Erkrankung. Im weiteren Verlauf steigen die Thrombozytenwerte bei den meisten Patienten wieder an. Die genetische Ursache wurde im Jahr 2012 beschrieben. Möglicherweise liegt in der uneinheitlichen Genetik der Patienten die Ursache für die verschiedenen Verläufe der Thrombozytenzahlen. Des Weiteren ist bisher die genaue Rolle des Proteins Y14 während der Megakaryopoese unbekannt, ähnlich wie die Rolle des Transkriptionsfaktors Evi-1. Zielsetzung dieser Arbeit sollen daher folgende Themen sein:

- I. Sind zwischen den beiden Patientengruppen mit SNPs im 5'UTR bzw. Intron 1 verschiedene Verläufe der Thrombozyten, der roten Reihe und der weißen Reihe zu identifizieren?
- II. Gibt es Hinweise darauf, dass das Protein Y14 eine gesonderte Rolle während der Hämatopoese, insbesondere während der Megakaryopoese spielt? Wie ist die Expression von Evi-1 in diesem System?
- III. Lässt sich das Protein Y14 in einer hämatologischen Zelle herunterregulieren und welche Effekte hat dies, insbesondere im Hinblick auf eine mögliche megakaryozytäre Differenzierung?
- IV. Lässt sich neben einem Zelllinienmodell ein Modell etablieren, welches auf hämatopoetischen Stammzellen (CD34+) beruht?

### 3 Material, Methoden und Patienten

#### 3.1 Material

Eine Auflistung der verwendeten Ausrüstung, Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Kits befindet sich im Anhang.

##### 3.1.1 Antikörper

**Tabelle 2:** verwendete Antikörper (K – Kaninchen, M – Maus, Z – Ziege)

Antikörper	Vertrieb	Reaktivität
K- $\alpha$ -Evi-1	Cell Signaling	Mensch
M- $\alpha$ -Y14	Santa Cruz Biotechnology	Mensch, Maus
K- $\alpha$ -turboGFP	Evrogen	
M- $\alpha$ -GAPDH	Santa Cruz Biotechnology	Mensch, Maus
M- $\alpha$ -CD34-PE-Cy5	BD Biosciences	Mensch
M- $\alpha$ -CD41a-APC	BD Biosciences	Mensch
M- $\alpha$ -CD41a-FITC	BD Biosciences	Mensch
M- $\alpha$ -CD42a-FITC	BD Biosciences	Mensch
M- $\alpha$ -CD-45-APC	BD Biosciences	Mensch
M- $\alpha$ -CD235a-FITC	BD Biosciences	Mensch
Z- $\alpha$ -Kaninchen IgG - Alexa Fluor 594	Invitrogen	Kaninchen
Z- $\alpha$ -IgG, HRP-konjugiert	DakoCytomation	Kaninchen
Z- $\alpha$ -IgG, HRP-konjugiert	DakoCytomation	Maus

Cell Signaling, Leiden, Niederlande; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland; Evrogen, Moskau, Russland; Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg, Deutschland; Invitrogen, Darmstadt, Deutschland; DakoCytomation, Glostrup, Dänemark

##### 3.1.2 Verwendete Oligonukleotide

**Tabelle 3:** verwendete Oligonukleotide für die PCR und Plasmidligation

	Vorwärtssequenz (5' → 3')	Rückwärtssequenz (5' → 3')
SNPs1	AGCTTGACTGGCGACCTTTC	CCAGCCTCGTGAAGATCTAG
hRBM8A_pMIG_Xho	AAACTCGAGATCGCGGACGTGCTAGATC	
hRBM8A_pMIG_Eco	AAAGAATTCTCAGCGACGTCTCCGGTCTG	

**Tabelle 4:** Oligonukleotide zur qRT-PCR

	Vorwärtssequenz (5' → 3')	Rückwärtssequenz (5' → 3')
Chr1-No3	TTGGGTAAGAACGGAGATGG	CACCTTTCATCAAGGGAGGA
POLR3C I 13-14	GGAAAATGGTAAAGGGTGGTG	CATCTCCCTAACCTGGGAGA
PIAS3-I9-10	CTTCCCCTGAGCATTTGCAA	GAGGTTAAGGACTAGCAAGATCAAAAGATT
MYH9	TCTCTAGCTCCCCATGTCAGG	TACAGAGGTCATGCCTCCCC
SDHA-Primer	GACATCAAGACTGGCAAGGTTAC	AGTAGGAGCGGATAGCAGGAG
Y14-Primer	CTCGACAGGCGAACAGGATA	ATCAAATCCTGGCCAGTTGAG

## 3.2 Patienten und Erhebung der Blutwerte

Die beschriebene Kohorte von TAR-Patienten umfasst 38 Patienten. Diese wurden zwischen 1995 und 2015 an der Medizinischen Hochschule Hannover, der Charité Berlin, der Universitätsklinik Würzburg und dem Kinderspital Zürich betreut. Diverse Patienten aus der Kohorte sind bereits in anderen Veröffentlichungen beschrieben. Die jeweilige Erstbeschreibung ist der Tabelle (Tab) 6 zu entnehmen. Bei allen Patienten ist die oben beschriebene Mikrodeletion nachgewiesen worden, der Nachweis bei den neubeschriebenen Patienten erfolgte mittels qRT-PCR. Die jeweiligen SNPs im Gen *RBM8A* wurden mittels Sanger-Sequenzierung ermittelt. Die Genetik der Familienmitglieder, falls Material zur Verfügung stand, wurde nach denselben Methoden analysiert.

Für alle 38 Patienten gilt, dass eine vollständige genetische Diagnose vorliegt und mindestens ein Thrombozytenwert in den Akten auffindbar war. Die Blutwerte wurden den jeweiligen Krankenakten oder den beschriebenen Veröffentlichungen entnommen. Für die Werte der roten Reihe (Hämoglobin, Hämatokrit, Erythrozytenzahl, Retikulozytenanteil, MCV, MCH und MCHC) und der Thrombozyten sind maximal ein Wert aus drei Monaten in die Analyse eingeflossen. Soweit möglich, wurde eine vorherige Transfusion ausgeschlossen. Aufgrund der massiven Leukozytose in den ersten Lebenstagen [18] wurden für die Leukozyten in den ersten zwei Lebenswochen täglich Werte erhoben, dann monatlich bis zum zweiten Geburtstag.

Alle retrospektiven Analysen wurden in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki und entsprechender Ethikvoten (EA2/170/05 und 52/15) durchgeführt.

## 3.3 Molekularbiologische Methoden

### 3.3.1 Isolierung von genomischer DNA

Zur genetischen Diagnostik wurde den Patienten und ihren Verwandten jeweils 1-5 mL EDTA Blut entnommen. Diese wurden mit einem Volumen PBS verdünnt und vorsichtig auf einen Ficoll-Gradienten gegeben. Das Gemisch wurde bei 400 g und Raumtemperatur für 20 min ohne Bremse zentrifugiert. Der entstandene weiße Ring an der Grenzfläche, der die mononukleäre Zelle enthält, wurde abgenommen und mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurde aus diesen Zellen mittels des *DNAesy Blood&Tissue*

*Kits* nach mitgeliefertem Standardprotokoll die DNA isoliert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

### 3.3.2 Messung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration jeder isolierten DNA wurde mittels *NanoDrop* ermittelt. Dazu wurde jeweils 1 µL entnommen. Die Reinheit der Probe konnte mit dem Verhältnis der Extinktion bei 260 nm zu 280 nm (Verunreinigung durch Proteine) bzw. der Extinktion bei 260 nm zu 230 nm (Verunreinigung durch Phenol) bestimmt werden. Die Referenzwerte 260/280 liegen zwischen 1,8 und 2,0.

### 3.3.3 Polymerase Kettenreaktion

Zur Amplifizierung von DNA-Abschnitten zur späteren Sanger-Sequenzierung wurde folgendes Protokoll benutzt:

500 ng DNA  
0,5 µL Desoxyribonukleosidtriphosphat  
2,5 µL 10x PCR-Puffer  
0,25 µL Taq-Polymerase  
1 µL Primer (jeweils 0,5 µL SNPs1 sense und antisense)  
auf 25 µL Gesamtvolumen auffüllen

mit diesem Polymerase Kettenreaktions (PCR-) Zyklus:

5 min	95°C	
<u>50 sec</u>	<u>95°C</u>	
<u>50 sec</u>	<u>56°C</u>	
<u>50 sec</u>	<u>72°C</u>	<u>(35 Wiederholungen)</u>
5 min	72°C	
	4°C	

Das entstandene Produkt wurde mittels Gelelektrophorese anhand der Fragmentlänge identifiziert. Dazu wurden 5 µL des Ansatzes mit 1 µL PCR Ladepuffer versehen, auf ein einprozentiges Agarose-Ethidiumbromid-Gel (m/v) aufgetragen und bei 130 V für 30 min aufgetrennt. Das zu erwartende PCR-Produkt hat eine Länge von 500 Basenpaaren.

#### 3.3.3.1 Sangersequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma *euofins Genomics* in Ebersberg, Deutschland. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms *SnapGene*.

### 3.3.4 Isolation von RNA aus Zellen

Zur RNA-Isolation wurden min.  $5 \times 10^5$  Zellen nach einmaligem Waschen mit 4°C kaltem PBS bei 400 g und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 mL Trizol aufgenommen und 10 min bei Raumtemperatur lysiert. Die RNA-Extraktion erfolgte mit dem *RNeasy Mini Kit*. Dazu wurden der Probe 200 µL Chloroform hinzugefügt, gut gemischt und bei 12.000 g und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Aus der oberen wässrigen Phase wurden 350 µL entnommen und mit 350 µL 70%-Ethanol (v/v) vermischt. Diese 700 µL wurden in ein *RNeasy Mini column* gegeben und die nachfolgenden Waschschriffe gemäß dem Benutzerhandbuch durchgeführt. Die RNA wird jeweils in 30 µL RNase-freiem Wasser aufgenommen und die Konzentration wird mittels Photometer bestimmt. Die RNA wird bei -80°C gelagert.

### 3.3.5 Reverse Transkription der RNA in cDNA

Die reverse Transkription wurde mittels *iScript™ Select cDNA Synthesis Kit* und den darin enthaltenen *Random Hexamer* Primern anhand des mitgelieferten Standardprotokolls durchgeführt. Es wurde stets 1 µg RNA umgeschrieben.

### 3.3.6 Analyse mittels quantitativer *Real Time*-PCR

Die *Real Time*-PCR (qRT-PCR) ermöglicht, dank des eingesetzten Farbstoffes SYBR-Green, welcher sich in neu gebildete doppelsträngige DNA einlagert, die Menge des ausgehenden Substrates zu bestimmen. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit zur Expressionsanalyse von mRNA und zur Mikrodeletionsanalyse bei TAR-Patienten und ihren Verwandten benutzt. Die Versuche wurden mit dem *7500 Fast Real-Time PCR System* und der mitgelieferten Software *7500 v.2.0.1* durchgeführt.

#### 3.3.6.1 Reaktionsbedingungen

Jeder Reaktionsansatz der qRT-PCR wurde in Triplikaten gemessen und nach den Angaben von *Applied Biosystems* mit den *Universal SYBR® Green Supermix* durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 4 aufgeführt.

qRT-PCR-Ansatz (Mikrodeletionsanalyse):

20 ng gDNA

5 µL *Universal SYBR® Green Supermix*

4 pMol Vorwärts-Primer

4 pMol Rückwärts-Primer

auf insgesamt 20 µL mit Aqua dest. auffüllen

qRT-PCR-Ansatz (mRNA-Expressionsanalyse):

- 2  $\mu$ L cDNA
- 5  $\mu$ L *Universal SYBR® Green Supermix*
- 4 pMol Vorwärts-Primer
- 4 pMol Rückwärts-Primer
- 5  $\mu$ L Aqua dest.

Programmablauf

initiale Denaturierung	10 min
<u>Denaturierung 95°C</u>	<u>15 sec</u>
<u>Annealing 60°C</u>	<u>15 sec</u>
<u>Extension 72°C</u>	<u>30 sec (40x)</u>
Kühlung 4°C	

Zu beachten ist, dass bei dieser Methode auch andere Abschnitte der DNA amplifiziert werden können. Die Spezifitätskontrolle erfolgte mittels Schmelzkurven-Analyse. Hierbei wird die Temperatur innerhalb des Reaktionsgemisches langsam erhöht. Abhängig von der Länge der Fragmente löst sich die doppelsträngige DNA auf und gibt den eingelagerten Farbstoff frei. Dieser Schmelzpunkt kann bestimmt werden. Zeigte sich kein eindeutiger erwartbarer Schmelzpunkt für das zu amplifizierende Produkt, wurde die Analyse verworfen.

### 3.3.6.2 Auswertung

Bei der Auswertung wurden keine absoluten DNA-Mengen bestimmt, sondern das zu untersuchende Fragment in Verhältnis zu einem sogenannten Haushaltsgen (hier eine Untereinheit des Succinatdehydrogenase Komplexes, SDHA) für die mRNA-Expressionsanalysen gesetzt. Als Haushaltsgene werden Gene und deren Transkripte bezeichnet, die in jeder vitalen Zelle vergleichbar stark exprimiert werden.

Bei der Mikrodeletionsanalyse wurden alle Analysen in Vergleich zu *MYH9* (*Myosin heavy chain 9*) gesetzt. *MYH9* liegt auf Chromosom 22 und ist bei Patienten mit TAR-Syndrom nicht betroffen. Neben zwei Genen, die innerhalb der Mikrodeletionsregion liegen, wurde stets auch eine Region auf Chromosom 1 mit untersucht, die typischerweise nicht deletiert ist.

Für jede einzelne Probe wurde der sogenannte  $C_T$ -Wert zur weiteren Auswertung benutzt. Dieser gibt den Zeitpunkt an, zu dem sich die DNA innerhalb der Probe nicht

mehr linear, sondern exponentiell vermehrt. Je niedriger dieser Wert, desto mehr DNA war in der Ausgangsprobe enthalten. Die Auswertung erfolgte nach der sogenannten  $\Delta\Delta C_T$ -Methode (bei der Expressionsanalyse *MYH9* anstatt *SDHA*):

$$\Delta C_T \text{ Gen A} = C_T \text{ Gen A der Kontrolle} - C_T \text{ Gen A der Probe}$$

$$\text{Expressionsverhältnis} = \frac{2^{\Delta C_T \text{ Gen A}}}{2^{\Delta C_T \text{ Gen SDHA}}}$$

### 3.3.6.3 Primereffizienz

Eine Voraussetzung zur Auswertung der erhobenen Daten ist, dass die benutzten Primer alle eine ähnliche Amplifikationseffizienz im optimalen Bereich (0,8 – 1,2) aufweisen. Zur Bestimmung der Effizienz wurde eine Probe seriell verdünnt (zum Beispiel mit Faktor 4: 1:4, 1:16, 1:64) und von diesen die  $C_T$ -Werte gemessen. Letztere wurden über den oben beschriebenen Verdünnungslogarithmus aufgetragen. Dies ergab eine Kurve, deren lineare Regression wiederum über folgende Formel beschrieben wurde:

$$E = 10^{-1/m} - 1$$

m entspricht dabei der Steigung, wobei eine Effizienz von 100% gleich 3,32 wäre. Die hier benutzten Primer haben allesamt eine Effizienz von 0,95 -1.

### 3.3.7 **Herstellung von Proteinlysaten**

Die zu lysierenden Zellen werden zwei Mal mit kaltem PBS gewaschen und bei 4°C und 300 g für 5 min zentrifugiert. Das so gewonnene Zellpellet wurde in RIPA-Puffer (mit folgenden Proteinase-Inhibitoren: 5‰ PMSF, 2‰ Pepstatin, 1‰ Leupeptin und 1‰ Apeptin, alle (w/v)) gelöst, gut gemischt und 45 min auf Eis lysiert. Im Anschluss wurde bei 14.000 g der nicht lysierte Zellschrott abzentrifugiert.

### 3.3.8 **Proteinkonzentrationsmessung mittels Bradford**

Zur Messung der Proteinkonzentration wurde stets eine Standardreihe mit 10, 50, 100, 250, 500, 1.000 und 1.500 µg/mL BSA mitbestimmt. Diese wurden in 1 mL Bradford-Lösung aufgenommen. Die Proteinkonzentration wurde mittels *NanoDrop* gemessen. Die zu messende Probe ist stets mit dem Faktor 5 verdünnt worden.

### 3.3.9 **Western Blotting**

Zur Bestimmung der Proteinexpression wurden die Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gel nach Größe aufgetrennt. Dazu wurden entweder 13,5% Gele (w/v) bei Nachweis von

Y14 und GFP oder 10%-Gele bei Nachweis von Y14 und Evi-1 verwendet. Über jedes Trenngel wurde ein dreiprozentiges Sammelgel mit entsprechenden Taschen gegossen.

Trenngel 13,5% - 5 mL

1,4 mL	H <sub>2</sub> O
2,25 mL	30% Acrylamid Mix
1,3 mL	Tris-HCl, pH 8,8
0,05 mL	10% SDS
0,05 mL	APS
0,003 mL	TEMED

Trenngel 10% - 5 mL

1,95 mL	H <sub>2</sub> O
1,7 mL	30% Acrylamid Mix
1,3 mL	Tris-HCl, pH 8,8
0,05 mL	10% SDS
0,05 mL	APS
0,003 mL	TEMED

Sammelgel 3% - 5 mL

3,1 mL	H <sub>2</sub> O
0,5 mL	30% Acrylamid Mix
1,3 mL	Tris-HCl, pH 8,8
0,05 mL	10% SDS
0,05 mL	APS
0,003 mL	TEMED

Vor dem Auftragen wurden jeweils 20-25 µg Protein mit 4x Proteinpuffer (der 4% beta-Mercaptoethanol enthält) für 5 min auf 100°C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte in einem Mini-PROTEAN® Vier Zell System. Dafür wurde das Gel zuerst für 30 Minuten bei 70 V angeschlossen. Die Spannung wurde im Anschluss auf 200 V erhöht, bis die Bande des Frontmarkers den unteren Rand des Gels erreicht hatte.

Zur Zuordnung der Molekulargewichte wurde neben den Proben ein Molekulargewichts-Marker aufgetragen.

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

Die Proteine wurden im Immunoblot (*Westernblot*) auf eine PVDF-Membran transferiert und fixiert. Dieser erfolgte in einem Tank-Blot System. Dazu wurden *Whatman*-Filterpapiere und eine PVDF-Membran auf die Größe des Gels zugeschnitten. Die Membran wurde für 1 min in Methanol äquilibriert, zusammen mit dem Filterpapier und zwei Schwämmen wurde sie anschließend in Transferpuffer getränkt. Die einzelnen



Komponenten wurden in folgender Reihenfolge zusammengesetzt: *Anode*; Schwamm – 2x Filterpapier – PVDF-Membran – SDS-Gel – 2x Filterpapier – Schwamm; *Kathode*.

Die Kammer wurde für eine Stunde an eine Stromstärke von 350 mA bei maximal 100 V angeschlossen.

<u>Transfer-Puffer</u>	48 mM	Tris-Base (pH 8,9-9,3)
	39 mM	Glycin
	20% (v/v)	Methanol

Die mit den Proteinen beladene PVDF-Membran wurde für 1 h bei RT in Block-Puffer (5% Magermilchpulver in TBST (w/v)) gelagert, um unspezifische Bindungen der Primärantikörper zu vermeiden.

### 3.3.10 Proteinnachweis mittels Antikörper

Der Proteinnachweis erfolgte mittels der in Tab. 2 aufgeführten Antikörper. Alle Antikörper wurden in 2,5% TBST-Milch wie folgt verdünnt:  $\alpha$ Y14 1:200;  $\alpha$ Evi-1 1:200;  $\alpha$ turboGFP 1:10.000;  $\alpha$ Gapdh 1:5.000. Sie inkubierten über Nacht bei 4°C. Im Anschluss wurden die Membranen dreimal in TBST (5 min, 5 min, 15 min bei RT) gewaschen. Die verwendeten sekundären Antikörper, die mit der Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert sind, sind ebenfalls in Tab. 2 aufgeführt. Die Verdünnung war abhängig vom eingesetzten primären Antikörper:  $\alpha$ Y14 1:1.000;  $\alpha$ Evi-1 1:1.000;  $\alpha$ turboGFP 1:5.000;  $\alpha$ Gapdh 1:5.000. Die Inkubation dauerte 4 Stunden bei 4°C. Nach erneutem dreimaligem Waschen in TBST wurde die Membran mit der Chemolumineszenzlösung *Super Signal West Dura* gleichmäßig benetzt. Die an die Sekundärantikörper gekoppelte HRP katalysiert die Umsetzung in Lumineszenz. Letztere wurde mit dem *Amersham Imager 600* und dazugehöriger Software (ImageQuant TL 8.1) detektiert und aufgenommen.

## 3.4 Klonierung und Plasmide

### 3.4.1 Transformation in chemisch kompetente Zellen

Für die Transformation wurden die chemisch kompetenten Zellen (XL1-blue, ein apathogener *Escherichia coli*-Stamm) auf Eis aufgetaut und mit 100 ng Plasmid-DNA vermischt. Dieses Gemisch wurde für 30 min auf Eis gelagert, bevor für 45 sec ein Hitzeschock bei 42°C erfolgte. Erneut wurden die Zellen für 2 min auf Eis gelagert, bevor sie auf LB-Agar-Platten ausgestrichen wurden. Diese LB-Agar-Platten waren mit 200

µg/mL Ampicillin und im Falle der TOPO-Vektoren zusätzlich mit 10 µg/mL Kanamycin versetzt.

### 3.4.2 Isolation von Plasmid-DNA

Für eine Minipräparation wurden angewachsene Klone von der jeweiligen Agarplatte ausgesucht und 2 mL LB-Medium (mit entsprechendem Antibiotikum, s.o.) mit denen beimpft. Diese wurden bei 37°C und 200 rpm geschüttelt und inkubiert. Zur Plasmidisolation wurde 1 mL Medium bei 4°C und 2.000 g für eine Minute zentrifugiert. Das Pellet wurde mittels des *NucleoBond® Xtra Mini-Kits* und dem Standardprotokoll behandelt.

Eine Maxipräparation mit 500 mL LB Medium (+200 µg/mL Ampicillin) wurde mit 100 µL aus dem Medium für eine Minipräparation angeimpft und unter gleichen Bedingungen inkubiert und am nächsten Tag abzentrifugiert. Die Plasmidpräparation erfolgte mit dem *NucleoBond® Xtra Maxi-Kit* und dem Standardprotokoll.

### 3.4.3 Glycerolstock

Für weitere Plasmidpräparationen wurden aus der Maxipräparation 750 µL LB-Medium entnommen, 250 µL Glycerol hinzugefügt und anschließend bei -80°C gelagert. Aus diesem wurden spätere Plasmidpräparationen angeimpft.

### 3.4.4 Verdau von DNA mittels Restriktionsenzymen und Gelextraktion

Zum DNA-Verdau wurden die angegebenen Enzyme und die von der Firma entsprechend angegebenen Puffer benutzt. 1 µg DNA wurde in 20 µL aufgenommen und mit 1 U Enzym versehen. Das Reaktionsgemisch wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend hitzeinaktiviert.

Nach dem Auftrennen durch Gelelektrophorese (siehe oben) wurden gewünschte DNA-Fragmente anhand der Länge identifiziert, ausgeschnitten und mittels *QIAquick PCR Purification-Kit* und dem Standardprotokoll aus dem Gel extrahiert.

### 3.4.5 TOPO-Kloning

Die ursprüngliche *RBM8A*-Sequenz wurde vom *I.M.A.G.E. Consortium* bezogen. Die Sequenz wurde mittels der Primer pmig\_RBM8A\_EcoI und pmig\_RBM8A\_XhoI und folgenden Protokoll amplifiziert (Zusammensetzung siehe Punkt 4.3.3):

5 min	95°C	
<u>30 sec</u>	<u>95°C</u>	
<u>30 sec</u>	<u>58°C</u>	
<u>40 sec</u>	<u>72°C</u>	<u>(30 x)</u>
4 min	72°C	
	4°C	

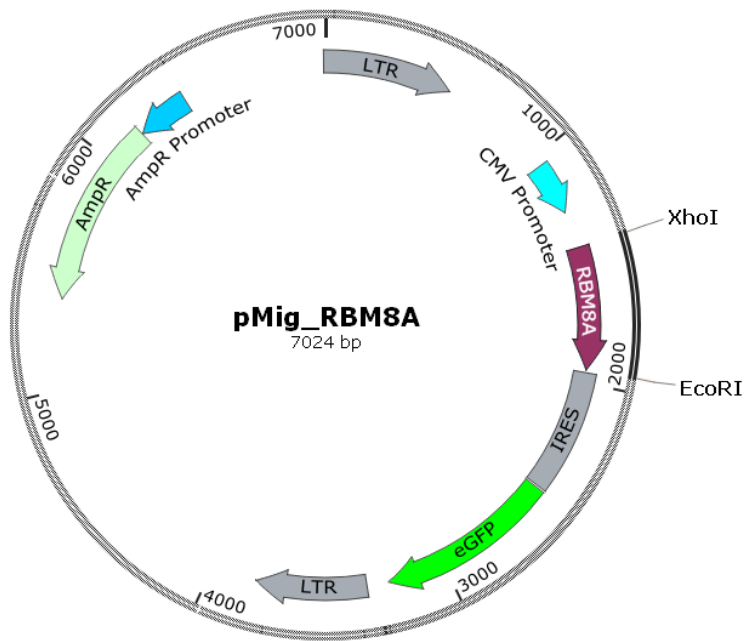
Das PCR-Produkt wurde im Anschluss mittels des TOPO-Cloning-Kits in den TOPO-Vektor kloniert, ligiert und in einer Minipräparation vermehrt. 1 µg Plasmid wurde mittels EcoRI verdaut und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Die amplifizierte und ausgeschnittene *RBM8A*-Sequenz wurde aus dem Gel geschnitten und extrahiert.

### 3.4.6 Plasmidkonstruktion

Die cDNA des humanen *RBM8A*-Gens wurde zur Herstellung eines Retrovirus in das pMig-Plasmid, basierend auf dem pMSCV-Plasmid (*murine stem cell virus*), kloniert. Dafür wurde zuerst der pMig-Leervektor mittels XhoI geschnitten und linearisiert. Anschließend wurde die über *TOPO-Cloning* amplifizierte *RBM8A*-Sequenz in den Vektor ligiert.

#### 3.4.6.1 Ligation und Transformation in pMig

Die Ligation des PCR-Produktes in den Zielvektor pMig erfolgte über eine vorherige Ligation im kommerziell erhältlichen TOPO-Vektor. Letztere erfolgte nach dem Standardprotokoll. Im Anschluss wurde die DNA mit der *RBM8A*-cDNA-Sequenz zusammen mit der linearisierten Plasmid-DNA in einem Verhältnis von 1:3 für 10 min mit Ligase versetzt. Hier wurde eine Unit T4-Ligase verwendet und über eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Ligase wurde anschließend mittels Hitze inaktiviert (10 min bei 65°C). Dann wurde das entstandene Plasmid in XL-blue-Bakterien transformiert.



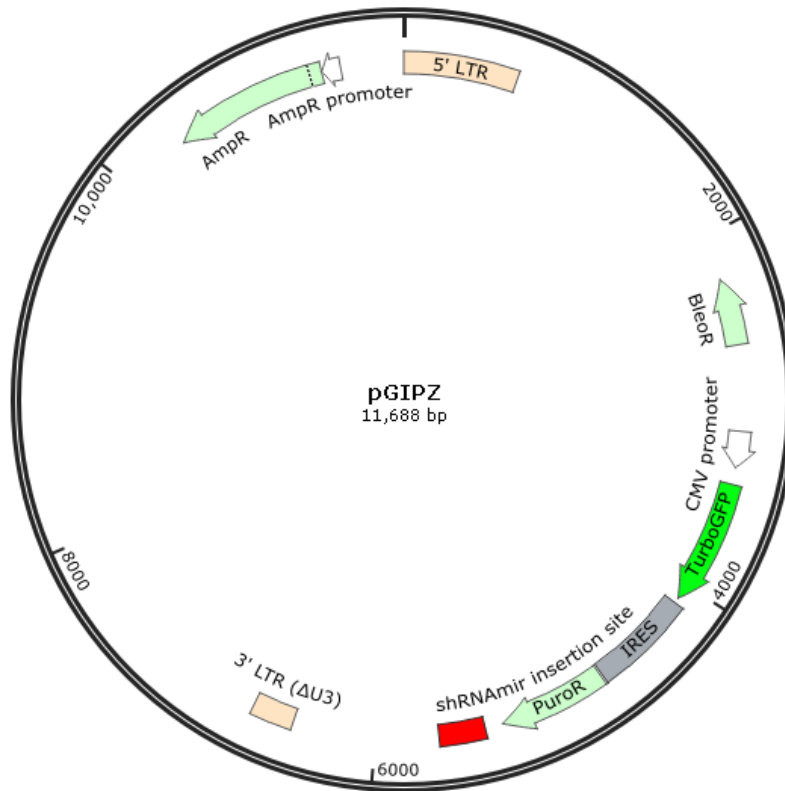
**Abbildung 5:** Gezeigt wird eine Plasmidkarte des pMig\_RBM8A Plasmides. Dargestellt sind zum einen die beiden Restriktionsstellen für die Enzyme XhoI und EcoRI, über die das „gene of interest“ in das Plasmid eingebracht wurde. Zum anderen sind der vorgeschaltete CMV-Promoter und die nachgeschaltete eGFP-Kassette (grün) dargestellt. Bei ca. 6.000bp liegt die gegenläufige Ampicillin-Resistenz mitsamt Promoter. Über diese Resistenz können Bakterien nach Aufnahme des Plasmides selektioniert werden.

### 3.4.7 Verwendete Plasmide

Folgende Plasmide wurden bei Anfertigung dieser Arbeit verwendet:

pMig_Leervektor	pMSCV-basiertes Vektorsystem Addgene, Cambridge, MA, USA
pMig_RanBP10	Harald Schulze
pMig_RBM8A	Hendrik Bösing
gGIPZ	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
pγ-gag/pol	Ute Modlich, Paul-Ehrlich-Institut, Langen, Deutschland
psPax2	Addgene, Cambridge, MA, USA
pVSV-G	Addgene, Cambridge, MA, USA

Das Plasmid pGIPZ ist ein shRNA tragendes Plasmid. Im Folgenden wurden insgesamt fünf verschiedene pGIPZ-Vektoren eingesetzt, die sich lediglich in der Sequenz ihrer shRNA unterscheiden (siehe Abschnitt 3.4.7.2) und daher stets als shRNA A, B, C, D oder Ktr bezeichnet werden.



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung des pGIPZ-Vektors. Auf der Karte sind alle wichtigen Kassetten, auf die im Folgenden eingegangen wird, markiert.

#### 3.4.7.1 Retrovirale Vektorkonstrukte für Überexpression

Zur ectopen Überexpression wurde das selbstkonstruierte Plasmid pMig\_RBM8A benutzt. Zur Produktion von  $\gamma$ -Retroviren wurde es zusammen mit den Plasmiden  $\gamma$ -gag/pol und pVSVG in 293T-Zellen transfiziert.

#### 3.4.7.2 Lentivirale Vektorkonstrukte mit *short hairpin* RNA

*Short hairpin RNA* (shRNA) kann dazu genutzt werden, zielgenau Transkripte innerhalb einer Zelle herunter zu regulieren. Das Verfahren basiert auf der RNA-Interferenz, die erstmalig von Fire und Mello im Jahr 1998 beschrieben wurde [73]: Kleine RNA-Moleküle in einer Größe von ca. 20-30 Basenpaaren nehmen Einfluss auf die Proteinbiosynthese, in dem sie mit der mRNA interferieren. Dieser Prozess kann ebenfalls von shRNA ausgehen. Die Kombination aus viraler Transduktion und Vektoren, die entsprechenden shRNA-Kassetten tragen, macht es möglich, stabil transfizierte Zellen zu generieren, die unter einem bestimmten Promoter die shRNA transkribieren und damit die mRNA eines Zielgenes herunterregulieren [74].

**Tabelle 5:** Angabe aller verwendeten shRNAs. Bei shRNA handelt es sich um eine *non-silencing*-Sequenz, A-D richten sich jeweils gegen das Transkript des Genes *RBM8A*. Sie liegen auf einem pGIPZ-Plasmid. Der Satz an Plasmiden wurde von ThermoScientific bezogen.

Name	Bestellnummer	anti-sense Sequenz
shRNA Ktr	RHS4346	TCTCGCTTGGGCGAGAGTAAGT
shRNA A	V2LHS_195463	ATCCTGTTTCGCCTGTCGAG
shRNA B	V3LHS_639039	CGTGTATGTCTTCTTCGGT
shRNA C	V3LHS_645425	TGAAGAGAACACCTGGACA
shRNA D	V3LHS_348802	TATTCTGCGAATTTGTCGT

In dieser Arbeit sind insgesamt fünf verschiedene kommerziell erworbene shRNAs eingesetzt worden. Vier davon richten sich gegen das humane Transkript des Genes *RBM8A*. Bei der Kontrolle handelt es sich um eine sogenannte *non-silencing*-Sequenz. Diese richtet sich gegen kein humanes Transkript. Alle shRNAs-Kassetten finden sich auf einem pGIPZ-Plasmid (siehe Abb. 6).

Abb. 7 zeigt die jeweilige Angriffsstelle der shRNA A-D im Transkript des Genes *RBM8A*.

```
[...] CTCGATCGAAGGCGAGATGGCGGACGTGCTAGATCTTCACGAGGCTGGGGGCGAAGATTTCCGCATGGAT
GAGGATGGGGACGAGAGCATTACAAACTGAAAGAAAAGCGAAGAAACGGAAGGGTCGCGGCTTTGGCTCCG
AAGAGGGGTCCCGAGCGCGGATGCGTGAGGATTATGACAGCGTGGAGCAGGATGGCGATGAACCCGGACCACA
ACGCTCTGTTGAAGGCTGGATTCTCTTTGTAAGTGGAGTCCATGAGGAAGCCACCGAAGAAGACATACACGAC
AAATTCGCAGAATA TGGGGAAATTA AAAACATTCATCTCAACCTCGACAGGCGAACAGGATATCTGAAGGGGT
ATACTCTAGTTGAATATGAAACATACAAGGAAGCCAGGCTGCTATGGAGGGACTCAATGGCCAGGATTTGAT
GGGACAGCCCATCAGCGTTGACTGGTGT TTTGTTTCGGGGTCCACAAAAGGCAAGAGGAGAGGTGGCCGAAGA
CGCAGCAGAAGTCCAGACCCGAGACGTCGCTGACAGGTCCTCTGT TGTCCAGGTGTTCTCTTCAAGATTC [...]
```

**Abbildung 7:** In Rot ist die Bindestelle der shRNA A, in Gelb der shRNA B, in Grün der shRNA C, in Blau der shRNA D markiert. Der translatierende Bereich wird durch die fett gedruckten Basen angezeigt. Die unterstrichenen Basen zeigen den Bereich, der bei der qPCR amplifiziert wird.

## 3.5 Zellkultur

### 3.5.1 Verwendete Zelllinien

K562 (Klon ACC-10, DSMZ, Braunschweig (Deutschland))

Diese Zelllinie ist anhand des Pleurapunktates einer 53-jährigen Frau etabliert worden. Zu diesem Zeitpunkt befand sie sich in einer Blastenkrise bei chronisch myeloischer Leukämie. Die Zellen besitzen erythroide Eigenschaften, unter anderem exprimieren sie das Oberflächenantigen CD235a. Kultiviert werden die Zellen in RPMI Medium mit 10% FCS und 1% Penicillin und Streptomycin.

### HEK 239T (Klon ACC-635, DSMZ, Braunschweig (Deutschland))

Es handelt sich um den Subklon eines primären humanen Nierenzelltumors mit dem largeT-Antigen zur Immobilisierung. Diese Zellen werden im Folgenden vor allem als Produktionszelllinie für lentivirale Vektoren genutzt. Kultiviert werden die Zellen in DMEM mit 10% FCS und 1% Penicillin und Streptomycin.

### HeLa (Klon ACC-57, DSMZ, Braunschweig (Deutschland))

Die HeLa-Zellen entstammen einem Zervixkarzinom einer 31-jährigen Patientin. Kultiviert werden die Zellen in DMEM mit 10% FCS und 1% Penicillin und Streptomycin.

Alle Arbeiten der Zellkultur erfolgten in Räumlichkeiten mit der genetischen Sicherheitsstufe 2. Die Kultivierungsmedien der einzelnen Zelllinien sind oben beschrieben, alle werden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert. Genau definierte Zellzahlen sind mit der Neubauer-Kammer bestimmt worden.

#### **3.5.2 Differenzierung der K562-Zellen**

K562-Zellen besitzen ein gewisses Potential, sich unter Zugabe von Chemikalien in andere Zellreihen zu differenzieren. Dafür wurden sie unter den oben genannten Bedingungen kultiviert. An Tag 0 wurden jeweils  $2,5 \times 10^5$  Zellen pro mL mit 100 nM TPA, 10 nM Staurosporin und 1,5% DMSO (v/v) für 3 Tage kultiviert. Unter Zugabe von TPA und Staurosporin differenzieren sie in die megakaryozytäre, unter DMSO in die erythrozytäre Richtung [75-77]. Alle Chemikalien sind in DMSO gelöst, daher wird die Kontrolle ebenfalls mit 0,1% DMSO (v/v) versetzt. An Tag 3 erfolgten die Auswertungen. Die transduzierten K562-Zellen wurden unter Zusatz von 50 µg/mL Puromycin differenziert.

#### **3.5.3 Transfektion von adhärenenten 293T-Zellen**

Die Transfektionen wurden mit dem Reagenz *turboFect* durchgeführt. Hierzu wurden an Tag eins für ein Loch einer 6-Loch-Platte  $2 \times 10^5$  293T-Zellen ausgesät. An Tag 2 wurden 3 µg Plasmid mit 3 µL turboFect in 200 µL serumfreiem Medium gemischt. Nach 20 min Inkubationszeit wurde das Gemisch auf die Zellen gegeben. Nach 4 h wurde das Medium gewechselt.

##### 3.5.3.1 Virusproduktion

Zur Virusproduktion wurde die Produktionszelllinie (HEK 293T) mit verschiedenen Plasmiden co-transfiziert. Dazu wurden an Tag 1  $5 \times 10^6$  Zellen in einer 10cm-Schale

ausgesät und am nächsten Tag das Medium gewechselt (DMEM mit 2% FCS und 1% Penicillin und Streptomycin, 25µM Chloroquin).

Die Plasmide wurden in folgender Menge mit 250 µL Wasser vermischt: 12 µg pGIPZ, 12 µg psPAX2, 9 µg pVSVG oder 12 µg pMig\_RBM8A, 12 µg py-gag/pol und 9 µg pVSVG. Dazu wurden weitere 250 µL Wasser zu 99 µg Polyethylenimin gegeben, gemischt und 20 min ruhen gelassen. Dieses Gemisch wurde eine Stunde nach dem oben beschriebenen Mediumwechsel gleichmäßig auf die Zellen getropft. Nach fünfstündiger Inkubationszeit wurde erneut das Medium gewechselt.

Zur Virusernte wurde der Überstand an Tag 4 nach 48 h abgenommen, durch einen 0,22 µm-Filter gegeben und aliquotiert. Wichtig ist hierbei, dass keine Nitrozellulosefilter benutzt wurden, da diese Oberflächenproteine von Lentiviren binden und sie damit zerstören können. Zur Verbesserung der Titer ist *der Lenti-X Concentrator* der Firma Takara eingesetzt worden. Dazu wurde im Anschluss an die Virusernte ein Teil des *Concentrators* auf drei Teile aufgereinigten Zellkulturüberstand gegeben und gut gemischt über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch bei 1500 g für 45 min unter 4°C zentrifugiert und das entstandene Pellet in 150 µL StemSpan-Medium aufgenommen. Der aufkonzentrierte Zellkulturüberstand kann unverzüglich zur Transduktion verwendet oder bei -80°C gelagert werden.

#### **3.5.4 Virale Transduktion von Zelllinien**

Am Abend vor der geplanten Transfektion werden im 12-Loch-Format  $5 \times 10^5$  Zellen ausgesät. Am nächsten Tag werden 25 µL konzentrierter Zellkulturüberstand in 475 µL Medium mit Polybrene (10 µg/mL) aufgenommen. Im Anschluss wird eine sogenannte *Spinoculation* durchgeführt, bei der die 12-Loch-Platte für 90 min bei 4°C und 800 g zentrifugiert wird. Am nächsten Tag werden die Zellen mit PBS gewaschen und mit neuem Medium versehen.

#### **3.5.5 Puromycin-Selektion**

Puromycin ist ein Nukleosid-Antibiotikum, welches für alle Säuger toxisch ist. Innerhalb der Zellkultur nutzt man diesen Effekt, der auf Termination der Translation und auf einer Inhibierung des Proteintransportes in die Mitochondrien beruht. Da bei der Transduktion der shRNAs ebenfalls eine Puromycin-Resistenz-Kassette transduziert wird, können erfolgreich transduzierte Zellen selektioniert werden. Die Selektion mittels Puromycin



wurde frühestens an Tag 3 nach Transduktion mit max. 10 µg/mL gestartet. Auf abweichende Konzentrationen wird in den entsprechenden Abschnitten hingewiesen.

### **3.5.6 Herkunft der CD34+-Zellen**

Die CD34+-Zellen wurden aus der Abteilung für Stammzelltransplantation der Kinderklinik-Universitätsklinik Würzburg bezogen. Die Zellen stammten von anonymisierten, gesunden Stammzellspendern, die entweder nur teilweise oder aus klinischen Gründen gar nicht verwendet wurden. Sie sind stets nach vorheriger medikamentöser Mobilisierung aus dem peripheren Blut entnommen worden. Zur Lagerung wurden sie aufgereinigt, aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

### **3.5.7 Protokoll zur Differenzierung von CD34+-Zellen**

Die Differenzierung der CD34+-Zellen zu Proplättchen-bildenden MKs erfolgt nach dem Protokoll von Strassel *et al.* [78]. Hier werden die CD34+-Zellen in einer 24-Loch-Platte mit einer Dichte von  $4 \times 10^5$  Zellen pro mL ausgesät. Das Medium ist serumfreies StemSpan und wird mit einfach konzentriertem CC220 und 1 µM StemRegenin1 versetzt. CC220 enthält ein Gemisch aus verschiedenen Zytokinen (Stammzell-Faktor, THPO, IL-6 und IL-9). StemRegenin1 ist ein Antagonist des Aryl-Hydrocarbon-Rezeptors, der die Selbsterneuerung und Proliferation von CD34+ aus peripherem Blut unterstützt [79, 80]. Anschließend werden die Zellen über die Dauer von sieben Tagen kultiviert. Im Protokoll von Strassel *et al.* wird gezeigt, dass die so kultivierten CD34+-Zellen deutlich mehr Thrombozyten bilden und diese mit natürlichen Thrombozyten vergleichbar sind.

## **3.6 Durchflusszytometrische Untersuchungen am BD FACS Cantoll**

Mittels der durchflusszytometrischen Untersuchung können verschiedene Eigenschaften von Zellen untersucht werden. Die Zellen werden einzeln durch Laserstrahlen geführt. Aus dem entstehenden Streulicht können Rückschlüsse auf die Größe (im Vorwärtsscatter) und Granularität (im Seitwärtsscatter) gezogen werden. Zudem lassen sich Oberflächenantigene mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper anfärben. Die Emission der entsprechenden Fluorophore kann genauso gemessen werden wie die Emission einer GFP-Expression.

### **3.6.1 Allgemeines**

Alle durchflusszytometrisch untersuchten Zellen werden als doppelt gewaschenes Pellet in einen sogenannten FACS-Puffer aufgenommen.

FACS-Puffer: 0,5% (w/v) BSA in PBS (pH 7,2)

### 3.6.2 Färbung

Des Weiteren können exprimierte Oberflächenantigene mittels markierter Antikörper gefärbt und gemessen werden. Zur Markierung mit den Antikörpern werden die gewaschenen Zellpellets ( $5 \times 10^5$ ) in 100  $\mu\text{L}$  5% (w/v) BSA (in PBS) mit 2% des jeweiligen Antiköpers für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Reaktion wird anschließend mit 500  $\mu\text{L}$  FACS-Puffer abgestoppt und die Messung durchgeführt.

### 3.6.3 AnnexinV-Test

AnnexinV gehört zu einer Protein-Familie, die sich abhängig von der Calcium-Konzentration an Lipide in der Zellmembran binden. AnnexinV bindet sich an Phosphatidylserin. Dieses Phospholipid ist bei vitalen Zellen ausschließlich an der intrazellulären Zellmembran zu finden. Geht eine Zelle in die Apoptose, kommt es zu einem sogenannten *membrane-flipping* – Phosphatidylserin ist dann auch auf der extrazellulären Seite der Zellmembran zu finden. AnnexinV bindet nun an dieses Lipid auf den entsprechenden Zellen. Da das AnnexinV mit einem Fluorochrom gekoppelt ist, kann diese Bindung im Durchflusszytometer nachgewiesen werden. Im späteren Verlauf der Apoptose verliert die Zellmembran ihre Integrität. Das dazugegebene 7-AAD kann die Zellmembran nun überwinden und interkaliert mit der DNA. Zellen in der frühen Apoptose sind demnach lediglich positiv für eine Bindung durch AnnexinV. In der späteren Apoptose sind die Zellen zudem 7-AAD positiv.

Die Färbung erfolgt mittels des *APC AnnexinV Apoptosis Detection Kit* und dem mitgelieferten Protokoll.

### 3.6.4 Auswertung

Die Auswertung aller Daten und die Erstellung der Abb. erfolgen mit dem Programm *FlowJo*, Version 10.

## 3.7 May-Grünwald-Färbung

### 3.7.1 Zytospin

$2 \times 10^4$  Zellen werden nach einmaligem Waschen mit PBS bei 500 rpm in einer Zentrifuge auf mit L-Polylysin beschichtete Objektträger zentrifugiert. Diese trocknen vor der Färbung abgedunkelt über 12 Stunden.

### **3.7.2 May-Grünwald-Färbung**

Ein Tropfen der May-Grünwald-Färbelösung wurde auf den Zellspot gegeben. Nach einer Minute wurde ein Tropfen PBS hinzugefügt. Die Einwirkzeit betrug drei weitere Minuten in einer feuchten und abgedunkelten Kammer, bevor die Färbelösung mit PBS abgespült wurde. Der Objektträger wurde parallel zur Färbung fixiert, da die Lösung einen hohen Methanolgehalt hat.

### **3.7.3 Aufnahmen**

Die Aufnahmen erfolgten mit dem Evos-XL-Mikroskop.

## **3.8 Immunfluoreszenzfärbungen und Laserscanning-Immunfluoreszenzmikroskopie**

### **3.8.1 Färbung**

Die Zellen wurden ebenfalls wie oben angegeben (siehe 3.7.1) mit einer Zytocentrifuge auf einen Objektträger zentrifugiert. Nach der Fixierung und Permeabilisierung mit 4% Formalin und 0,1% Triton X100 in PBS für 20 Minuten bei 4°C werden die Zellen mit 10% Ziegenserum (v/v) in PBS geblockt. Dies geschieht bei Raumtemperatur für 20 Minuten. Anschließend wird der erste Primär-Antikörper hinzugegeben (1%  $\alpha$ -Y14 in Waschpuffer). Nach einer Inkubation von 45 min bei Raumtemperatur wird der Objektträger dreimal mit Waschpuffer (PBS mit 5% FCS und 1% Tween20 jeweils (v/v)) gewaschen. Anschließend wird ein direkt markierter sekundärer Antikörper (1:200 in Waschpuffer) hinzugegeben. Nach erneutem Waschen kann die Färbung mit primären und sekundären Antikörpern wiederholt werden. Direkt markierte Antikörper werden in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt und ebenfalls bei Raumtemperatur 20 min auf dem Objektträger gelassen. Alle Schritte finden in einer feuchten und lichtgeschützten Kammer statt. Im letzten Schritt werden die Zellen mit einem DAPI-haltigen Deckmedium eingedeckt. Nach Trocknung über Nacht bei 4°C können die Zellen unter dem Laserscanning-Immunfluoreszenzmikroskop (LSM) untersucht werden.

### **3.8.2 Aufnahme**

Die Bilder werden mit einem TCS SP8 Confocal Mikroskop von Leica unter Benutzung einer 200- oder 600-fachen Vergrößerung, letztere unter Zuhilfenahme einer Ölimmersion, aufgenommen. Gesteuert wird das Mikroskop mit der LASX-Software von Leica. Im Anschluss werden die Bilder mit dem Programm Fiji bearbeitet.

### 3.9 Verwendete Software

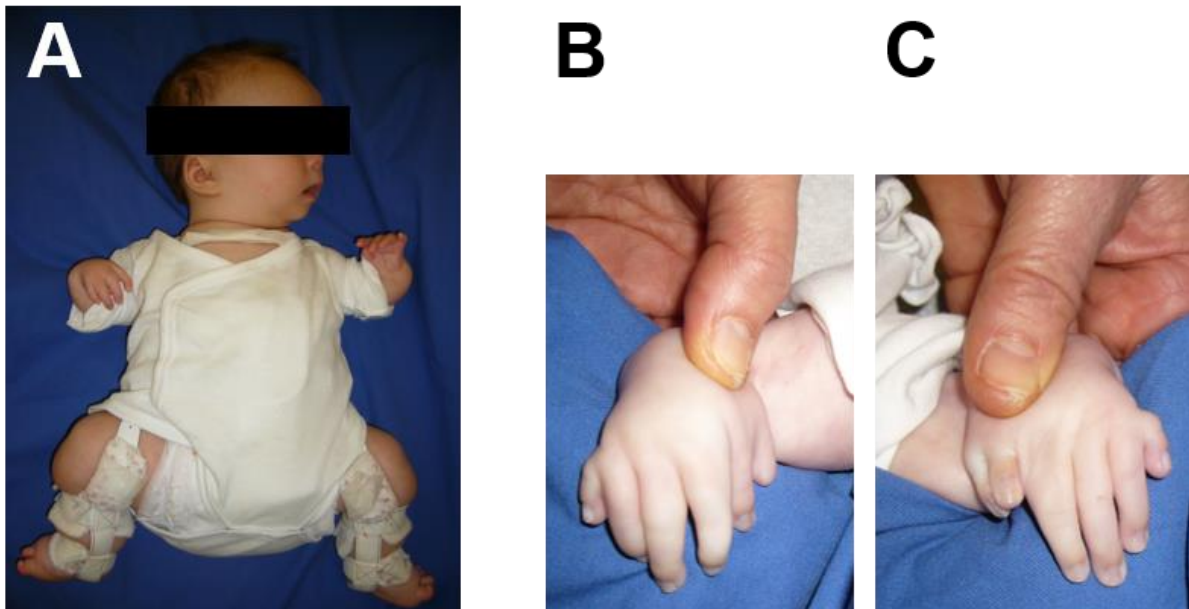
FlowJo, Version 10	FlowJo LLC, Ashland, OR, USA
Graph Pad Prism, Version 7	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
Fiji, Image J, Version 1.51	Wayne Rasband
ImageQuant TL 8.1	GEHealthcare GmbH, Freiburg, Deutschland
LasX Software	Leica, Wetzlar, Deutschland
Office 2016 (Word/Excel/PowerPoint)	Microsoft, Remond, Washington, USA
Photoshop CS6	Adobe Systems, San José, CA, USA
Snap Gene, Version 3.3	GSL Biotech LLC, Chicago, IL, USA
7500 v.2.0.1	Applied Biosystems, Forster City, CA, USA

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Patienten

Insgesamt wurden in den letzten Jahren 49 TAR-Patienten von unserer Arbeitsgruppe betreut. Im Bearbeitungszeitraum dieser Arbeit sind acht neue Fälle von Menschen mit TAR-Syndrom hinzugekommen. Im folgenden Abschnitt werden zwei dieser acht Fälle exemplarisch vorgestellt.

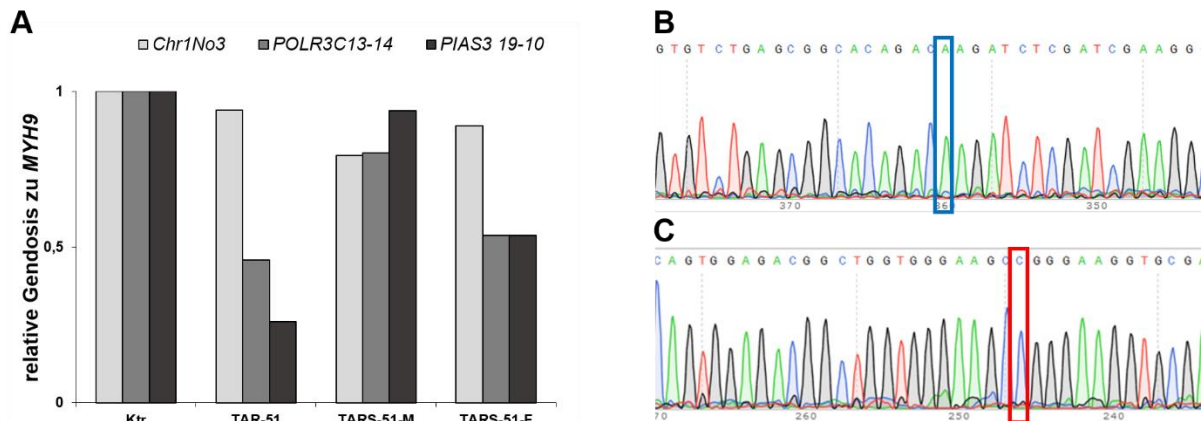
#### 4.1.1 Diagnose des TAR-Syndroms



**Abbildung 8:** In **A** ist Patientin TARS-52 zu sehen. Zu erkennen sind die verkürzten Arme mit Klumphandstellung und die Schienung der Hüfte bei Hüftdysplasie. In **B** und **C** sind die Hände (rechte Hand in **B**, linke Hand in **C**) von TARS-51 gezeigt. Hier ist an beiden Händen ein sechster Strahl zu erkennen (Hexadaktylie). Weiterhin sind die verkürzten Unterarme zu erkennen.

Wie oben beschrieben ist das klinische Erscheinungsbild des TAR-Syndroms abseits der Thrombozytopenie und der fehlenden Radianlage sehr variabel. In Abb. 8A wird ein betroffenes Mädchen und die Hände eines anderen gezeigt. TARS-51 (Abb. 8B und 8C) zeigt eine Hexadaktylie an beiden Händen. Diese Fehlbildung wurde bisher in der Literatur bei keinem Fall beschrieben. TARS-52 zeigt abseits der häufig beschriebenen Hüftdysplasie und weiteren Fehlbildungen der oberen Extremität keine zusätzlichen Fehlbildungen. Bei TARS-52 wurde aufgrund der verkürzten oberen Extremität mit fehlender Radianlage bereits intrauterin der konkrete Verdacht auf das Vorliegen eines TAR-Syndroms geäußert. Dieser konnte postnatal bestätigt werden. Neben der klinischen Diagnose wird stets auch eine genetische Diagnose zur Bestätigung eines TAR-Syndroms durchgeführt. Die Mikrodeletion wird mittels qPCR, der SNP mittels

Sanger-Sequenzierung nachgewiesen. Bei beiden oben beschriebenen Patientinnen wurde die Mikrodeletion mit einer paternalen Vererbung nachgewiesen, Abb. 9A zeigt dies beispielhaft an TARS-51. TARS-52 ist hemizygot für den 5'UTR-SNP, TARS-51 hemizygot für den Intron 1-SNP (siehe Abb. 9B, C). Der SNP ist jeweils von der heterozygoten Mutter vererbt worden.



**Abbildung 9:** Darstellung der Diagnostik von Mikrodeletion und SNP bei Menschen mit TAR-Syndrom. **A** zeigt das Ergebnis einer Mikrodeletionsanalyse mittels qPCR am Beispiel von TARS-51 und ihren Eltern. Die Gene POLR3C und PIAS3 liegen innerhalb der beschriebenen Mikrodeletion und weisen daher eine halbierte Gendosis im Vergleich zu MYH9 normiert zu Kontrolle 1 auf. MYH9 liegt auf Chromosom 22 (NC\_000022.11). Chr1No3 liegt auf Chromosom 1 außerhalb des Deletionsbereiches. In **B** ist die 5'UTR-Sequenz des Gens RBM8A gezeigt. Der SNP (G→A) ist blau markiert (TARS-52). Unten (**C**) ist die Intron-Sequenz desselben Gens von TARS-51 abgebildet. Der SNP (G→C) ist rot markiert.

Neben den skeletalen Fehlbildungen sind die Veränderungen des Blutbildes eine typische Auffälligkeit aller Patienten. Neben der namensgebenden Thrombozytopenie kommt es häufig zu Anämien und unmittelbar postnatal zu Veränderungen des weißen Blutbildes (siehe 2.2.1). Bei den beiden hier beschriebenen Fällen ist auffällig, dass TARS-51 bereits im Alter von drei Monaten eine normwertige Thrombozytenzahl entwickelte und keine Anämie beobachtet wurde. Die Eltern gaben an, dass auch bisher bei allen Kontrollen, die außerhalb unserer Betreuung stattgefunden haben, die untersuchten Werte im Normbereich lagen und entsprechend nicht erneut kontrolliert wurden. TARS-52 hingegen war zu Geburt deutlich thrombozytopen (<30 /nL). Des Weiteren hat sie postnatal aufgrund eines niedrigen Gesamthämoglobins ein Erythrozytenkonzentrat erhalten. Die klassische Leukozytose wird ebenfalls beschrieben. Zusammenfassend fällt auf, dass TARS-52 im Gegensatz zu TARS-51 das volle Bild der hämatologischen Komplikationen verschiedener Zellreihen zeigt.

In der Literatur und auch in unserer Kohorte gibt es Beispiele, bei denen die Thrombozytopenie nur sehr leicht ausgeprägt ist und sich die Thrombozytenzahlen einzelner Patienten stets am unteren Normwert bewegen [18, 24].

Fiedler teilte die von uns betreuten Patienten vor der Erstbeschreibung der SNPs anhand von Mustern innerhalb der Entwicklung der Thrombozytenwerte in drei Gruppen ein. Die erste Gruppe umfasst Patienten, bei denen sich die Thrombozytenwerte im Laufe der Zeit erholen, ähnlich des bereits in der Literatur mehrfach beschriebenen Effekts. Sie identifizierte jedoch auch Patienten, die über einen langen Beobachtungszeitraum thrombozytopen blieben (Muster B) und Patienten, die keine manifeste Thrombozytopenie aufwiesen (Muster C). Muster B konnten fünf Patienten zugeordnet werden, die alle den beschriebenen 5'UTR-SNP aufweisen. In Muster C lassen sich drei Patienten einordnen, zwei davon tragen den Intron 1-SNP.

Dies ist ein Hinweis darauf, dass sich die Patienten mit unterschiedlichen SNPs in einzelnen Eigenschaften, hier im Thrombozytenverlauf, unterscheiden. Des Weiteren befinden sich drei Patienten (TARS-01, 25 und 26) in unserer Kohorte, bei denen die Diagnose TAR-Syndrom an mindestens einem Zeitpunkt aufgrund fehlender manifester Thrombozytopenien ausgeschlossen wurde. Alle drei Patienten tragen den intronischen SNP.

Aufgrund dessen haben wir die Patienten in unserer Kohorte auf mögliche Unterschiede innerhalb der gemessenen Blutwerte untersucht, welche die rote Reihe, die weiße Reihe, sowie die Thrombozyten betreffen.

#### **4.1.2 Veränderungen des Blutbildes bei TAR-Patienten**

Elf der 49 Patienten erfüllen die Einschlusskriterien (Diagnose des 5'UTR- oder des Intron-SNP und mindestens ein registrierter Thrombozytenwert) nicht. Es wurden alle exakt angegebenen Blutwerte in die Analyse eingeschlossen, ebenfalls solche aus Arztbriefen oder Dokumentationen anderer Behandlungsplätze. Die in Tab. 6 beschriebene Kohorte umfasst 38 Patienten.

**Tabelle 6:** alle Patienten der beschriebenen Kohorte mit dem jeweiligen Alter in Jahren (in Monaten, wenn gekennzeichnet) bei der letzten Visitation mit Blutentnahme und dem Geschlecht (M: männlich, W: weiblich). Zudem sind neben der Genetik die Anzahl der erhobenen Thrombozyten-, Hämoglobin und Leukozytenwerte angegeben (\*: max. ein Wert in drei Monaten, \*\*: täglich ein Wert in den ersten zwei Lebenswochen, danach monatlich ein Wert bis zum dritten Lebensjahr). Hinzu kommt ein Verweis auf die Publikation mit der Erstbeschreibung des Patienten. Die Nummer entspricht der Pseudonummerierung der jeweiligen Publikation (Klopocki [28], Ballmaier [81], Wannack [29], Fiedler [24]).

TARS-#	Alter [Jahre/Monate]	Geschlecht	SNP	Mikrodeletions-Vererbung	Anzahl Thrombozyten-Werte*	Anzahl Hämoglobin-Werte*	Anzahl Leukozyten-Werte**	Erstbeschreibung und jeweilige anonyme Zuordnung
45	9 M.	M	5'UTR	Unbekannt	2			Neu
46	17 M.	W	5'UTR	Paternal	2	1	1	Neu
47	43	M	5'UTR	Unbekannt	3	3		Neu
48	26	W	5'UTR	Unbekannt	1	1		Neu
50	0	W	5'UTR	Unbekannt	1		1	Neu
51	3 M.	W	Intron	Paternal	1	1	1	Neu
52	1 M.	W	5'UTR	Paternal	1	1	2	Neu
53	6 M.	M	5'UTR	Unbekannt	3	3	1	Neu
01	29	W	Intron	Maternal	3	3		Klopocki (#01)
02	21	W	Intron	Maternal	2	2		Klopocki (#02)
03	21	W	5'UTR	Maternal	5	2	1	Ballmaier (#5)
04	0	W	5'UTR	Maternal	1			Klopocki (#04)
10	9	W	5'UTR	Paternal	17	16	5	Ballmaier (#1)
11	16	W	5'UTR	De novo	16	16	11	Ballmaier (#2)
12	3	M	5'UTR	De novo	9	2		Klopocki (#04)
13	0	M	Intron	De novo	1			Klopocki (#05)
14	10 M.	M	5'UTR	De novo	3		2	Ballmaier (#3)
15	26	M	Intron	De novo	1	1		Klopocki (#15)
17	15 M.	W	5'UTR	Maternal	3		3	Ballmaier (#4)
19	18	W	Intron	Unbekannt	3	2		Wannack (#104)
20	29	W	Intron	Maternal	1			Klopocki (#20)
25	26	M	Intron	Maternal	7	4	2	Klopocki (#25)
26	22	M	Intron	Maternal	7	4		Klopocki (#26)
27	33	W	Intron	Maternal	9	1		Klopocki (#27)
31	19	M	Intron	Maternal	2	1	1	Wannack (#05)
32	15	W	Intron	Paternal	4	5	9	Wannack (#32)
34	19	W	5'UTR	Paternal	1	1		Wannack (#34)
35	39	M	5'UTR	De novo	11	10		Wannack (#35)
36	2	M	5'UTR	Maternal	8	3	9	Wannack (#36)
37	37	W	5'UTR	Unbekannt	2	2		Wannack (#37)
38	1 M.	W	Intron	De novo	1	1	1	Fiedler (#38)
39	3	W	5'UTR	Paternal	3	3	9	Fiedler (#39)



40	8	M	5'UTR	De novo	2	1		Fiedler (#40)
41	15 M.	M	5'UTR	Maternal	5	5	5	Fiedler (#41)
42	6	M	5'UTR	Unbekannt	11	12	14	Fiedler (#42)
43	3	W	5'UTR	Unbekannt	9	9	15	Fiedler (#43)
44	17	W	5'UTR	Unbekannt	14	13		Fiedler (#44)
60	8 M.	W	Intron	Unbekannt	1	1	1	Fiedler (#51)

Die aufgewiesenen Blutwerte entstammen den von uns geführten Patientenakten. Hier sind sowohl Messungen anderer Ärzte, als auch Messungen, die während unserer Betreuung entstanden sind, hinterlegt. Bei der Erfassung wurde darauf geachtet, dass sowohl für Thrombozyten, als auch für Werte der roten Reihe maximal ein Befund aus drei Monaten in die Analyse aufgenommen wird. Zudem sind keine Werte eingeflossen, die durch vorherige Transfusionen beeinflusst worden sind, soweit dies aus den Akten zu entnehmen war. Dies soll den Einfluss einzelner Episoden, zum Beispiel Krankenhausaufenthalte, bei denen täglich Blut entnommen wurde, verringern. Bei vielen Patienten wurde das Blutbild regelmäßig beschwerdeunabhängig kontrolliert.

Für die Leukozyten sind, soweit verfügbar, tägliche Werte für die ersten zwei Lebenswochen in die Analyse eingeflossen. Dies ist mit der bereits beschriebenen Leukozytose nach Geburt begründet. Anschließend ist monatlich ein Wert für die ersten zwei Lebensjahre eingeflossen. Tab. 6 gibt über alle Patienten unter anderem Auskunft über das Alter bei der letztmaligen ärztlichen Vorstellung, den SNP und die Anzahl der erhobenen Werte nach dem oben beschriebenen Prozedere.

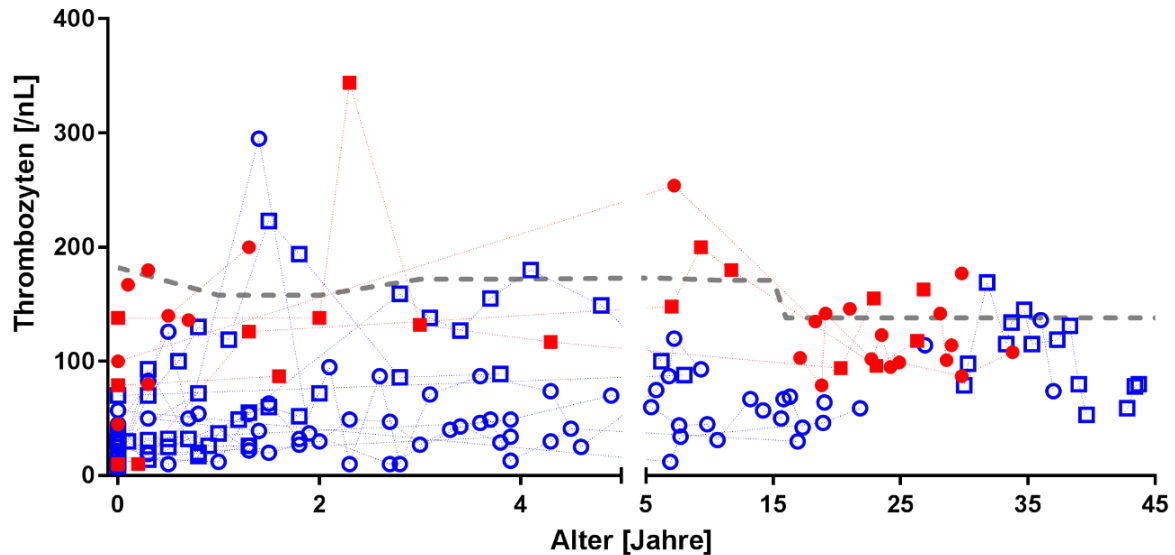
Tab. 7 zeigt eine Übersicht über die beschriebene Kohorte. Das Verhältnis der verschiedenen SNPs unterscheidet sich mit einem Verhältnis von 1,7 (5'UTR) zu 1 (Intron 1) von dem publizierten Verhältnis von 3,4 zu 1 [31]. Das Verhältnis der Geschlechter ist zu Gunsten der Frauen mit 1,5 zu 1 verschoben. Innerhalb der beiden Gruppen ist das Geschlechterverhältnis vergleichbar. Durchschnittlich sind die Patienten in der 5'UTR-Kohorte elf Jahre alt, der Median liegt bei drei Jahren. Die anderen Patienten sind bei einer kleineren Spannweite im Durchschnitt gut vier Jahre älter und auch der Median liegt höher.

**Tabelle 7:** Übersicht über die untersuchte Kohorte nach nachgewiesenem SNP, getrennt nach Geschlecht und Alter bei der letztmaligen Vorstellung mit Blutentnahme.

	5'UTR	Intron 1
<b>Anzahl</b>	24	14
<b>Ratio weiblich : männlich</b>	14 : 10	9 : 5
<b>Durchschnittsalter</b>	11	15,1
<b>Median</b>	3	19
<b>Umfang in Jahren</b>	0 – 43	0 – 33

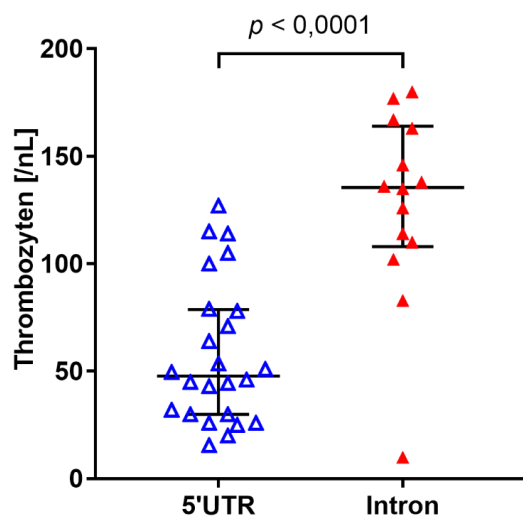
#### 4.1.2.1 Thrombozyten

Im nächsten Schritt sind alle nach dem oben beschriebenen Verfahren erhobenen Thrombozytenzahlen pro nL dargestellt. In Abb. 10 sind alle Patienten mit Intron 1-SNP in rot dargestellt, Patienten mit 5'UTR-SNP in blau. Auf den ersten Blick fällt auf, dass es insgesamt nur drei Thrombozytenwerte unterhalb von 80 /nL gibt, die in rot dargestellt sind. Diese sind jeweils der erste gemessene Wert von Patienten (TARS-13, 25, 32), die sich im späteren Verlauf von den Thrombozytopenien erholen (TARS-25 und 32). Dieser Vorgang passiert innerhalb der ersten beiden Lebensjahre, TARS-32 erreicht mit einem halben Jahr Thrombozytenwerte um 140 /nL. Von TARS-13 ist der postnatale der einzige dokumentierte Wert. Viele Patienten mit Intron 1-SNP zeigen bei Geburt oder im Alter von wenigen Monaten bereits Thrombozytenwerte von über 100 /nL, teilweise sogar im unteren Normbereich (TARS-19, 26, 38, 51 und 60). Diese Beobachtung steht im klaren Gegensatz zu der anderen Gruppe von Patienten. Hier findet sich bei 19 Patienten kein einziger Wert, der oberhalb von 100 Thrombozyten pro nL liegt. Des Weiteren gibt es einige Patienten, deren Thrombozytopenie sich nicht, wie oben beschrieben, innerhalb der ersten Lebensjahre erholt, sondern die auch weit danach noch thrombozytopenie Werte aufweisen.



**Abbildung 10:** Thrombozytenverläufe der Patienten aus unserer Kohorte. Die grau gestrichelte Linie markiert den unteren Normwert, der in Abhängigkeit vom Alter leicht schwankt. In blau sind Messwerte von Patienten mit nachgewiesenem 5'UTR-SNP dargestellt, in rot von Patienten mit Intron-SNP. Kreise stellen das weibliche Geschlecht, Quadrate das männliche Geschlecht dar.

Um einen besseren Vergleich der beiden Gruppen anzustreben, wurde jedem Patienten im nächsten Schritt ein sogenannter repräsentativer Thrombozytenwert zugeteilt. Dieser ist der Median aus allen (nach den oben bereits beschriebenen Kriterien) ausgewählten Thrombozytenwerten. Der Median wird aufgrund seiner relativen Robustheit gegenüber Ausreißern im Vergleich zum Mittelwert bevorzugt. Dieser so erstellte repräsentative Thrombozytenwert ist in Abb. 11 den beiden SNP zugeteilt und gegeneinander darstellt.

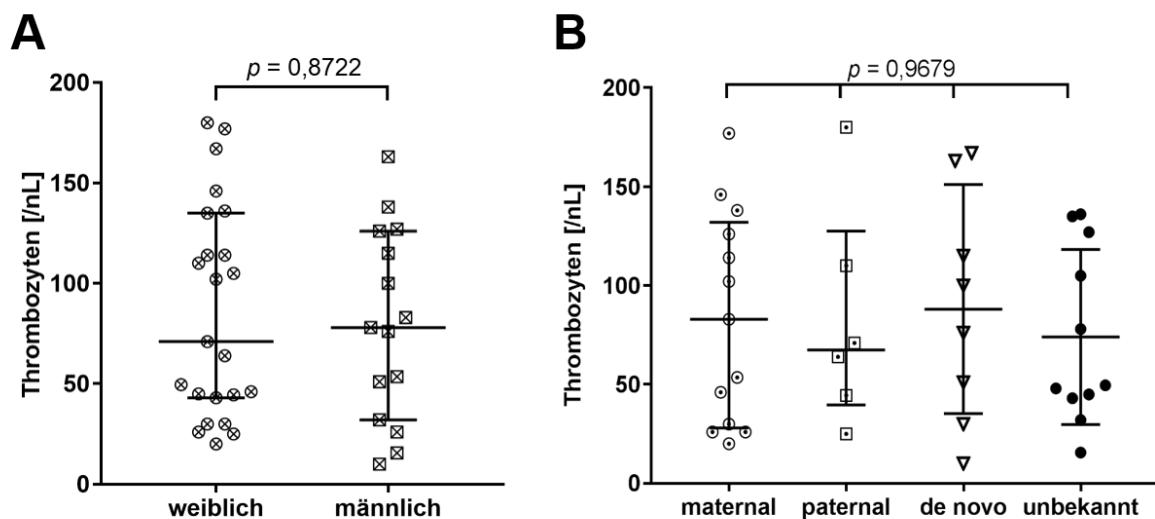


**Abbildung 11:** Der repräsentative Thrombozytenwert getrennt nach dem jeweilig bestimmten SNP im *RBM8A*-Gen. Jedes Dreieck steht für einen Patienten, blau mit 5'UTR-SNP, rot mit Intron-SNP. Markiert ist der Median, die Balken umfassen jeweils die 25. bzw. 75. Perzentile. Der p-Wert wurde mittels Mann-Whitney-T-Test ermittelt.

Zwischen den beiden Gruppen ist ein signifikanter Unterschied zu erkennen. Die Gruppen lassen sich eindeutig voneinander abgrenzen. Von TARS-13 (Intron 1 SNP) ist

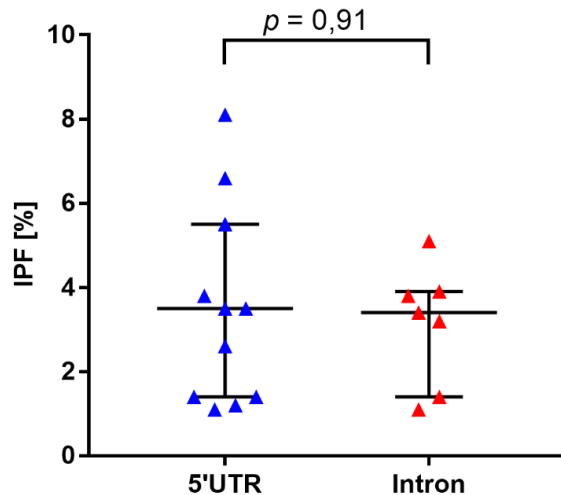
wie bereits oben beschrieben nur ein Wert verfügbar. Dies erklärt den klaren Ausreißer aus der Gesamtgruppe. Auffällig ist zudem, dass neun Werte von Patienten mit Intron-SNP (von insgesamt 14 Patienten) über dem höchsten berechneten Wert eines 5'UTR-Patienten stehen.

Die repräsentativen Thrombozytenwerte sind in Abb. 12 nach anderen beeinflussenden Faktoren wie Geschlecht (Abb. 12A) und Vererbungsmodus der Mikrodeletion (Abb. 12B) aufgetragen. Nach dieser Stratifizierung sind zwischen den Gruppen keine statistisch signifikanten Differenzen erkennbar. Bei elf Patienten von 38 ist der Vererbungsmodus nicht bekannt, auch diese Gruppe unterscheidet sich nicht signifikant von den drei gezeigten (Abb. 12B).



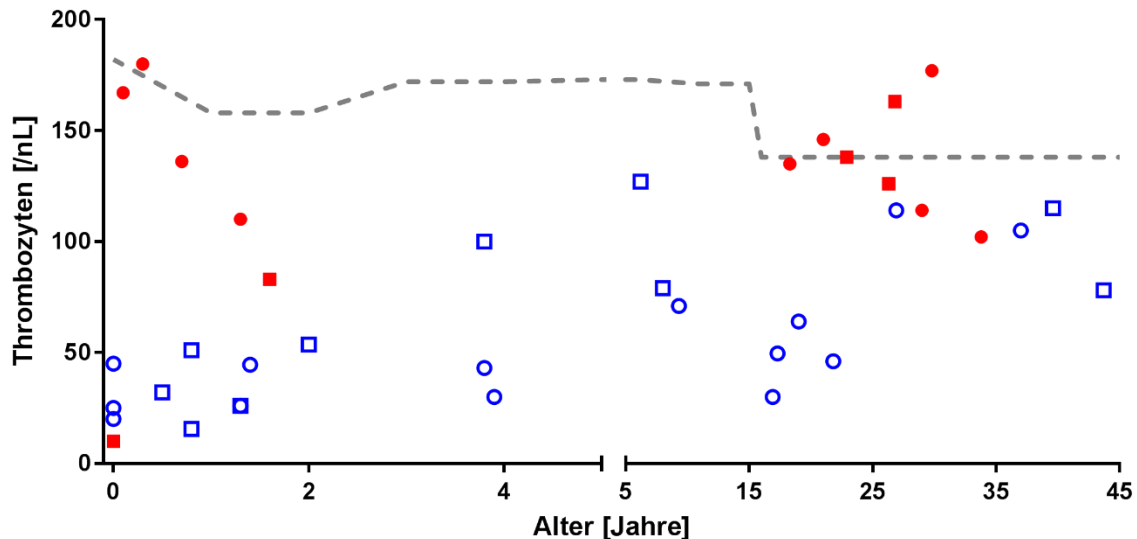
**Abbildung 12:** Repräsentative Thrombozytenwerte von TAR-Patienten aufgetragen nach Geschlecht (A) bzw. dem Vererbungsmodus der Mikrodeletion (B). Der Median ist durch die zentrale Linie markiert, die beiden Balken umfassen jeweils die 25. und 75. Perzentile. P-Werte sind in A mittels Mann-Whitney-T-Test und in B mittels Kruskal-Wallis-T-Test bestimmt worden.

Zum Ausschluss eines erhöhten Verbrauchs von Thrombozyten mit einer starken Neubildung ist bei 18 Patienten unabhängig von einer akuten Krankheitssituation die *immature platelet fraction* (IPF) bestimmt worden. Dieser Wert ist ein Maß für die jungen, neugebildeten Thrombozyten. Diese sind noch etwas größer als die zirkulierende Population von Thrombozyten und tragen zudem eine größere Menge RNA, die sich durch einen Farbstoff anfärben lässt. Die Normwerte für den IPF-Wert liegen innerhalb von 1-5%, sie können bei Kindern abhängig vom Alter etwas nach oben abweichen [82]. Die hier untersuchten Patienten zeigen normwertige IPF-Werte, dies schließt eine massive Neubildung bei akutem Verbrauch aus (siehe Abb. 13).



**Abbildung 13:** Bei 18 Patienten (elf mit 5'UTR-SNP in blau und sieben mit Intron 1-SNP in rot) ist an routinemäßig entnommenen Blutproben zusätzlich die *immature platelet fraction* (IPF) bestimmt worden. Es ist kein signifikanter Unterschied erkennbar. Der P-Wert wurde mittels Mann-Whitney-T-Test ermittelt.

Um einen möglichen Einfluss vom Alter des TAR-Patienten auf die Thrombozytenzahl abzubilden, sind in der folgenden Abb. 14 alle repräsentativen Thrombozytenwerte nach dem Alter der letztmaligen Blutkontrolle aufgetragen. Hier wird deutlich, dass es insbesondere in den ersten Lebensjahren einen Unterschied zwischen den beiden SNP-Gruppen gibt. Die Patienten mit 5'UTR zeigen insgesamt einen leicht ansteigenden Verlauf über die Jahre.



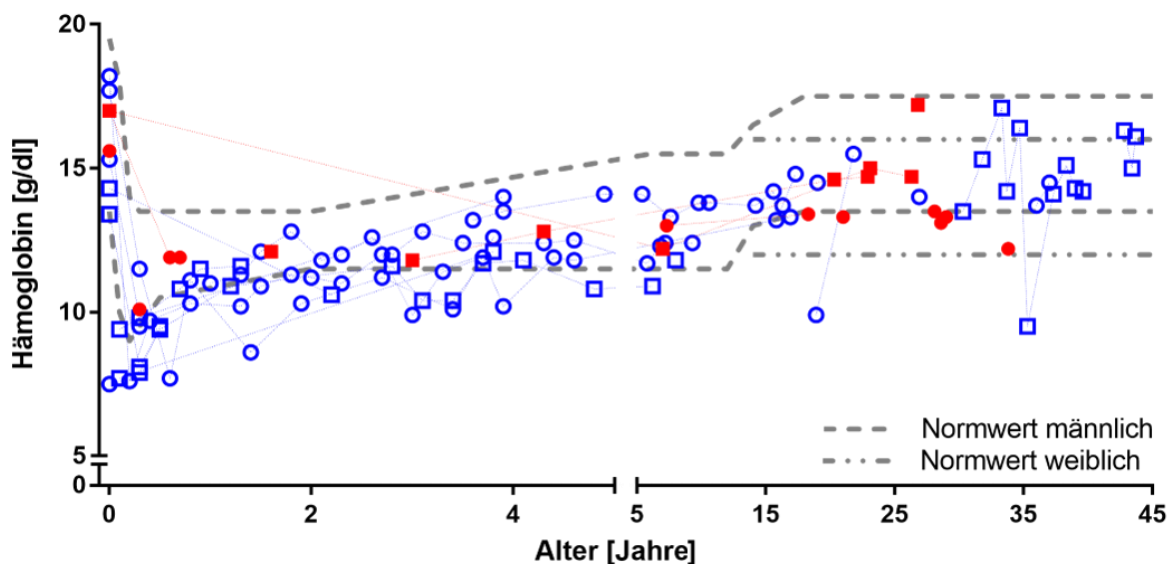
**Abbildung 14:** Repräsentative Thrombozytenwerte aufgetragen nach dem Alter bei letztmaliger ärztlicher Kontrolle. In blau sind TAR-Patienten mit SNP im 5'UTR dargestellt, in rot mit Intron-SNP. Kreise stellen Patientinnen, Quadrate Patienten dar.

Aus den gesammelten Thrombozytenwerten geht hervor, dass die Art des SNP einen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der Thrombozyten im Blut hat. Patienten mit dem SNP im 5'UTR des Genes *RBM8A* weisen signifikant niedrigere Thrombozytenwerte auf.

#### 4.1.2.2 Erythrozyten

Im nächsten Abschnitt wurden Veränderungen des roten Blutbildes analysiert. Dazu wurden folgende Werte [Einheit] verwendet: Hämoglobin (Hb) [g/dL], Hämatokrit [%], Erythrozytenzahl [ $\cdot 10^6/\mu\text{L}$ ], Anteil von Retikulozyten [%], MCV [fL], MCH [pg], MCHC [g/dL].

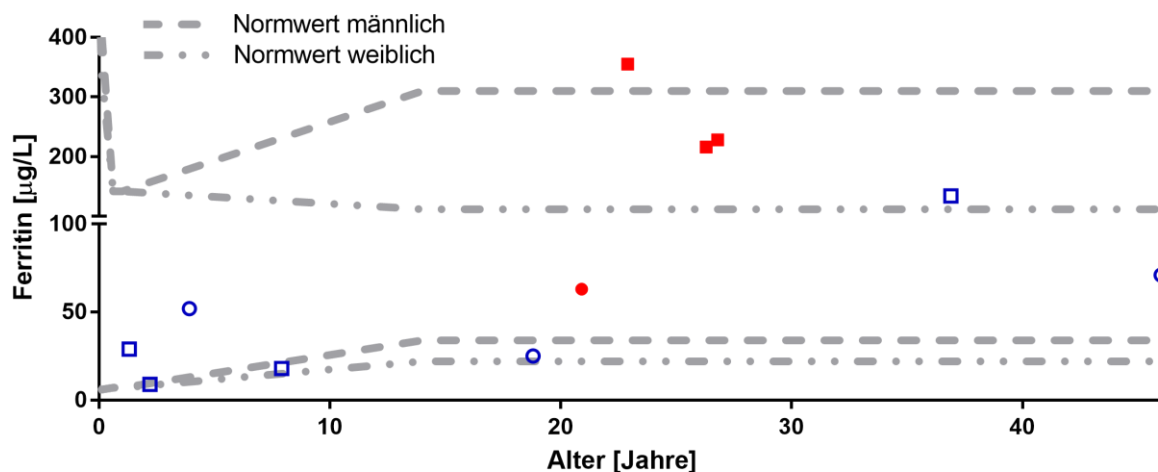
Abb. 15 zeigt den Hämoglobinwert der Patienten aus unserer Kohorte im Verlauf der Jahre. Der Hämoglobinwert ist der wesentliche Wert zur Beurteilung der Erythrozyten und zur Beurteilung über das eventuelle Vorliegen einer Anämie. Die Darstellung ist analog zu Abb. 3 gewählt. Auch hier fällt auf den ersten Blick ins Auge, dass es mehr dokumentierte Werte von Patienten mit 5'UTR-SNP gibt, als Werte von Patienten mit Intron 1-SNP. Zudem stammen alle Werte, die unterhalb der entsprechenden Normgrenze liegen, von Patienten mit 5'UTR-SNP. Kein einziger registrierter Wert eines Patienten mit Intron 1 liegt außerhalb des gezeigten Normbereiches. Deutlich wird, dass vor allem innerhalb der ersten Lebensjahre einige Patienten von einer Anämie betroffen sind. Besonders schwer ausgeprägt ist dieses Phänomen unmittelbar postnatal bis hin zur sogenannten Trimenonanämie, ein physiologischer Hb-Abfall im Säuglingsalter, der durch die Umstellung von fetalem auf adultes Hämoglobin begründet ist.



**Abbildung 15:** Verlauf der Hämoglobin-Werte. Es wird maximal ein Wert innerhalb von drei Monaten erhoben. Blau markiert sind Werte von Patienten, die den 5'UTR-SNP tragen, rot Werte von Patienten mit SNP im Intron 1. Frauen werden durch Kreise, Männer durch Quadrate dargestellt. Der Normbereich ist durch die grau gestrichelte Linie altersabhängig und ab 14 Jahren zudem geschlechtsspezifisch angegeben.

Diese Gruppe wird durch sieben TAR-Patienten dargestellt (TARS-11, 12, 39, 41, 42, 43 und 52). Fünf von diesen erhielten im weiteren Verlauf nachweislich mindestens eine Transfusion eines Erythrozytenkonzentrates. Bei den anderen beiden gibt es in den Akten keinen konkreten Vermerk. Bei diesen Episoden von stark ausgeprägten Anämien lässt sich kein Zusammenhang zu besonders niedrigen Thrombozytenwerten erkennen (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren findet sich in den Krankenakten oftmals der Hinweis, dass eine starke akute Blutung, genauso wie eine Mikroblutung, als Ursache dieser Anämie mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden kann.

Aus den erhobenen Daten geht nur eine Patientin hervor (TARS-43), die eine eindeutig mikrozytäre Anämie aufweist. Alle anderen Anämien scheinen normozytär und - soweit beurteilbar - auch normochrom zu sein. MCV- und MCH-Werte wurden seltener in den Akten notiert als Hämoglobinwerte. Die weiteren Parameter sind ebenfalls mit geringerer Frequenz bestimmt worden. Augenscheinliche Auffälligkeiten gab es aber bei keinem der Patienten oder Gruppen. Um dennoch einen Einfluss des Eisenstoffwechsels weitestgehend auszuschließen, sind bei elf Patienten unabhängig von Anämien oder anderen akuten Erkrankungen Ferritin-Werte bestimmt worden. Diese zeigen keine Auffälligkeiten.

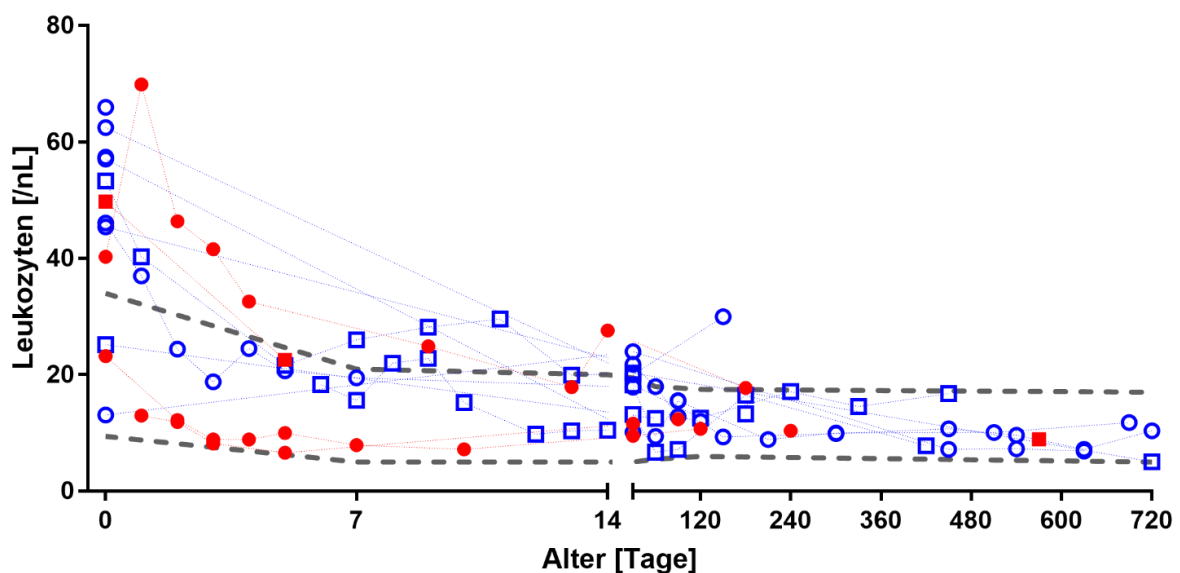


**Abbildung 16:** Ferritin-Werte von elf Patienten aus routinemäßigen Kontrollen. Blau (5'UTR) und rot (Intron 1) markieren den jeweilig nachgewiesenen SNP. Kreise stellen Frauen, Quadrate Männer dar. Eine akute Anämie ist bei der jeweiligen Entnahme mittels Mitbestimmung des Hämoglobinwertes ausgeschlossen worden.

#### 4.1.2.3 Leukozyten

Unmittelbar postnatal ist neben der Thrombozytopenie eine massive Leukozytose bei einigen Neugeborenen zu beobachten. Diese erholt sich innerhalb der ersten ein bis zwei Lebenswochen wieder. Aus diesem Grund sind im Folgenden die absoluten

Leukozytenzahlen nach SNPs analysiert worden. In den ersten zwei Lebenswochen ist nach Möglichkeit für jeden Tag ein Wert wiedergegeben, im Anschluss daran für zwei Lebensjahre jeweils monatlich. Von zwölf Patienten, bei denen eine Leukozytenzahl am ersten Lebenstag erhoben wurde, weisen lediglich drei keine Erhöhung über dem Normwert auf. Klinische Hinweise auf eine Entzündung oder weitere positive Entzündungsmarker (zum Beispiel IL-6) sind aus keiner Patientenakte zu entnehmen. Auffällige Unterschiede zwischen Patienten mit 5'UTR-SNP und Intron1-SNP zeigt die Abb. 17 nicht. Im weiteren Verlauf der ersten zwei Lebensjahre finden sich keine ähnlichen leukämoiden Reaktionen bei den TAR-Patienten in unserer Kohorte.



**Abbildung 17:** Verlauf der Leukozytenzahl innerhalb der ersten zwei Lebensjahre. Links sind die ersten zwei Wochen aufgetragen, in denen - soweit verfügbar - täglich Werte erhoben wurden. Rechts sieht man monatliche Werte bis zum Alter von zwei Lebensjahren. Die grau gestrichelten Linien markieren den altersabhängigen Referenzbereich für Leukozyten. In blau dargestellt sind die Patienten mit 5'UTR-SNP, in rot mit Intron1-SNP. Mädchen sind mit Kreisen, Knaben mit Quadraten abgebildet.

In einigen Fällen ist zur weiteren Abklärung ein Differenzialblutbild angefertigt worden. Hier finden sich ebenfalls keine Auffälligkeiten oder Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

#### 4.1.3 SNP und Fehlbildungen

Eine Zusammenfassung der wichtigsten Fehlbildungen, unter anderem Dysplasien der Extremitäten und Herzfehler findet sich in tabellarischer Form im Anhang (Tab. 8). Ein offensichtlicher Zusammenhang zwischen einzelnen Fehlbildungen bzw. Fehlbildungsmustern und den unterschiedlichen SNPs konnte nicht aufgezeigt werden. Zu beachten ist, dass die Fehlbildungen bei einem Teil der Patienten nicht explizit



beschrieben sind, bzw. nicht explizit ausgeschlossen worden sind, sodass die Möglichkeit besteht, dass eine eventuelle Assoziation aufgrund der geringen Fallzahl nicht ins Auge fällt.

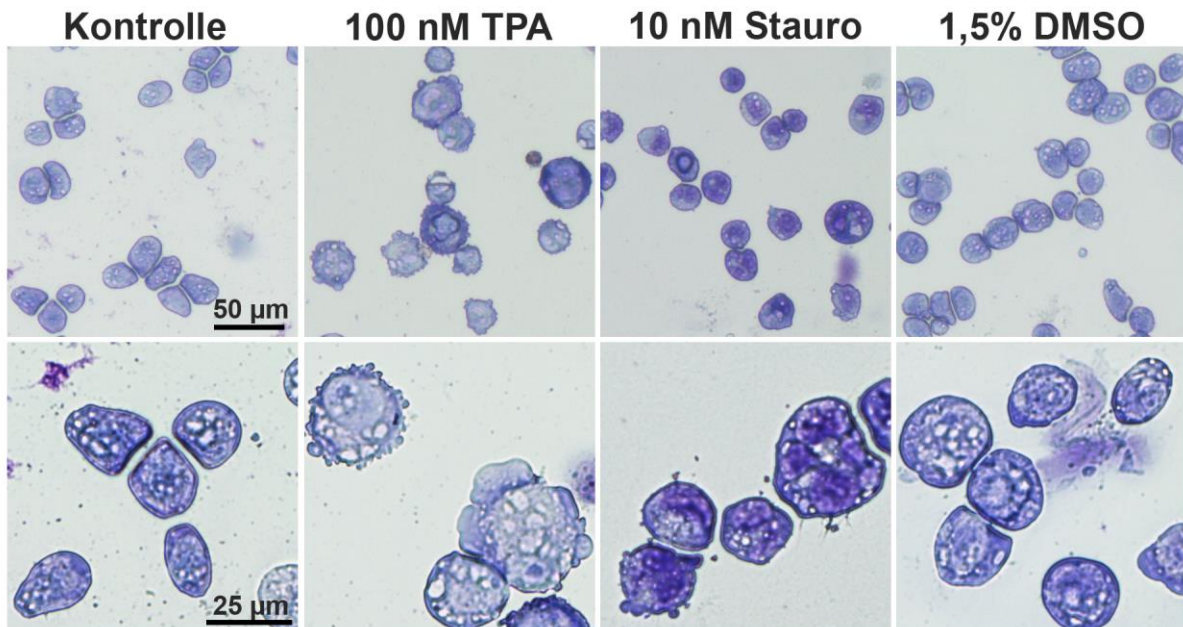
## 4.2 K562 Differenzierung

Die beiden für das TAR-Syndrom verantwortlichen SNPs liegen im Gen *RBM8A*, dort jedoch im nicht codierenden Bereich. Die Aminosäuresequenz des Proteins Y14 bleibt also unverändert. Die beiden SNPs liegen jeweils in Regionen, an denen klassischerweise Transkriptionsfaktoren binden und so die Expressionsmuster beeinflussen können. Der 5'UTR-SNP bildet nachweislich eine neue Bindungsstelle für Evi-1. Y14, das Protein zum Gen *RBM8A*, ist ein Teil des EJC und damit ein wesentlicher Bestandteil der Transkription in jeder Zelle. Veränderungen im Expressionsmuster von Y14 innerhalb der Megakaryopoese sind bisher nicht beschrieben.

Um die Rolle von Y14 innerhalb der Megakaryopoese besser beurteilen zu können, soll zunächst ein Differenzierungsmodell der Zelllinie K562 etabliert werden. K562 ist eine erythroide Zelllinie, die aus einem Klon in einer Blastenkrise einer Patientin mit chronisch myeloischer Leukämie (CML) entstammt. Diese Zelllinie besitzt nach Zugabe verschiedener Chemikalien noch ein gewisses Differenzierungspotenzial in andere Zellreihen (siehe Abschnitt 3.5.2).

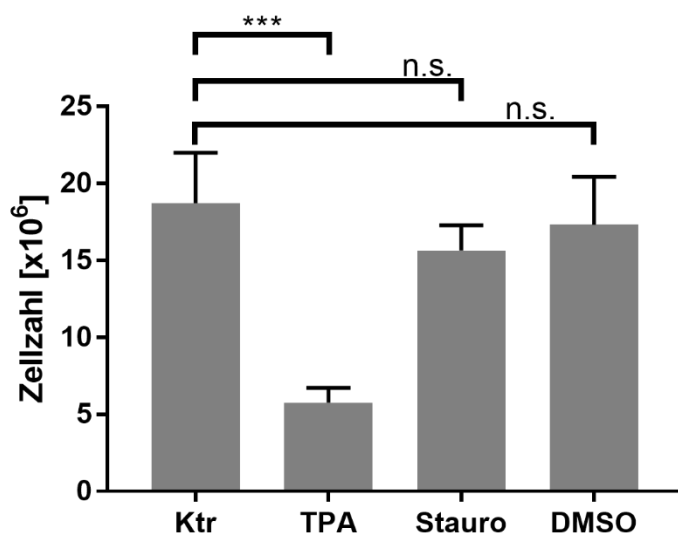
### 4.2.1 Überprüfung der Differenzierung

An Tag 0 sind jeweils  $1,5 \times 10^6$  Zellen ausgesät und mit 0,1% DMSO (v/v) (Lösemittelkontrolle), 100 nM TPA, 10 nM Staurosporin oder 1,5% DMSO (v/v) versetzt worden. Nach drei Tagen werden die Ergebnisse erhoben. Zunächst erfolgt mittels May-Grünwald-Färbung die morphologische Beurteilung der Zellen. Unter Zugabe von 100 nM TPA zeigt sich eine Größenzunahme der gesamten Zelle und des Nucleus (siehe Abb. 18). Auch unter Staurosporin-Zugabe ist eine Größenzunahme zu beobachten, jedoch ist der Anteil dieser Zellen geringer. Unter 1,5% DMSO zeigen sich keine Veränderungen im Vergleich zur Lösemittelkontrolle.



**Abbildung 18:** May-Grünwald-Färbung der K562-Zellen drei Tage nach Behandlungsbeginn. Nach Zugabe von 100 nM TPA, sowie 10 nM Staurosporin kommt es bei einzelnen Zellen zu einer Zunahme der Größe im Vergleich zur Kontrolle. Dies ist sowohl in der Übersichtsaufnahme, als auch in der Detailaufnahme zu erkennen. Bei der Kontrolle handelt es sich um eine Lösemittelkontrolle (0,1% DMSO).

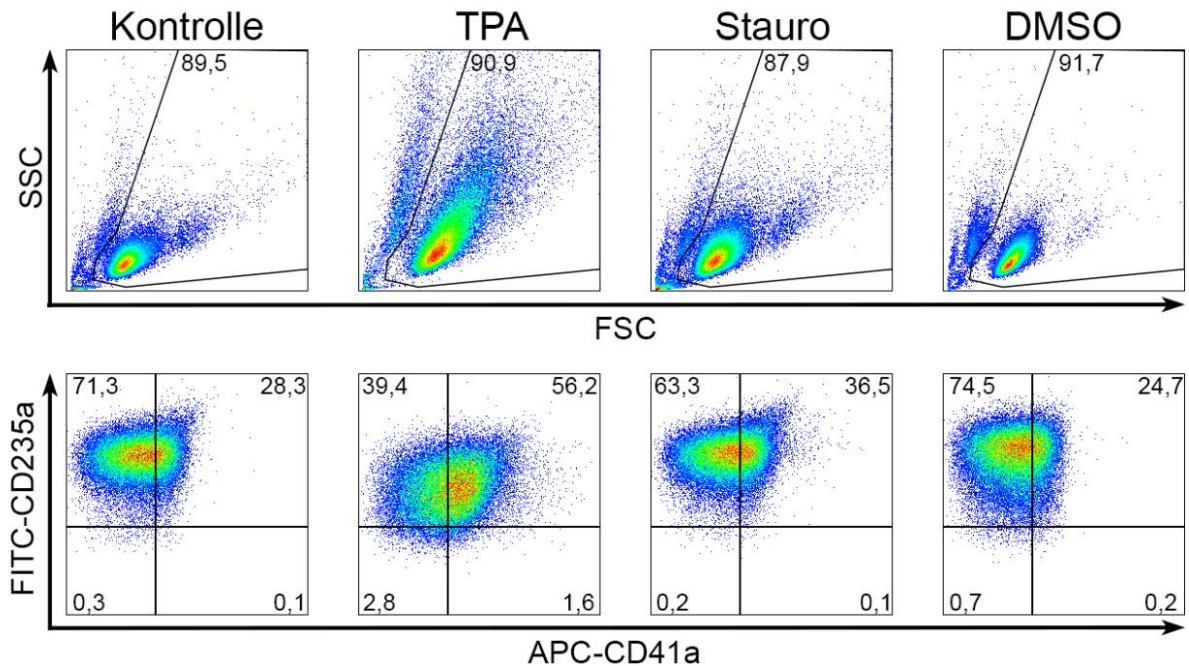
Neben den qualitativen Veränderungen der K562-Zellen nach Zugabe der Reagenzien fällt vor allem der Einfluss auf die Zellzahl auf. Bei Zusatz von TPA ist an Tag drei eine signifikant geringere Zellzahl zu beobachten (Abb. 19).



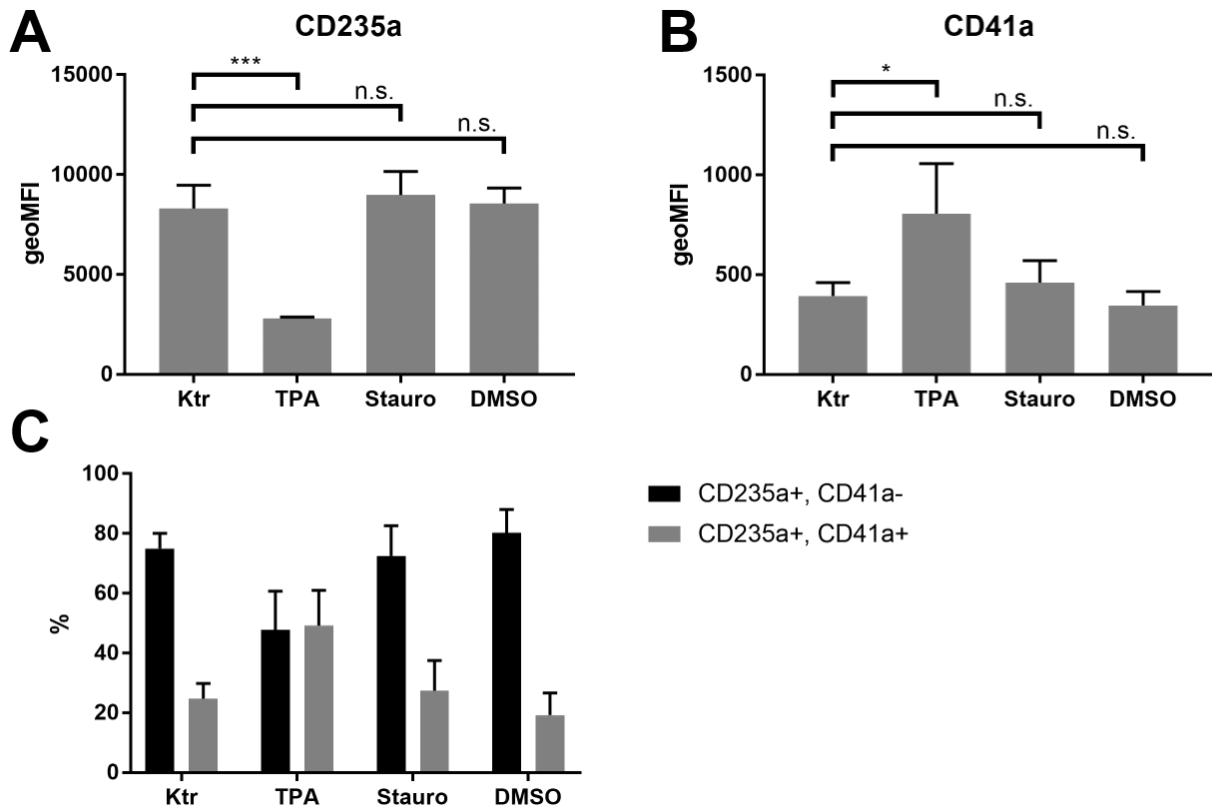
**Abbildung 19:** Einfluss der Differenzierungsreagenzien auf die Zahl von K562-Zellen an Tag 3 mittels Zählung in der Neubauerkammer. Unter TPA-Stimulation (100 nM) ist eine gehemmte Proliferation im Vergleich zur Lösemittelkontrolle (0,1% DMSO) zu erkennen. Die Zugabe von Staurosporin und DMSO (10 nM bzw. 1,5%) nimmt keinen signifikanten Einfluss auf die Zellzahl. Das Signifikanzniveau ist jeweils mit *Dunnett's multiple comparisons test* bestimmt worden. *n.s.* = nicht signifikant ( $p > 0,05$ ); \*\*\*  $p < 0,001$

Die oben beschriebenen qualitativen Veränderungen lassen sich ebenfalls durch die Durchflusszytometrie zeigen und quantifizieren. Wie in Abb. 20 zu erkennen ist, kommt es unter TPA zu einer klaren Zunahme im FSC- und vor allem im SSC-Kanal (*forward- und side-scatter*), was eine Zunahme in Größe und Granularität (MK-Differenzierung)

entspricht. Neben diesen Eigenschaften sind auch die beiden Oberflächenantigene CD235a (als erythroider Marker) und CD41a (als megakaryozytärer Marker) bestimmt worden. Die quantitative Analyse aus drei unabhängigen Experimenten zeigt Abb. 21.



**Abbildung 20:** Durchflusszytometrische Analyse der Differenzierung mit Färbung der Oberflächenantigene CD235a als Marker der erythroiden Reihe und CD41a als Marker für die megakaryozytäre Reihe (beispielhafte Darstellung aus drei wiederholten Experimenten). Die Zahlen geben jeweils die Prozentzahl der Zellen an, die im jeweiligen Gate liegen, Rundungsfehler sind möglich. In der oberen Reihe werden mittels SSC/FSC (Scatterplot) lediglich vitale Zellen für die nächste Analyse eingeschlossen. Hier ist schon zu erkennen, dass es unter TPA-Behandlung zu einer Zunahme der Größe und der Granularität kommt. Unter DMSO wird die Zellpopulation homogener und verliert große, granulierte Zellen. Die untere Reihe zeigt Färbungen der Oberflächenantigene. Die Kontrollkohorte sowie die Behandlungen mit Staurosporin und DMSO liefern vergleichbare Ergebnisse. Unter TPA kommt es zu einem Anstieg von CD41a/CD235a doppelt positiver Zellen.



**Abbildung 21:** Auswertung der in Abbildung 10 gezeigten durchflusszytometrischen Ergebnisse. **A** und **B** zeigen die geometrische mittlere Fluoreszenzintensität (geoMFI) für das Oberflächenantigen CD235a (**A**) und CD41a (**B**). Im Vergleich zur Lösemittelkontrolle kommt es zu keinem signifikanten Unterschied durch Zugabe von Staurosporin oder DMSO. Unter TPA-Behandlung zeigt sich eine Abnahme der Fluoreszenzintensität bei CD235a und eine ebenso deutliche und signifikante Zunahme bei CD41a. **C** zeigt die CD235a-positiven Zellen aufgetrennt nach einer eventuellen Koexpression von CD41a. Die Signifikanzen sind mittels *Dunnett's multiple comparisons test* ermittelt worden.  $*=p<0,05$ ,  $***=p<0,001$

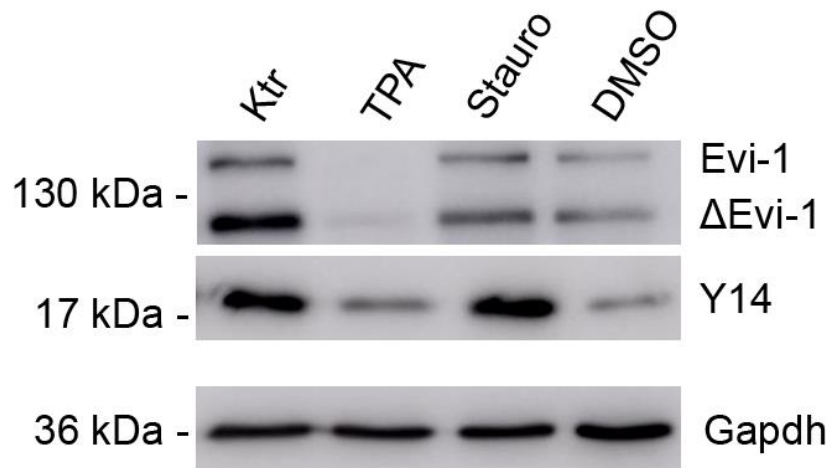
Unter Zugabe von 10 nM Staurosporin zeigt sich bei der Expressionsstärke von CD235a und CD41a kein signifikanter Unterschied zur Lösemittelkontrolle. TPA hingegen sorgt für eine hoch signifikante, schwächere Expression des Oberflächenantigens CD235a (Abb. 21A). Des Weiteren kommt es zu einer signifikanten Erhöhung der CD41a-Expression im Vergleich zur Lösemittelkontrolle (Abb. 21B). Die megakaryozytäre Differenzierung wird hier am deutlichsten durch die Zugabe von TPA hervorgerufen. Diese führt als einzige auch zu einem Proliferationsstopp. Die Zugabe von DMSO führt zu einer weiteren erythrozytären Differenzierung.

#### 4.2.2 Daten zu Evi-1 und Y14 in K562

Die Frage, warum die genetischen Veränderungen im TAR-Syndrom innerhalb der Hämatopoese vor allem die Thrombozyten trifft, führt direkt zu der Frage, ob das Protein Y14 an einem bestimmten Punkt innerhalb der Thrombopoese bzw. Megakaryopoese eine zentrale Rolle spielt und verstärkt exprimiert wird. Eine zweite mögliche Erklärung

ist, in Anbetracht einer neuen Bindungsstelle für Evi-1, dass dieses Protein zu einem bestimmten Zeitpunkt eine besondere Rolle spielt. Im ersten Schritt werden deshalb Expressionsanalysen dieser Proteine in dem oben vorgestellten Differenzierungsmodell durchgeführt. Abb. 22 zeigt einen exemplarischen Immunoblot aus den drei unabhängigen Differenzierungsexperimenten mit Detektion der Expression von Evi-1 und Y14. Der hier verwendete Evi-1 Antikörper weist zusätzlich zum kompletten Protein (ca. bei 140 kDa) noch eine Spleiß-Variante nach, die ca. 40 kDa kleiner ist, Evi-1- $\Delta$  [83]. In der unstimulierten Kontrolle (Ktr) liegt ein Großteil des nachgewiesenen Evi-1 in dieser Variante vor und auch unter Zusatz der verschiedenen Reagenzien bleibt die Spleiß-Variante die dominante Form. Interessanterweise ist die Expression von Evi-1 unter TPA-Stimulation nahezu komplett reduziert und nur noch in der Spleiß-Variante dezent nachweisbar. Unter Staurosporin und DMSO kommt es ebenfalls zu einer leichten Verminderung der Expression, die jedoch nicht so ausgeprägt ist wie nach Stimulation mit TPA. Beim Protein Y14 kommt es innerhalb der Differenzierung mit TPA auch zu einer Reduzierung der Expressionsstärke. Vergleichbar dazu ist die Reaktion nach Stimulation mit DMSO. Staurosporin hingegen scheint keinen Effekt auf die Y14-Expression im Vergleich zur Lösemittelkontrolle zu nehmen.

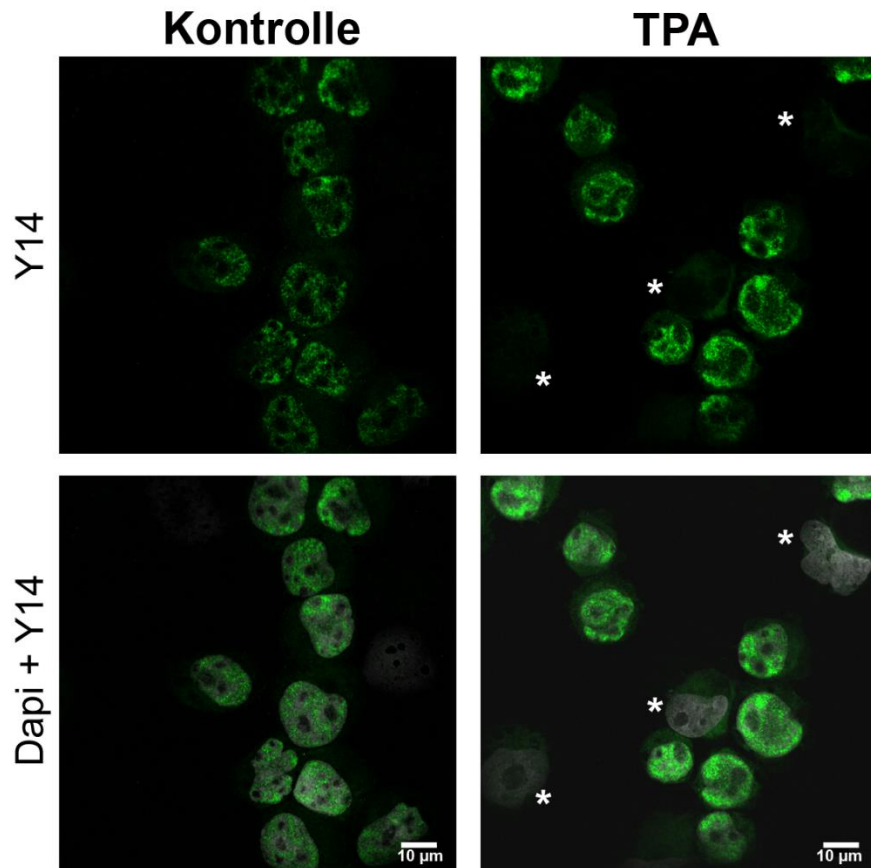
Die durch TPA induzierte megakaryozytäre Differenzierung und die durch DMSO induzierte erythrozytäre Differenzierung führen zu ähnlichen Expressionsmustern. Das Protein Evi-1 ist weniger exprimiert und nach TPA-Stimulation kaum nachweisbar. Die Expression von Y14 ist in beiden Fällen reduziert.



**Abbildung 22:** Immunoblot-Daten zum Differenzierungsexperiment (ein Beispiel aus drei Experimenten). K562-Zellen wurden für drei Tage mit TPA, Staurosporin (Stauro) oder DMSO stimuliert und dann lysiert. Als Kontrolle diente eine Lösemittelkontrolle (Ktr). Der Evi-1-Antikörper weist neben der Hauptform des Proteins zusätzlich eine Spleiß-Variante unterhalb von 130 kDa nach ( $\Delta$ Evi-1). Unter TPA-Behandlung kommt es zu einer Reduzierung beider Isoformen von Evi-1. Auch das Y14-Protein ist im Vergleich zur Kontrolle weniger stark exprimiert. Unter Staurosporin und DMSO kommt es lediglich zu einer leichten Reduktion der Evi-1-Expression. Y14 geht unter DMSO auf ein vergleichbares Level wie unter TPA Behandlung zurück.

Zum Nachweis der Expression dieser Proteine auf Einzelzellebene werden unten Aufnahmen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie mit Hilfe eines Laserscanning-Mikroskops gezeigt. Auf Grund der in Abschnitt 4.2.1 gezeigten Differenzierung unter TPA beschränken sich alle folgenden Analysen auf dieses Differenzierungsmodell.

Abb. 23 zeigt den Vergleich der Expression von Y14 zwischen der Lösemittelkontrolle und TPA. Die beiden Ausschnitte zeigen jeweils einen repräsentativen Ausschnitt der gefärbten Zellen. Auffällig ist, dass die Expressionsmuster von Y14 in beiden Gruppen vergleichbar sind. Das Protein ist stark im Nucleus angereicht, wobei es nicht gleichmäßig verteilt ist. Einige Bereiche innerhalb des Nucleus sind vollständig ausgespart, andere hingegen angereichert. Im Zytoplasma ist nur ein schwaches Signal detektierbar. Interessanterweise sind unter TPA-Behandlung Zellen zu beobachten, die kaum bis gar kein Y14 exprimieren (markiert durch \* in Abb. 23). Der Einschluss dieser für Y14 negativen Zellen in die Gesamtzell-Lysat-Analysen könnte eine Erklärung dafür sein, wieso es im Immunoblot zu einer Reduktion von Y14 nach TPA-Behandlung kommt.



**Abbildung 23:** Konfokalaufnahmen mit dem Laserscanning-Immunofluoreszenzmikroskop. Bei der Kontrolle erkennt man Y14 in jeder dargestellten Zelle. Es ist stets nukleär lokalisiert, erkennbar in der DAPI-Cofärbung. Unter TPA-Stimulation sind in diesem Abschnitt drei Zellen zu erkennen, die kaum Y14 exprimieren (markiert mit \*).

### 4.3 Y14-Depletion mittels RNA-Interferenz

Ursächlich für das TAR-Syndrom scheint eine Verminderung von Y14 in den Vorläuferzellen der megakaryozytären Vorläuferzellen zu sein [31]. Die komplette Herunterregulation von Y14 führt, wie in der Einleitung erwähnt, in verschiedenen Zelllinien zu einer Induktion von Apoptose [31, 52]. In neuronalen Strukturen von Mäusen kommt es bereits bei einer Haploinsuffizienz für *RBM8A* zu massiven Veränderungen [54], im humanen System scheint eine reine Haploinsuffizienz für die Ausbildung einer Pathologie nicht ausreichend zu sein, wie die klinisch unauffälligen Träger der Mikrodeletion zeigen.

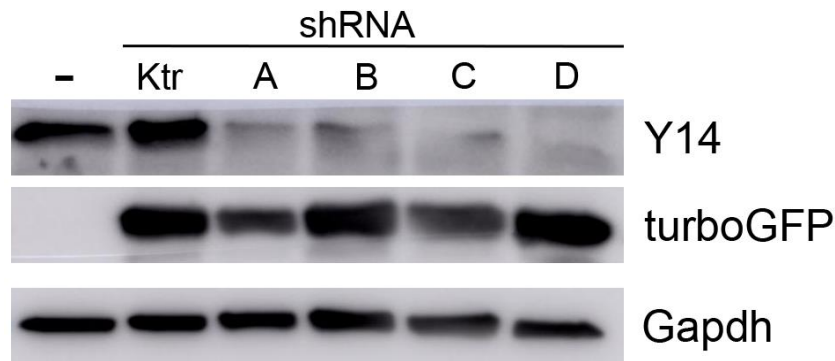
Im den folgenden Abschnitten soll der Einfluss der Herunterregulierung von Y14 in der Zelllinie K562 untersucht werden. Dazu werden lentivirale Konstrukte verwendet, die eine shRNA tragen, welche sich spezifisch gegen die mRNA von *RBM8A* richtet und die die Expression von Y14 herunterregulieren sollen.



### 4.3.1 Austestung der verschiedenen shRNAs

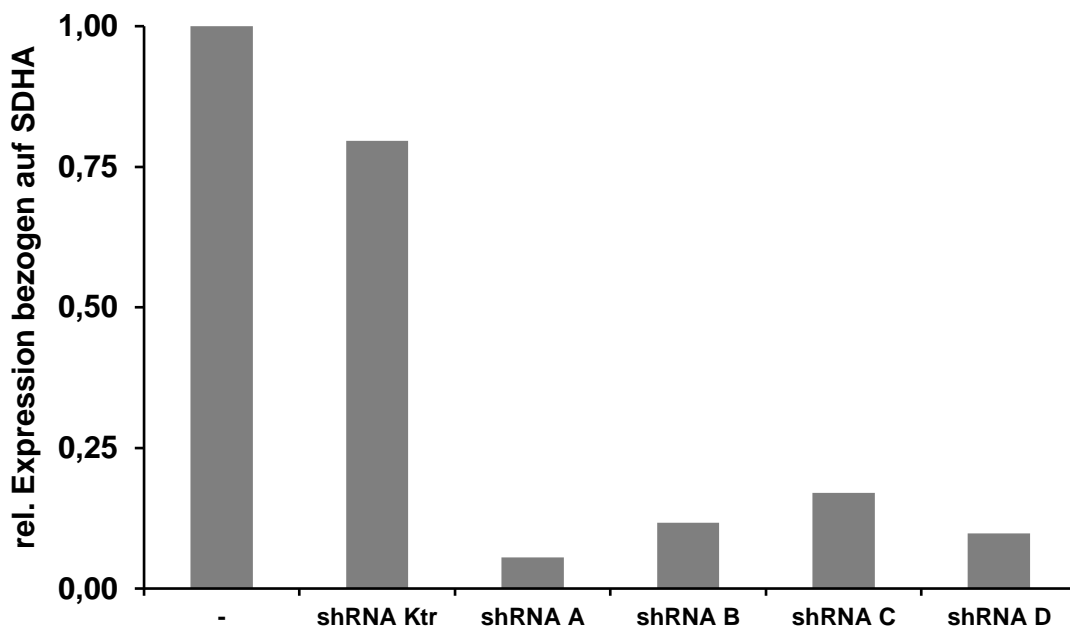
Zuerst werden HeLa-Zellen mit den shRNA-tragenden lentiviralen Konstrukten transduziert: A, B, C, D und die *non-silencing* Kontrolle Ktr. Diese adhärente Zelllinie dient in erster Linie zur Funktionalitätsprüfung der verschiedenen shRNAs, die kommerziell erworben wurden (siehe Tab. 5). Die shRNAs greifen jeweils spezifisch an unterschiedlichen Stellen innerhalb der mRNA-Sequenz von *RBM8A* an und sollen so eine Translation zum Protein Y14 verhindern. Neben der shRNA-Kassette werden durch die Transduktion mit dem Virus ebenfalls eine turboGFP-Kassette und eine Puromycin-Resistenz übertragen. Die Expression von turboGFP dient zur Kontrolle der Infektionsrate mittels Fluoreszenzmikroskop oder in der Durchflusszytometrie. Das zweite Tool eröffnet die Möglichkeit, einen Selektionsdruck für transduzierte Zellen unter Zugabe des Antibiotikums Puromycin auszunutzen.

Der in Abb. 24 dargestellte Immunoblot zeigt für alle vier verschiedenen shRNAs (shRNA A, B, C, D) eine Reduktion von Y14 bezogen auf das Haushalts-Protein Gapdh gegenüber den unbehandelten HeLa-Zellen, genauso wie zur Kontroll-shRNA (shRNA Ktr). Im Immunoblot ist neben Y14 und Gapdh zudem die Expression turboGFP nachgewiesen. Das Y14-Protein ist unter Behandlung der shRNAs A-C residual nachweisbar, bei shRNA D zeigt sich unter gleicher Expositionszeit keine Proteinbande. Hinzu kommt eine starke Proteinbande für turboGFP, was zusammen mit der Beobachtung von mehr fluoreszierenden Zellen mittels Fluoreszenzmikroskop zu der Erkenntnis führt, dass die Viren mit shRNA D die höchste Transduktionseffizienz aufweisen. Bei der Kontroll-shRNA handelt es sich um einen Vektor, der neben der Puromycin-Resistenz und turboGFP-Kassette eine sogenannte *non-silencing*-shRNA trägt. Diese hat keine humane mRNA-Sequenz als Zielsequenz.



**Abbildung 24:** Immunoblot von transduzierten HeLa-Zellen. In der ersten Reihe sind unbehandelte HeLa-Zellen dargestellt, weiter rechts mit fünf verschiedenen lentiviralen Vektorkonstrukten transduzierte Zellen. Diese Konstrukte tragen shRNAs, wobei sich A-D gegen Y14 richten, Ktr entspricht einer *non-silencing*-shRNA-Sequenz. Unter allen vier shRNAs kommt es zu einer Reduktion der Y14-Expression, wobei bei A, B und C jeweils noch geringe Mengen des Proteins nachweisbar sind. In der mittleren Reihe wird die Expression von turboGFP und in der unteren Reihe die Ladekontrolle Gapdh gezeigt.

Der Effekt auf mRNA-Ebene wird in Abb. 25 mittels qPCR gezeigt. Hier sind dieselben Kontrollen verwendet worden wie in Abb. 24. Die Herunterregulation der *RBM8A*-mRNA kommt bei shRNA C auf ca. ein Viertel im Vergleich zu shRNA Ktr und auf ein Fünftel im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Nach Transduktion der shRNA D kommt es zu einer Reduktion der relativen Expression auf 10% verglichen mit der unbehandelten HeLa-Zellkultur. Die Analyse bezieht sich auf die Expression des Haushalts-Gens *SDHA*.



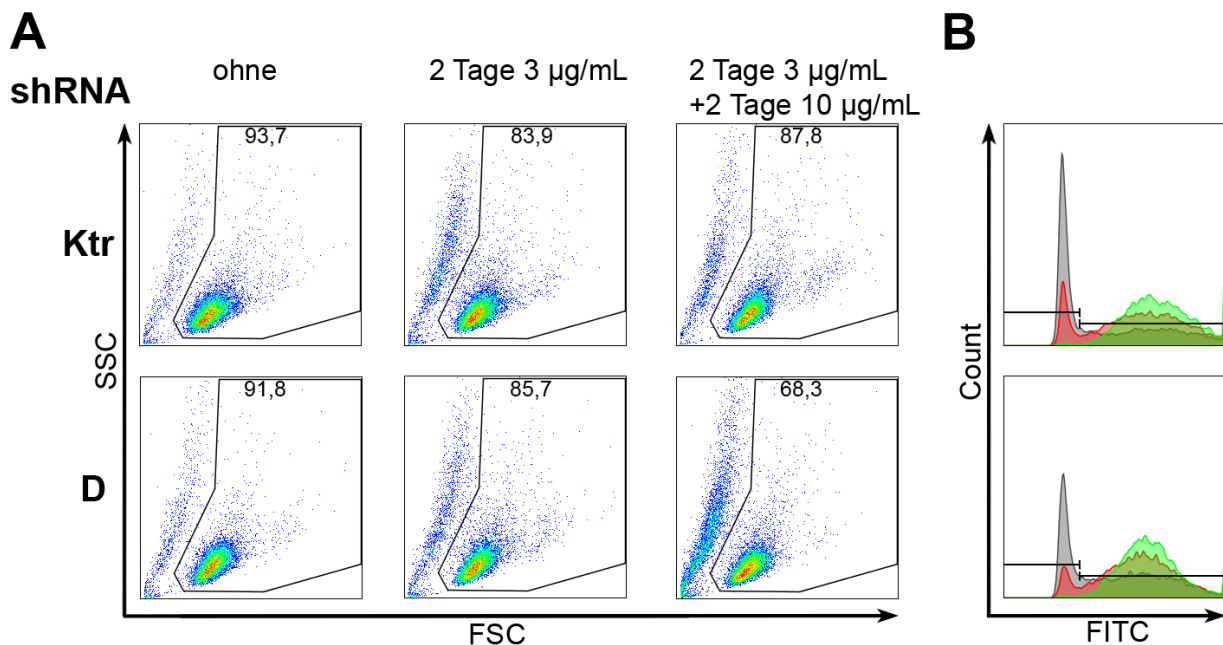
**Abbildung 25:** Menge der Y14-mRNA bestimmt mittels qPCR, normiert auf SDHA mittels  $\Delta\Delta C_T$  Methode in HeLa-Zellen. Genauso wie im Immunoblot erkennt man eine Reduzierung der RNA-Menge sowohl im Vergleich zur Kontroll-shRNA als auch im Vergleich zu unbehandelten HeLa-Zellen.

Aufgrund der eindeutig stärksten Herunterregulation durch shRNA D auf Proteinebene sind alle weitergehenden Experimente stets mit der shRNA D durchgeführt worden.

### 4.3.2 Transduktion einer hämatopoetischen Zelllinie

Um den Einfluss der Herunterregulation von Y14 während der Megakaryopoese untersuchen zu können, sind im nächsten Schritt K562-Zellen mit einem shRNA D-tragenden lentiviralen Konstrukt transduziert worden. Hinzu kommt die Kontrolle mittels *non-silencing*-shRNA (shRNA Ktr). Über alle Experimente hinweg ist zu beobachten, dass bei shRNA D-tragenden Konstrukten die Zellen weniger positiv auf turboGFP sind und zudem ein größerer Teil der Zellen apoptotisch ist, stets verglichen mit der *non-silencing*-shRNA-Kontrolle.

Der Anteil erfolgreich transduzierter Zellen ist bei K562-Zellen trotz gleicher Bedingungen geringer als bei HeLa-Zellen. Ohne Puromycin-Selektion sind 50% (für shRNA Ktr) bzw. 63% positiv für GFP (Abb. 26, angezeigt im FITC-Kanal). Mit steigender und längerer Puromycin-Selektion steigt die Rate an GFP-positiven Zellen. Nach zwei Tagen mit 3 µg/mL Puromycin sind 83% bzw. 90% positiv. Nachdem die Zellen zusätzlich noch einmal für zwei Tage mit 10 µg/mL Puromycin behandelt wurden, sind bei beiden Populationen ca. 99% aller Zellen GFP-positiv. Zu beachten ist hier auch das erste Gating im FSC/SSC-Plot. Hier werden Zellfragmente vom weiteren Gating ausgeschlossen. Die zunehmende Anzahl von Zellfragmenten ist ein Indiz für eine erhöhte Apoptoserate. Bei der Kontrolle nach vier Tagen sind mehr Zellen vital als nach zwei Tagen Puromycin-Selektion. Dies ist mit der Verzögerung der apoptischen Wirkung des Puromycins zu erklären.

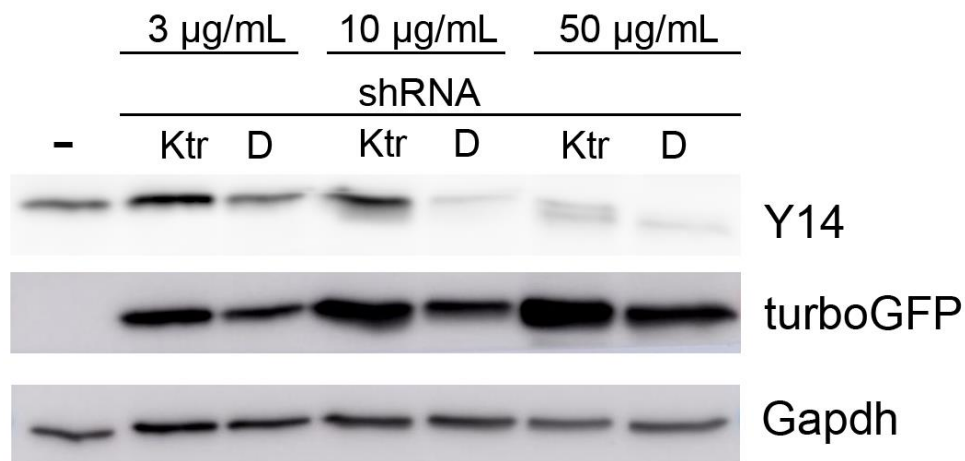


**Abbildung 26:** Durchflusszytometrische Untersuchung von transduzierten K562-Zellen nach Puromycin-Selektion. Die lentiviralen Vektoren tragen zwei verschiedene shRNAs, eine *non-silencing* shRNA (Ktr) als Kontrolle (oben) und eine, die sich gegen die mRNA des Genes *RBM8A* richtet (unten). **A** zeigt den Scatterplot. Der markierte Bereich sind lebendige Zellen, die in **B** auf die Expression von turboGFP untersucht werden. Die Zahlen geben die Prozentzahl der im Gate liegenden Zellen an. Die Puromycin-Konzentration ist von links nach rechts wie angegeben erhöht. In **B** wird die turbo-GFP-Intensität im FITC-Kanal gemessen. Grau markiert ist die erste Population ohne Puromycin-Selektion, rot die zweite und grün die dritte mit maximal 10 µg/mL Puromycin.

Wie eingangs geschrieben, wird ein geringerer Teil der mit shRNA D transduzierten Zellen als vital gewertet (68,3% versus 87,8% bei shRNA Ktr). Die geometrische mittlere Fluoreszenzintensität (geoMFI) liegt bei den als GFP-positiv gewerteten Zellen bei 9.362 bzw. bei 14.428 bei der Kontrolle. Das turbo-GFP Protein wird bei der Kontrolle wesentlich stärker exprimiert, wodurch die höhere geoMFI zu erklären ist.

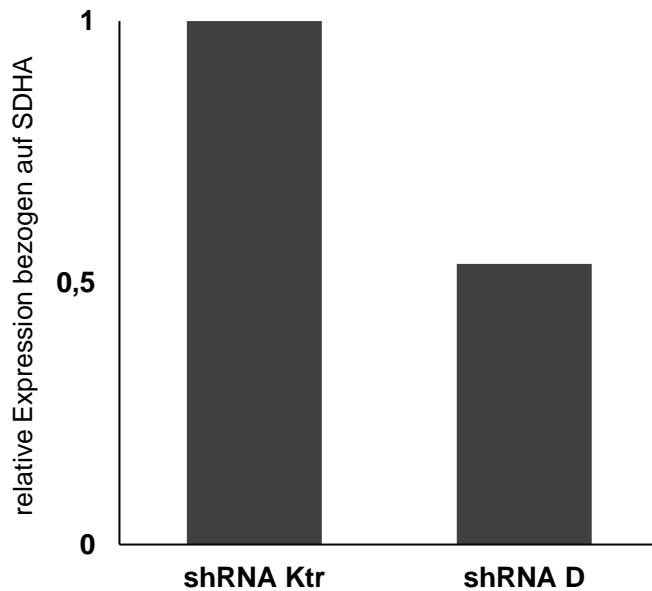
Mit der Puromycin-Selektion steht ein Mittel zur Verfügung, mit dem der Anteil untransduzierter Zellen massiv reduziert werden kann. Bei der Transduktion werden unterschiedlich viele Kopien des Virus in das Genom der Zielzellen eingebaut. Das heißt, es kann Zellen geben, die über zehn Kopien tragen und andere, die lediglich eine Kopie tragen. Mit Erhöhung der Puromycin-Konzentration ist es möglich, Klone zu selektieren, die mehrere Kopien der Resistenz und damit auch mehrere Kopien der shRNA in ihr Genom integriert haben. Dies hat zur Folge, dass durch diese Steigerung das Expressionslevel von Y14 innerhalb der gesamten Zellpopulation fällt. Abb. 27 zeigt dies eindrücklich. Unter 3 µg/mL Puromycin ist eine leichte Herunterregulierung von Y14 zu erkennen. Bei Steigerung auf 10 µg/mL ist dieser Effekt besser zu erkennen. Unter 50 µg/mL ist keine spezifische Bande für Y14 im Immunoblot mehr nachweisbar.

Interessanterweise taucht hier eine unspezifische Bande (auch bei der Kontrolle) knapp unterhalb von 17 kDa auf. Beim Nachweis von turboGFP mittels Immunoblot bestätigt sich ein Effekt, den man bereits in der Durchflusszytometrie beobachten konnte. Die mit der shRNA Kontrolle transduzierten Zellen haben ein stets höheres Level an turboGFP.



**Abbildung 27:** Immunoblot von transduzierten K562-Zellen nach Behandlung mit Puromycin in verschiedenen Konzentrationen. Links dargestellt sind unbehandelte K562-Zellen, dann stets im Vergleich mit shRNA Ktr und D und jeweils gleicher Puromycin-Konzentration für mind. zwei Tage. In der ersten Reihe wurde Y14 detektiert. Es wird deutlich, dass shRNA D Y14 mit zunehmender Puromycin-Konzentration stärker die Expression von Y14 depletiert. Unter 50 µg/mL Puromycin ist – auch bei langer Expositionszeit – kein Y14-Proteinmehr nachweisbar. turboGFP wird unter stärkerem Selektionsdruck ebenfalls stärker exprimiert, wobei mit shRNA Ktr transduzierte Zellen jeweils vergleichsweise mehr turboGFP exprimieren. Die Beladung ist mittels Gapdh kontrolliert und zwischen den Proben vergleichbar.

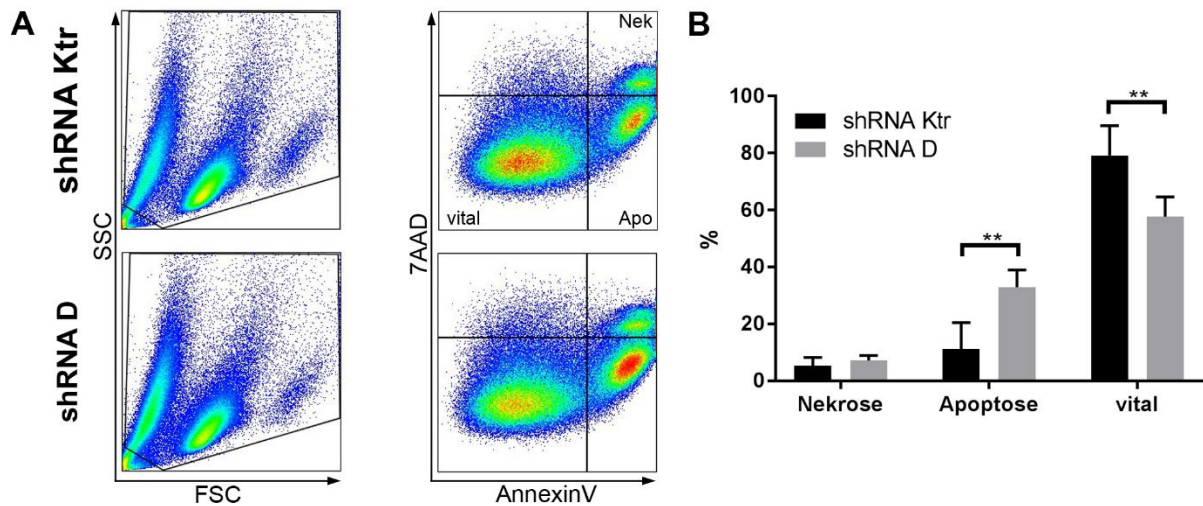
Neben der Herunterregulation auf Proteinebene soll auch eine Veränderung auf mRNA-Ebene detektiert werden. Abb. 28 zeigt die relative Expression der mRNA des Genes *RBM8A*, welche durch die shRNA D in ihrer Expressionsstärke abnehmen sollte. Die Analyse bezieht sich auf das Haushalts-Gen *SDHA*. Die RNA-Menge für die Kontrolle wird willkürlich auf 1 gesetzt. So ergibt sich bei shRNA D eine relative Expressionsstärke von ca. 0,5.



**Abbildung 28:** Analyse der RBM8A-RNA in transduzierten K562-Zellen nach Puromycin-Selektion (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Die relative Expression bezieht sich auf SDHA und ist mittels der  $\Delta\Delta\text{C}_T$  Methode bestimmt und auf K562-Zellen normiert worden, die mit der Kontroll-shRNA transduziert wurden. Nach shRNA D-Transduktion und Puromycin-Selektion ist nur halb so viel Y14-mRNA in den Zellen nachweisbar.

### 4.3.3 Apoptose und Differenzierung von transduzierten K562-Zellen

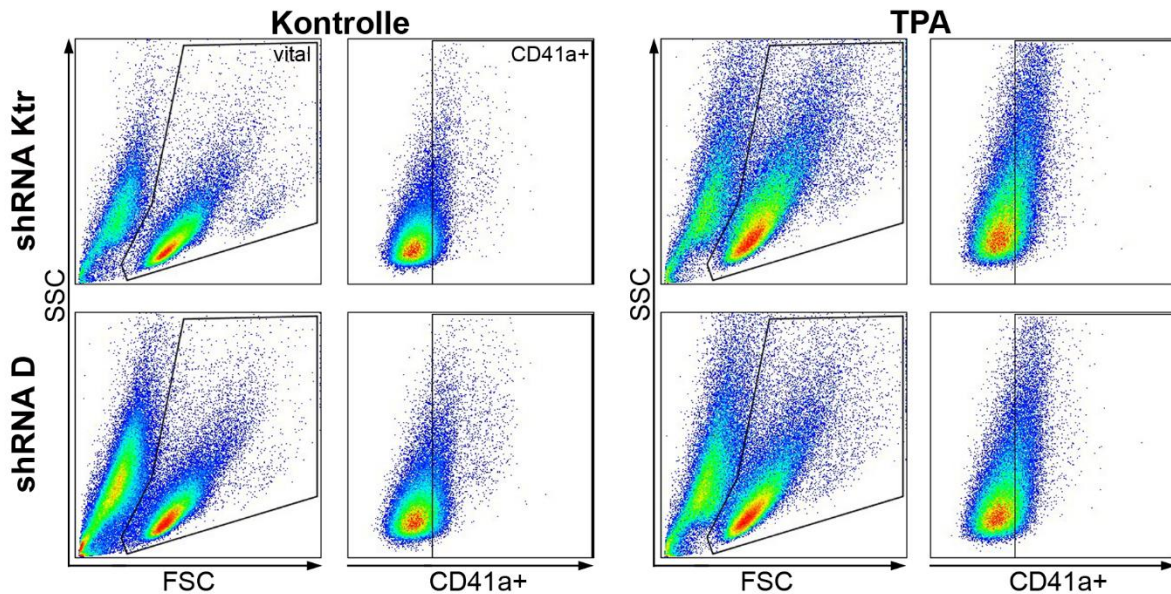
Bei den Experimenten mit den HeLa-Zellen (siehe Abschnitt 4.3.1) und bei den in Abschnitt 4.3.2 beschriebenen Versuchen fiel auf, dass die Zellen, die mit einem Vektorkonstrukt, welches die shRNA D trägt, transduziert wurden, vermehrt apoptotisch werden und eine wesentlich verlangsamte Proliferation zeigen. Zur genaueren Beurteilung der von uns transduzierten Zellen ist in Abb. 29 das Ergebnis eines AnnexinV-Assays dargestellt. Mit diesem Assay kann der Anteil von apoptotischen und nekrotischen Zellen gleichzeitig bestimmt werden. Zu beachten ist, dass diese Analyse frühestens drei Tage nach Beginn der Puromycin-Selektion durchgeführt werden kann. Andernfalls kann das Ergebnis durch die apoptotische Wirkung des Puromycins auf nicht-transduzierte Zellen verfälscht werden. In der Zusammenfassung von fünf unabhängigen Experimenten ergibt sich der signifikante Unterschied, dass mit shRNA D-tragenden Konstrukten transduzierte Zellen häufiger in die Apoptose gehen und nicht mehr vital sind. Nach drei Tagen ist interessanterweise (noch) kein Unterschied in der Gruppe der nekrotischen Zellen zu erkennen (siehe Abb. 29B).



**Abbildung 29:** AnnexinV-Assay von transduzierten K562-Zellen unter 10 µg/mL Puromycin (über mind. drei Tage). In **A** sind im Scatterplot und im AnnexinV/7AAD-Plot die K562-Zellen mit zwei unterschiedlichen shRNAs aufgetragen. Im AnnexinV/7AAD-Plot sind die Quadranten entsprechend der weiteren Analyse in **B** beschriftet (Apo = Apoptose; Nek = Nekrose). **B** zeigt die Zusammenfassung aus fünf unabhängigen Experimenten. Die Darstellung gibt den Anteil (in Prozent) der nekrotischen, apoptotischen und vitalen Zellen wieder. Die Signifikanz ist mittels *Welch's t-test* bestimmt. \*\* =  $p < 0,01$

Um eine eventuelle Auswirkung des Y14-*Knockdown* zu untersuchen, sollte im nächsten Schritt das in Abschnitt 4.2 beschriebene Differenzierungsmodell für K562-Zellen auf transduzierte Zellen übertragen werden.

Abb. 30 zeigt exemplarisch das Ergebnis eines dieser Differenzierungsansätze. Im Unterschied zu Abb. 20 wird die Expression des Oberflächenantigens CD235a in diesem Versuchsaufbau nicht untersucht. Unter Zugabe von 100 nM TPA zu den K562-Zellen erkennt man im Scatterplot eine Zunahme an Größe und Granularität. Der Scatterplot ist ebenfalls wieder, vergleichbar zu Abb. 20, für den Ausschluss nicht vitaler Zellen zur nächsten Analyse genutzt worden. Mit diesem Schritt wird ein weiteres Mal bestätigt, dass die Herunterregulation von Y14 zu einem Anstieg der apoptotischen Fraktion führt und die Populationen rund um den eingeschlossenen Bereich größer sind (Daten nicht gezeigt). Um die Proteinmenge von Y14 in den Zellen möglichst effektiv zu supprimieren, findet die Differenzierung unter dem Zusatz von 50 µg/mL Puromycin statt. Jeweils rechts ist der Oberflächenmarker CD41a gegen den Seitwärtsscatteer aufgetragen. In dieser Darstellung ist erneut zu erkennen, dass die Zellen unter TPA-Behandlung an Granularität zunehmen. Zudem zeigt sich, dass mit steigender Granularität auch ein größerer Anteil an Zellen CD41a positiv ist.

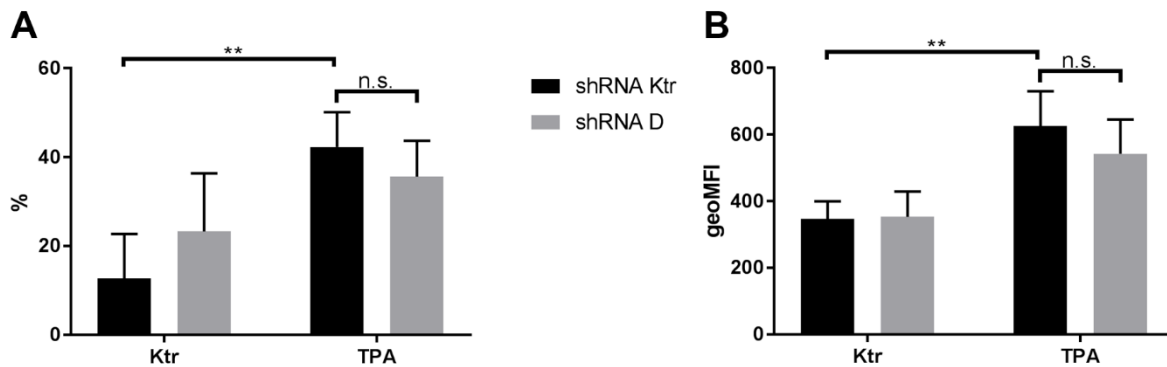


**Abbildung 30:** Differenzierung von transduzierten K562-Zellen mittels TPA. Links sind die nicht differenzierten K562-Zellen (Kontrolle) dargestellt. Die *Gating* Strategie ist bei beiden shRNA-Ansätzen gleich. Rechts ist die Differenzierung der K562-Zellen nach Stimulation von 100nM TPA zu sehen. Dadurch kommt es zu einer Zunahme der Granularität (SSC). Des Weiteren sind mehr Zellen CD41a positiv.

Der beschriebene Versuch ist insgesamt viermal unabhängig voneinander durchgeführt worden und die zusammenfassende Auswertung wird in Abb. 31 gezeigt. *Panel A* zeigt den Anteil der Zellen, deren MFI-Wert oberhalb des Schwellenwertes liegt und die damit als CD41a positiv gewertet werden, *B* die geoMFI für diesen Oberflächenmarker. Die mit einem *non-silencing*-shRNA tragenden Konstrukte transduzierten Zellen (shRNA Ktr) verhalten sich vergleichbar zu den unbehandelten Zellen (vergleiche Abb. 20). Der Anteil der CD41a positiven Zellen steigt von durchschnittlich 11% auf 41%, die geoMFI von 311 auf 677. Die Differenzierung hat trotz der Transduktion und der Puromycinbehandlung von hier 50 µg/mL gut und reproduzierbar funktioniert.

Die Transduktion mit einem lentiviralen Konstrukt, welches die shRNA D trägt, führt hingegen nicht zu einem signifikanten Unterschied in der Differenzierung. Eine leichte Differenz ist in jedem einzelnen Versuch genauso auszumachen, wie in der Zusammenschau aller Experimente. Der durchschnittliche Unterschied der CD41a-positiven Zellen liegt bei 36% im Vergleich zu 41%, sowie bei 605 zu 677 bei der Kontrolle in der geoMFI. Die Differenz ist gering und der mittels *Welsh's t-test* ermittelte p-Wert liegt oberhalb des Signifikanzniveaus von  $p > 0,05$ .





**Abbildung 31:** Auswertung der Differenzierung von transduzierten K562-Zellen, dargestellt in Abbildung 20 (aus insgesamt vier unabhängigen Experimenten). In beiden Darstellungen wird jeweils die Lösemittelkontrolle (0,1% DMSO) mit der Inkubation von 100 nM TPA verglichen. In **A** ist der Anteil CD41a positiver Zellen gezeigt. **B** gibt die durchschnittliche Fluoreszenzintensität für CD41a wieder. Die obere Signifikanz zeigt an, dass die Differenzierung bei der Kontrolle funktioniert hat. Nach Zusatz von TPA kommt es zu einer Differenz zwischen mit shRNA Ktr und shRNA D transduzierten Zellen. Dieser Unterschied ist nicht signifikant. Das Signifikanzniveau ist jeweils mittels *Welsh's t-test* ermittelt. *n.s.* = nicht signifikant, *\*\** =  $p < 0,01$

Die Herunterregulation von Y14 führt auch in dem von uns etablierten Zelllinienmodell zu Apoptose. Die Zelllinie lässt sich jedoch auch weiterhin in die megakaryozytäre Reihe differenzieren.

#### 4.4 Etablierung der Überexpression von Y14

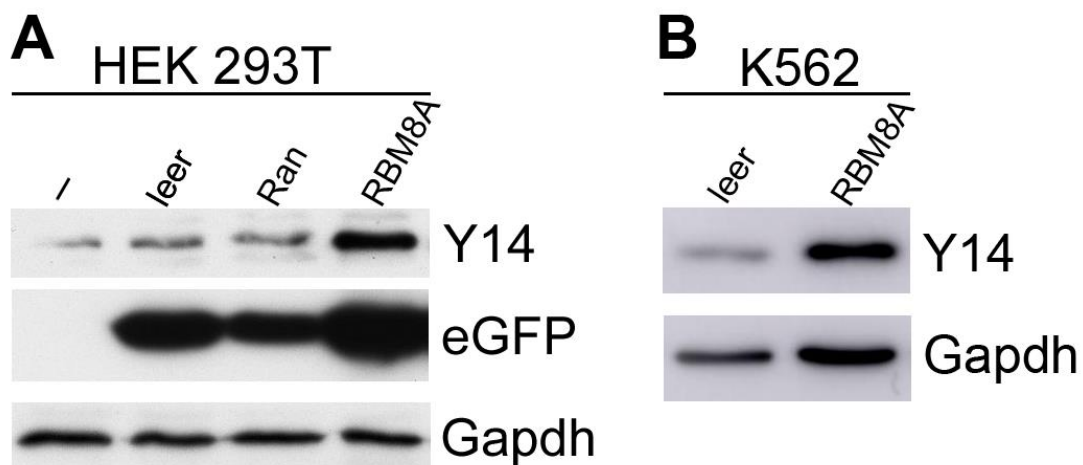
Mit dem oben etablierten Modellsystem zur Differenzierung von K562-Zellen in die megakaryozytäre Richtung sind somit Erkenntnisse zur Funktion von Y14 innerhalb der Hämatopoese und zum Verständnis der Pathogenese des TAR-Syndroms möglich. Eine direkte Behandlungsmöglichkeit legen die oben erzielten Ergebnisse aus diesem Modell jedoch nicht nahe.

Die Kombination aus Vorliegen eines seltenen SNP und der Haploinsuffizienz für *RBM8A* bei Patienten mit TAR-Syndrom führt wahrscheinlich zu einer noch geringeren Expression von Y14. Im Zellmodell ließe sich dieser Mangel mittels externem Einbringen der fehlenden genetischen Information (ektrope Expression von Y14 durch einen entsprechenden Promoter) womöglich beheben. Dies wäre ähnlich zum oben gezeigten Modell der Einbringung von shRNAs möglich. Hierzu muss ein Vektor konstruiert werden, der die genetische Information des Genes *RBM8A* trägt.

##### 4.4.1 Transfektion / Transduktion des Y14 Plasmides

Die Konstruktion eines solchen Plasmides wurde in Abschnitt 3.4.6 beschrieben. Eine Modellzeichnung des Plasmides findet sich in Abb. 5.

Die erfolgreiche Generierung des Plasmids ist mittels Restriktionsverdau und anschließender Sangersequenzierung gezeigt worden (Daten nicht gezeigt). Dies erlaubt allerdings noch keine Angaben darüber, ob Zellen in der Lage sind die cDNA zu exprimieren und Y14 zu generieren. Um dies zu prüfen, ist das *RBM8A*-tragende Plasmid zunächst in HEK 293T Zellen mittels transienter Transfektion eingebracht und anschließend lysiert worden. Parallel dazu sind im Immunoblot unbehandelte 293T-Zellen aufgetragen worden. Vergleichend wurden der Leervektor und der Vektor mit einem anderen Protein, dem Strukturprotein RanBP10, aufgetragen. Es zeigt sich eine Überexpression von Y14 bei unveränderter Gapdh-Expression (Abb. 32A). Als nächstes ist mit diesem Plasmid ein lentivirales Konstrukt generiert worden, mit dem wiederum K562-Zellen transduziert wurden. Die Transduktionseffizienz ist hier auf einem ähnlichen Niveau wie bei den shRNA tragenden Konstrukten. In diesem Fall steht allerdings keine Puromycin-Resistenz zur Verfügung, über die sich nicht transduzierte Zellen selektieren ließen. Die Überexpression ist trotzdem erkennbar (Abb. 32B). Das Protein Y14 wird sowohl nach transienter Transfektion als auch Transduktion mittels Lentiviren in den Zielzellen überexprimiert.

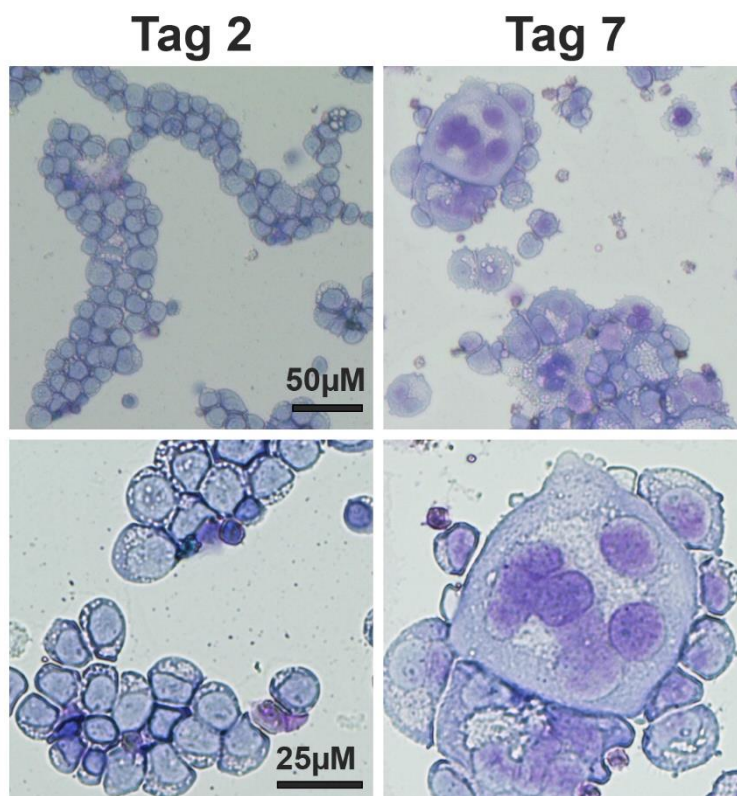


**Abbildung 32:** Immunoblot von transfizierten HEK-293-T-Zellen (**A**) und transduzierten K562-Zellen (**B**). In **A** werden 293T-Zellen unbehandelt, transfiziert mit dem pMig-Leervektor (leer), *RanBP10*-Kassette (Ran) bzw. der *RBM8A*-Kassette gezeigt. Die unterschiedlich starke Y14-Expression ist gut zu erkennen. Die transfizierten Zellen sind an der eGFP Expression zu erkennen. In **B** sind transduzierte K562-Zellen lysiert worden. Auch hier ist bei vergleichbarer Gapdh-Expression eine Zunahme der Y14-Expression zu erkennen.

#### 4.5 Etablierung eines Modells aus humanen HSZ

Ein nächster Schritt zur Entschlüsselung der Rolle von Y14 oder Evi-1 in der Megakaryopoese ist der Übergang von einer Zelllinie hin zu primären Zellen,

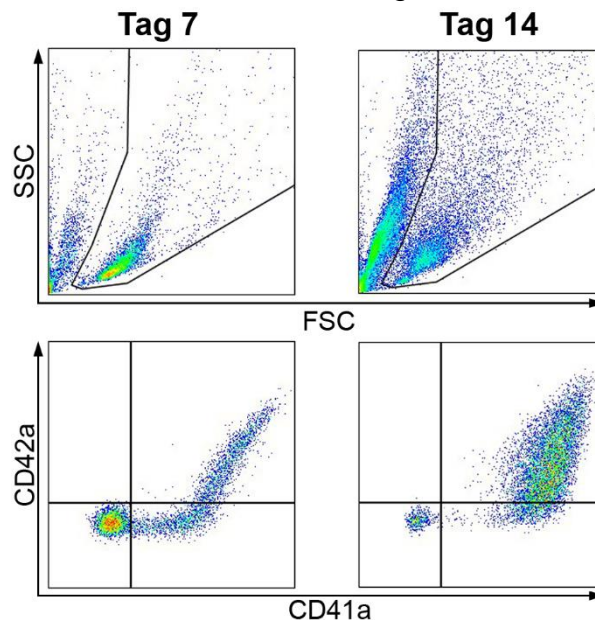
sogenannten hämatopoetische Stammzellen (HSZ). Humane HSZ sind positiv für CD34. Wichtig ist zunächst die Etablierung einer Zellkultur aus CD34+-Zellen hin zu MKs, die Proplättchen bilden und am Ende funktionale Thrombozyten abschnüren können. Wie unter Punkt 3.5.7 geschrieben, folgt die gezeigte Differenzierung dem Protokoll von Strassel *et al.* Unter Zugabe von CC220 und SR-1 ist in der Zellkultur nach einer Woche eine Größenzunahme einzelner Zellen zu erkennen. Zur Darstellung sind Zellen nach zwei und sieben Tagen Kultur mittels May-Grünwald-Lösung gefärbt und abgelichtet worden. Zu Beginn erscheinen die Zellen sehr homogen. Über die Zeit wird die Kultur der Zellen zunehmend heterogener. Hier ist neben der Größenzunahme von ca. 12  $\mu\text{m}$  auf teilweise über 75  $\mu\text{m}$  auch die zunehmende Lobulierung des Nucleus gut zu erkennen (siehe Abb. 33). Durch die jeweils gewählte Fokus-Ebene kann der Eindruck entstehen, dass ein MK mehrere Zellkerne beinhaltet. Es handelt sich jedoch stets um einen lobulierten Nucleus mit Polyploidie unter einer Kernmembran.



**Abbildung 33:** May-Grünwald-Färbung von CD34+-Zellen unter CC220- und SR1-Behandlung. Dargestellt sind CD34+-Zellen an Tag 2 und 7. An Tag 2 zeigt sich eine homogene Zellpopulation. Fünf Tage später sind einzelne, bis zu 75  $\mu\text{m}$  große Zellen mit vielfach lobuliertem Kern zu erkennen.

Die Veränderung der Zellkultur wird mittels Durchflusszytometrie überprüft. Im Scatterplot ist zu erkennen, dass ein Großteil der Zellen an Tag 2 eine homogene Population bilden, die noch positiv für CD34 ist (Daten nicht gezeigt). Im Scatterplot für Tag 7 wird zudem klar, dass lediglich ein kleiner Teil der Zellen eine massive Größenzunahme aufweist, wie

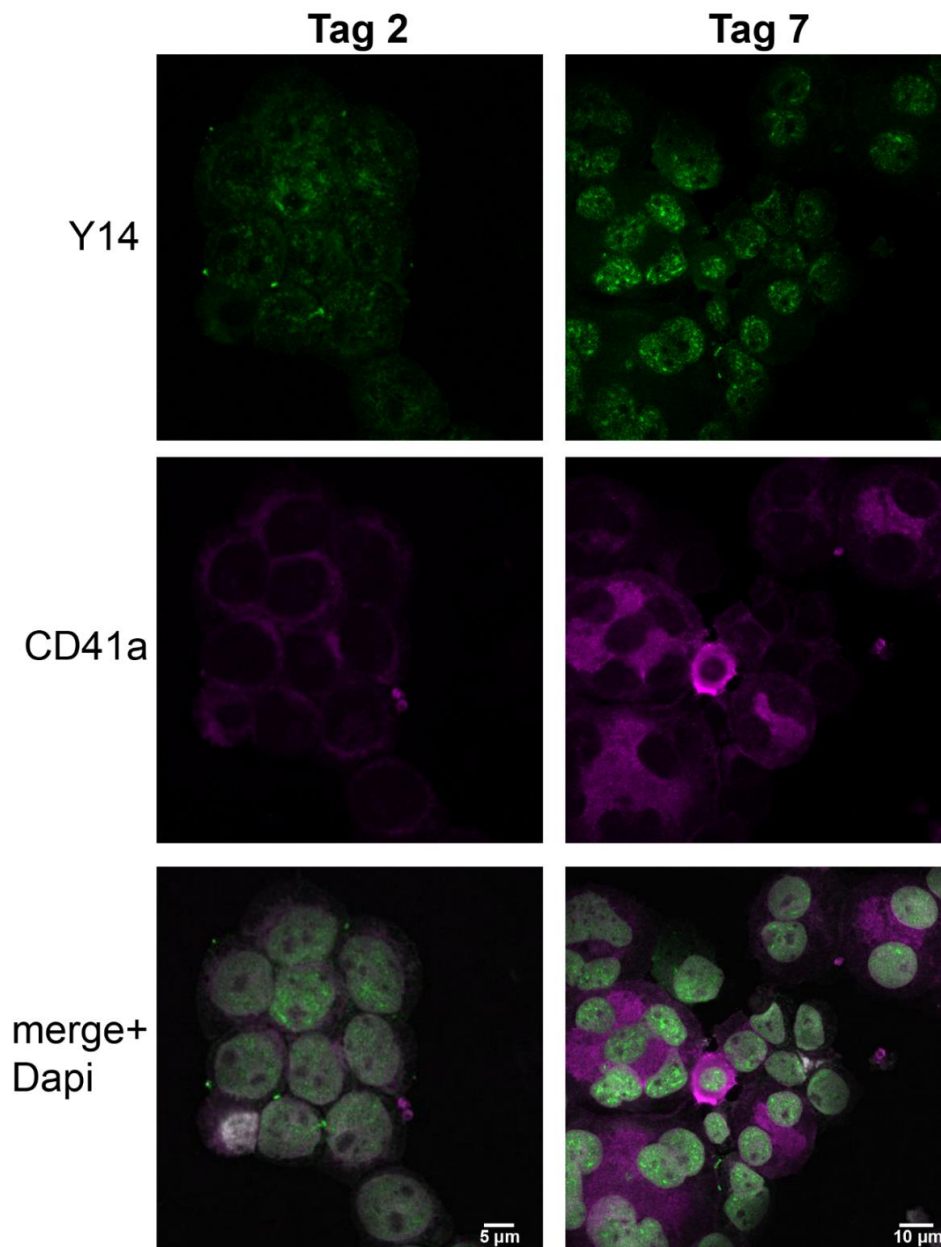
in Abb. 33 unten rechts gezeigt wird. An Tag 7 ist knapp die Hälfte aller Zellen positiv für den frühen megakaryozytären Marker CD41a. Etwas mehr als die Hälfte der CD41a-positiven Zellen sind ebenfalls positiv für den späteren Marker CD42a. Diese doppelt positiven Zellen sind demnach einen Schritt weiter in ihrer Entwicklung zu reifen MKs. An Tag 14 sind ca. 96% aller Zellen positiv für CD41a und insgesamt 84% doppelt positiv für CD41a und CD42a. Die Differenzierung war sehr effizient. Interessanterweise zeigen sich in dem Plot (Abb. 34 unten) lediglich zwei deutlich getrennte Populationen. Die Fraktion von doppelt negativen Zellen ist klar abzugrenzen. Die einzelnen Antigene werden mit der Zeit nacheinander im Rahmen der Ausreifung auf der Zelloberfläche exprimiert.



**Abbildung 34:** Durchflusszytometrische Analyse der CD34+-Kultur an Tag 7 und 14. Die beiden oberen Panel zeigen im SSC- und FSC-Scatter eine Zunahme in der Größe. Unten wird das CD41a- und CD42a-Expressionsmuster gezeigt. An Tag 7 ist circa die Hälfte aller Zellen CD41a positiv. 27% aller Zellen sind doppelt positiv für CD41a und CD42a. An Tag 14 sind 84% der Zellen doppelt positiv und nur noch knapp 5% doppelt negativ.

Die Zellzahl der Differenzierung ist relativ gering, insbesondere wenn man bedenkt, dass an Tag 7 nur knapp die Hälfte der Zellen sich in Richtung MK entwickeln. Aufgrund dessen ist die Untersuchung der Expression von Y14 und Evi-1 mittels Immunoblot nicht möglich. Die Analyse findet daher mittels Laserscanning-Aufnahmen nach vorheriger Färbung statt. Aus den oben beschriebenen Gründen war eine Färbung von Evi-1 hier nicht möglich. Die Färbungen zeigen zunächst einmal eine schwache Expression von CD41a an Tag 2 und eine Zunahme nach fünf Tagen (vergleiche Abb. 35 Mitte). Y14 ist in allen abgebildeten Zellen nachweisbar und auch auf weiteren Aufnahmen finden sich keine Y14-negativen Zellen im Gegensatz zur Differenzierung von den K562-Zellen. Die Verteilung, primär nukleär, und die Intensität der Färbung sind zwischen Tag 2 und 7

vergleichbar. Bei der Betrachtung der gezeigten Aufnahmen sind der massive Größenunterschied und die lobulierten Nuclei, die den Eindruck mehrerer Zellkerne erwecken, zu beachten. Es wurde somit ein Differenzierungssystem etabliert, mit dem in Zukunft die Analysen von der Zelllinie auf primäre HSZ übertragen werden können.



**Abbildung 35:** Laserscanning-Aufnahmen von Zellen der in Abb. 33 und 34 bereits gezeigten primären Zellkultur. Neben der Zunahme des Oberflächenantigens CD41a zeigt Y14 ein vergleichsweise ähnliches Expressionsmuster an Tag 2 und Tag 7. Zu beachten ist hier auch der enorme Größenunterschied einzelner Zellen.

## 5 Diskussion

Bereits 1929 berichtete Greenwald von einem Patienten mit einer Thrombozytopenie und Radiusaplasie [16], bevor circa 40 Jahre später dieses klinische Erscheinungsbild als *Thrombocytopenia absent Radii*-Syndrom zusammengefasst und eine Sammlung von weiteren Fällen veröffentlichte wurde [18]. Bis zum heutigen Zeitpunkt ist die genaue Pathogenese der Erkrankung ungeklärt. Im Jahr 2007 erfolgte bei 30 Patienten der Nachweis einer Mikrodeletion auf Chromosom 1 [28]. Das Vorhandensein der Mikrodeletion bei nicht betroffenen Eltern wies darauf hin, dass es einen weiteren Faktor zur Ausbildung des TAR-Syndroms benötigt. 2012 erfolgte schließlich an einer Kohorte von 53 Patienten der Nachweis von zwei verschiedenen *single-nucleotide-polymorphisms* (SNPs), einmal im 5'UTR und einmal im ersten Intron des Genes *RBM8A*, welches im oben erwähnten Mikrodeletionsbereich liegt [31]. Der Zusammenhang zwischen den beiden beschriebenen genetischen Veränderungen (Mikrodeletion und einer der SNPs) mit dem TAR-Syndrom ist statistisch hoch signifikant nachgewiesen worden. Jedoch fehlt bis zum heutigen Tag ein experimentelles Setting, welches diese Daten bestätigt. Aktuell sind in der Literatur lediglich drei Fälle von TAR-Patienten beschrieben, bei denen keiner der beiden SNPs nachgewiesen werden konnte [31, 32].

### 5.1 Auswirkungen des SNPs auf Blutwerte

#### 5.1.1 Einfluss durch die Art der Datenerhebung

Für die Analyse von Blutwerten der TAR-Patienten haben wir auf die umfangreichen Patientenakten der von uns betreuten Patienten zurückgegriffen. Aus allen durch primäre Einrichtungen und uns erhobenen Befunden und Dokumenten wurden die Blutwerte systematisch extrahiert und die Daten analysiert, gelegentlich mussten dafür die Einheiten der einzelnen Werte angepasst werden. Viele TAR-Patienten waren insbesondere während ihrer frühen Kindheit in intensiver ärztlicher Behandlung und erhielten regelmäßige Kontrollen des Blutbildes, diese entstanden meistens unabhängig von akuten Krankheitssymptomen. Abseits dieser Routinekontrollen greifen wir mitunter auf Werte zurück, die im Rahmen von Erkrankungen erhoben worden sind. Wir haben jedoch versucht, dies weitestgehend zu vermeiden. Genauso wurden, soweit ersichtlich, Bluttransfusionen ausgeschlossen. Aus den Patientenakten sind diese Informationen jedoch nicht an allen Stellen lückenlos zu identifizieren. Hier besteht sicherlich die Möglichkeit eines sogenannten *Reporting-Bias*. Das bedeutet, dass insbesondere die

herausragenden Blutwerte berichtet werden und der Normalbefund unter Umständen nicht erwähnt wird. Auffällig ist zudem, dass für die Patienten mit 5'UTR wesentlich mehr Blutwerte hinterlegt sind. So kommen im Schnitt 5,5 Thrombozytenwerte auf einen Patienten, bei der Gruppe mit SNP im ersten Intron sind es lediglich drei pro Patient. Die behandelnden Ärzte, dazu zählt unsere Arbeitsgruppe genauso wie jeweilige wohnortnahe Ansprechpartner, haben die Entscheidungen für weitere Kontrollen stets vom individuellen Krankheitsverlauf des einzelnen Patienten abhängig gemacht. Die erhöhte Anzahl von Werten bei den Patienten mit 5'UTR kann im Hinblick auf das jüngere Alter vor allem mit häufigeren klinischen Auffälligkeiten begründet werden.

Eine Schwierigkeit, die sich aus dieser Art der Datenerhebung ergibt, ist die unterschiedliche Art der Blutbildkontrollen. Es gilt zu beachten, dass die Normwerte daher voneinander abweichen können. Einen Einfluss haben auch die unterschiedlichen Gerätetypen oder, beim Differentialblutbild, die manuelle Zählung. Die Normwerte unterscheiden sich allerdings nicht in großen Maßstäben, sodass vor allem Werte um den jeweils eingezeichneten Normwert fehlinterpretiert werden. Insbesondere bei der Thrombozytenzahl schwanken die Normwerte der jeweiligen Geräte auch abhängig vom Alter nur in sehr geringem Maße, sodass die Daten hier doch gut miteinander vergleichbar sind. Auch beim Blutbild der roten und weißen Reihe sind in der Analyse vor allem die starken Ausreißer (massive Leukozytose und deutliche Anämie) beurteilt worden, die unabhängig von der Messmethode und der genutzten Geräte als pathologisch anzusehen sind.

Bei der Analyse der Blutwerte ist stets zu bedenken, dass es für einen einzelnen (pathologischen) Wert, beispielsweise einen niedrigen Hämoglobin-Wert, neben des eventuell ursächlichen TAR-Syndroms zahlreiche weitere denkbare Ätiologien gibt, die eine Schwankung begründen können.

Bei unserer durchgeführten Studie handelt es sich um eine retrospektive Analyse. Diese sind mit bekannten Problemen, unter anderem dem oben ausgeführten *Reporting Bias*, verknüpft. Eine Alternative wäre die Durchführung einer prospektiven Studie, welche in regelmäßigen Abständen über einen definierten Zeitraum Blutentnahmen vorsieht. Dies ist aufwendig und bei der sehr geringen Patientenzahl ist es schwierig, ausreichend Probanden für diese Studie zu finden. Zudem wären die zusätzlichen Blutentnahmen ohne ärztlichen Grund insbesondere bei Kindern ethisch problematisch.

Ein weiterer auffälliger Unterschied in unserer Kohorte ist die Verteilung der Geschlechter. In der Gesamtkohorte finden sich 50% mehr Frauen als Männer. Auch in der Literatur finden sich stets mehr betroffene Frauen als Männer [27]. Eine Erklärung für dieses Phänomen ist bisher nicht gefunden worden. Eine genetische Ursache hierfür scheint ausgeschlossen, da es sich nicht um eine gonosomale Erkrankung handelt. Eine andere augenscheinliche ungleiche Verteilung ergibt sich bei den Gruppen selbst. Circa zwei Drittel der beschriebenen Patienten tragen den 5'UTR-SNP, während 37% den intronischen SNP tragen. Interessant ist dieses Verhältnis vor allem in Zusammenhang mit der veröffentlichten Kohorte von Albers *et al.* mit 53 Patienten bei denen zwölf Patienten den Intron 1-SNP tragen (23%), wobei neun davon aus unserer Kohorte stammen. Eine weitere Auffälligkeit ist, dass die MAF der beiden SNPs (von ca. 0,5% und ca. 3%) vermuten lässt, dass es sechsmal mehr Fälle von Patienten mit 5'UTR-SNP geben müsste. Dies können wir insbesondere in unserer Kohorte so nicht beobachten. Hier bleibt die Frage, ob es einen weiteren Zusammenhang zwischen SNP und Ausbildung der Mikrodeletion gibt oder ob der 5'UTR-SNP auch bereits intrauterin pathogener als der Intron 1-SNP ist, sodass bereits viele betroffene Feten intrauterin versterben.

### **5.1.2 Thrombozytenzahl abhängig vom jeweiligen SNP**

Albers *et al.* haben in dem 2012 erschienenen Artikel keinen Zusammenhang zwischen der Anzahl von Thrombozyten im peripheren Blut mit einem der beiden SNPs feststellen können [31]. Dies steht im Gegensatz zu den in Abschnitt 4.1.2. gezeigten Daten. Hier ist zum ersten Mal nachgewiesen, dass es einen signifikanten Unterschied der Thrombozytenzahlen zwischen den Trägern mit unterschiedlichem SNP gibt. Patienten, die den SNP im ersten Intron tragen, haben insbesondere im frühen Kindesalter eine höhere Anzahl an Thrombozyten im peripheren Blut. In dem zitierten Artikel wird der Einfluss der SNPs auf die Thrombozytenzahl an einer Kohorte von über 7.000 gesunden Kontrollen mit einmalig registriertem Thrombozytenwert untersucht. Unter diesen gab es sieben homozygote Träger des 5'UTR-SNPs, bei denen genauso wie bei den heterozygoten Trägern kein Zusammenhang mit der Thrombozytenzahl gezeigt werden konnte. In unserer Analyse beziehen wir uns jedoch auf den Einfluss der SNPs bei TAR-Patienten, also einer grundsätzlich anderen Kohorte. Für diese Analyse verwendeten Albers *et al.* lediglich den höchsten und niedrigsten dokumentierten Wert und keine Verläufe, sodass dadurch ein Effekt eventuell maskiert wurde. Diese Methode ist zudem



sehr anfällig für Ausreißer: Ein Patient mit stets niedrigen Werten und einem hohen Ausreißer im Normbereich wird ähnlich gewertet, wie ein Patient mit Normalwerten und einem tiefen Ausreißer. In dieser Studie zeigen wir nun zum ersten Mal Einzelmessungen und Verläufe der Thrombozytenzahlen von insgesamt 38 Patienten, getrennt nach den beiden SNPs, teilweise über einen Zeitraum von 20 Jahren hinweg. Es wurden insgesamt 174 Thrombozytenwerte und damit durchschnittlich mehr als vier Werte pro Patient analysiert.

Bei der Betrachtung der Thrombozytopenien beim TAR-Syndrom ist zu bedenken, dass es nach aktueller Lehrmeinung [22], basierend im Wesentlichen auf den Beobachtungen von Hall und Hedberg [18, 19], im Laufe der ersten Lebensjahre zu einer Erholung der Thrombozytenwerte kommt. Da die Gruppe mit Intron 1-SNP in unserer Kohorte im Durchschnitt vier Jahre älter ist als die Gruppe von Patienten mit 5'UTR-SNP, kann ein Einfluss des Alters auf das Ergebnis nicht vollständig ausgeschlossen werden. Dieser Unterschied wird bei der Betrachtung der Mediane von 3 Jahren (5'UTR-SNP) bzw. 19 Jahren (Intron 1-SNP) noch einmal deutlicher. Lediglich drei erfasste Werte von Patienten mit Intron 1-SNP liegen unterhalb von 80 Thrombozyten pro nL. Diese sind zudem innerhalb der ersten Lebenswochen aufgefallen und erholten sich in zwei von drei Fällen rasch (für den dritten Fall gibt es keine weiteren Daten). Vergleicht man weiterhin die repräsentativen Thrombozytenwerte anhand des Alters beim letzten dokumentierten Arztbesuch (Abb. 14), ist insbesondere in der sehr sensiblen Zeit der ersten beiden Lebensjahre eine strenge Trennung der Gruppen zu erkennen. Aus Abb. 10 ist zu entnehmen, dass es einzelne Patienten gibt, die auch nach über zehn Lebensjahren deutlich thrombozytopen sind und bleiben. Alle tragen den SNP im 5'-UTR. Interessanterweise gibt es, wie oben bereits erwähnt, drei Patienten (TARS-01, 25, 26) bei denen aufgrund fehlender Thrombozytopenien das TAR-Syndrom ursprünglich nicht diagnostiziert worden ist. Erst später fiel bei genaueren Betrachtungen auf, dass die Werte meistens knapp unterhalb des Normwertes verliefen. Alle Patienten tragen neben der Mikrodeletion den intronischen SNP in *RBM8A*. Bei unsicherer klinischer Diagnose konnte das TAR-Syndrom in diesen Fällen genetisch sicher diagnostiziert werden. Es ist also durchaus denkbar, dass es weitere Patienten gibt, bei denen leicht thrombozytopen Blutwerte übersehen werden und bei denen daher nicht an das Vorliegen eines TAR-Syndroms gedacht wird. Dies ist nach unserer Auffassung, vergleichbar zu den drei Fällen, eher bei Patienten mit dem intronischen SNP zu erwarten. Thrombozytenzahlen

sind nur ein indirekter Hinweis auf eine eventuelle Blutungsneigung und damit klinisch relevant. Neben der reinen Quantität kommt es durchaus auch auf die Qualität (das Vorliegen von Thrombozytenfunktionsstörungen) an. Zum *Monitoring* einer relevanten Blutungsneigung gehört vor allem die ausführliche Dokumentation (das Vorhandensein und die Ausprägung) der Klinik: Petechien, Hämatome (insbesondere an Prädilektionsstellen), Schleimhautblutungen nasal, oral und anal, ungewöhnlich starke Blutungen bei Bagatellverletzungen, Menorrhagien (verstärkte und längere Regelblutungen). In der gesamten Kohorte finden sich zwei Patienten, die von massiven Blutungen betroffen waren. TARS-03 hat intrakranielle Blutungen gehabt, TARS-08 ist an massiven Blutungen verstorben. Bei TARS-08 ist der SNP nicht untersucht worden, TARS-03 hat den SNP im 5'UTR.

### 5.1.3 Patienten mit 5'UTR-SNP neigen zu Anämien

Neben den deutlichen Thrombozytopenien fiel bei einigen Patienten eine starke Anämie auf, besonders im frühen Kindesalter. Diese trat oftmals unmittelbar postnatal auf oder im Verlauf des ersten Lebensjahres, insbesondere rund um die sogenannte Trimenonanämie. Hier fällt die Hämoglobinmenge aufgrund der Umstellung von fetalem auf adultes Hämoglobin physiologisch ab. Aus der oben gezeigten Abb. 10 geht hervor, dass hiervon vor allem Patienten mit 5'UTR-SNP betroffen sind. Es gibt einen Patienten mit Intron 1-SNP, der ebenfalls in der Neonatalperiode aufgrund einer Anämie in stationärer Behandlung war (TARS-25). Dies taucht in der oben gezeigten Analyse nicht auf, da wir uns entschieden haben, maximal einen Wert innerhalb von drei Monaten in die Analyse miteinzubeziehen. Es handelt sich zudem um ein einmaliges Ereignis im Gegensatz zu anderen Patienten, die mehrfach anämische Werte aufweisen. Aus Abb. 14 geht jedoch eindeutig hervor, dass sich innerhalb der ersten fünf Lebensjahre bei allen beobachteten Fällen die Anämie weitestgehend erholt. In den anderen erhobenen Werten ließen sich keine weiteren Auffälligkeiten erkennen. Die Anämien sind stets normozytär und normochrom (bis auf eine Ausnahme: TARS-43), sodass häufige Ursachen, die diese Faktoren mitbeeinflussen, wie beispielsweise ein Eisenmangel, ausgeschlossen werden können.

Interessant ist dieser Aspekt vor allem unter dem Gesichtspunkt, dass innerhalb der Mikrodeletionsregion das *HFE2*-Gen (oder *HJV*-Gen) liegt. Mutationen in diesem Gen führen zu einer schweren Verlaufsform der Hämochromatose, die bereits im jugendlichen Alter beginnt [84]. Patienten mit juveniler Hämochromatose fallen schon in frühen

Lebensjahren mit massiver Eisenüberladung auf, die sich unter anderem durch Kardiomyopathien, Athropathien und Leberzirrhose äußert. Die Erhärtung einer Verdachtsdiagnose gelingt in der Regel über den Nachweis eines massiv erhöhten Ferritin-Wertes. Aus diesem Grund ist bei einer Testkohorte von elf Patienten einmalig der Ferritin-Wert nach Ausschluss akuter Erkrankungen festgestellt worden. Alle gemessenen Werte lagen innerhalb oder knapp außerhalb des Normbereiches, sodass sich hieraus keine Hinweise auf die Beteiligung des Eisenhaushaltes an den oben beschriebenen Anämien ableiten lassen.

Die beiden Anämien, die im Alter von über 15 Jahren auftreten, scheinen singuläre Ereignisse zu sein. Zu Bedenken ist stets, dass Anämien ein häufiges Krankheitsbild darstellen. Bei der Anzahl der registrierten Werte und dem Nachweis von anämischen Verläufen bei einigen Patienten mit 5'UTR in den ersten Lebensjahren ist jedoch eine andere Ursache außerhalb der Grunderkrankung unwahrscheinlich. Soweit es in den Akten nachvollziehbar dokumentiert war, wurden akute Blutungen (zum Beispiel gastrointestinale mittels Hämokult-Test) als Anämie Ursache ausgeschlossen.

#### **5.1.4 Kein SNP-abhängiger Einfluss in der Leukozyten-Ausreifung**

Innerhalb der weißen Blutzellreihe ist kein Einfluss der SNPs auf die peripheren Blutwerte zu erkennen. 9 von 13 dokumentierten Fällen zeigen eine typische massive Erhöhung der Leukozyten postnatal, die sich aber immer innerhalb von wenigen Tagen nach der Geburt normalisiert. Bei den gezeigten Fällen konnte weder eine Assoziation zum SNP, noch zu niedrigen Thrombozytenwerten gefunden werden. Auf eine Auswertung einzelner Differential-Blutbilder (z.B. eosinophile Granulozyten) wurde aufgrund der sehr geringen Anzahl verzichtet.

In einigen Publikationen wird das TAR-Syndrom den *bone-marrow-failure*-Syndromen (BMFS) zugeordnet [85-87]. *BMFS* ist die Zusammenfassung verschiedener Erkrankungen, bei denen es im Laufe der Zeit zu einem Versagen der hämatopoetischen Funktion des Knochenmarks kommt. Zudem sind diese Erkrankungen in der Regel durch ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von sekundären Leukämien bzw. soliden Tumoren gekennzeichnet. Für die Fanconi-Anämie, die zu den BMFS zählt, liegt die Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung von malignen hämatologischen Auffälligkeiten bis zum 40. Lebensjahr bei 90%. 13% aller Betroffenen entwickeln bis zum 50. Lebensjahr eine akute myeloische Leukämie, die meistens erstmals zwischen dem 15. und 35.

Lebensjahr diagnostiziert wird [88]. Aktuell sind in der Literatur für das TAR-Syndrom fünf Fälle beschrieben, bei denen sich eine maligne Erkrankung des hämatopoetischen Systems entwickelt hat [32, 89-92]. In der oben beschriebenen Kohorte kam es bei keinem einzigen der beschriebenen Patienten im jeweiligen Beobachtungszeitraum zur Entwicklung einer malignen hämatopoetischen Erkrankung. Auch auf die Entwicklung eines Knochenmarksversagens gibt es keine Hinweise. Keiner der Patienten zeigte ab einem gewissen Alter eine zunehmende Anämie oder eine verstärkte Thrombozytopenie als Zeichen einer Knochenmarkfehlfunktion bzw. eines myelodysplastischen Syndroms. Diese Beobachtungen entsprechen somit nicht den oben beschriebenen Veränderungen bei Patienten mit Fanconi-Anämie. Eine Einordnung des TAR-Syndroms als BMFS und damit der direkte Vergleich mit Erkrankungen, die mit einer relativ hohen Wahrscheinlichkeit eine Leukämie auslösen können, ist aus unserer Sicht daher wenig sinnvoll.

#### **5.1.5 Einfluss der SNPs**

Bei dem SNP im 5'UTR weiß man, dass er zu einer neuen Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor Evi-1 führt. Fraglich bleibt jedoch weiterhin, ob dieses tatsächlich ursächlich für den Mangel an MKs und damit für die Thrombozytopenie ist bzw. ob es einen Einfluss auf die Radiusaplasie hat. Gänzlich ungeklärt ist die Auswirkung des Intron 1-SNPs innerhalb dieser pathologischen Prozesse. Hier konnten zwar bioinformatisch veränderte Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren MZF1 und RBPJ gezeigt werden, in biochemischen Experimenten konnten diese veränderten Bindungseigenschaften an die DNA jedoch nicht bestätigt werden [31].

Interessanterweise gibt es Berichte darüber, dass Punktmutationen innerhalb von *EVI1* ebenfalls zu einem Erkrankungsbild führen können, bei dem es zu einer radioulnären Synostose und einer amegakaryozytären Thrombozytopenie kommt. Bei diesen Fällen fehlt ebenfalls die experimentelle Bestätigung, dass die nachgewiesene Genetik kausal ist. Jedoch legt der Zusammenhang zwischen Punktmutation und klinischem Erscheinungsbild nahe, dass die Expression von Evi-1 einen Einfluss auf die Entwicklung von Thrombozyten und der oberen Extremität nehmen kann [23].

Neben der möglichen Einflussnahme von Transkriptionsfaktoren auf die Veränderungen beim TAR-Syndrom gibt es viele weitere Möglichkeiten, bei denen die Proteinbiosynthese

aufgrund eines einzelnen SNPs im nicht codierenden Bereich entscheidend beeinflusst werden kann.

### 5.1.6 Relevanz der genetischen Befundung

Die genetische Bestätigung des klinisch diagnostizierten TAR-Syndroms ist aus unserer Sicht aus verschiedenen Gründen unerlässlich. Zum einen lässt sich so die klinisch gefasste Diagnose zweifelsfrei nachweisen, zum anderen lassen sich klinisch nicht eindeutige Fälle abklären. Die insgesamt sehr geringe Fallzahl macht es nötig, weiterhin möglichst viele Fälle mit genetischer Diagnostik zu dokumentieren und zu sammeln, damit auch weitere Untersuchungen zum Beispiel einen möglichen Zusammenhang zu den skeletalen oder weiteren Fehlbildungen aufzeigen können. Weiterhin besteht die Frage, welche konkreten Konsequenzen die vollständige genetische Diagnose für jeden einzelnen Patienten mit sich bringt. Aus den gezeigten Daten ergibt sich bereits eine klare Prognose für den Verlauf der Thrombozytenzahlen. Patienten mit Intron 1-SNP erholen sich demnach viel schneller von eventuellen postnatalen Thrombozytopenien und benötigen weniger Blutkontrollen und könnten auch früher einer möglichen orthopädischen Korrektur einzelner Fehlbildungen zugeführt werden. Andersherum kann der 5'UTR-SNP als Risikofaktor für einen längeren Verlauf sehr niedriger Thrombozytenzahlen gewertet werden, sodass abhängig von diesem Wissen Werte anders bewertet und Kontrollen und eventuell Therapien anders geplant werden können. Hinzu kommt, dass bei konkretem Kinderwunsch der Eltern, der Geschwister oder der Betroffenen selbst eine genetische Diagnostik des SNPs sowie der Mikrodeletion die Grundlage jeder genetischen Beratung ist. Denn anders als in vielen, auch aktuellen Fallberichten und Übersichtsartikeln noch fälschlicherweise erwähnt, handelt es sich beim TAR-Syndrom nicht um einen autosomal-rezessiven Erbgang der *per se* mit 25%iger Wahrscheinlichkeit weitere Geschwister betrifft [22].

## 5.2 Zellkultur-basierte Untersuchungen

### 5.2.1 Differenzierung von K562 Modell

Differenzierungsmodelle von K562-Zellen zu unterschiedlichen Blutzellen-Typen sind in zahlreichen Artikeln beschrieben, u.a. bei [75, 77]. Tetradekanoylphorbol-acetat (TPA), auch als Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) bezeichnet, und Staurosporin werden wiederholt eingesetzt, um eine Differenzierung in die Megakaryopoese zu induzieren. Die Dosierungen dieser Reagenzien schwanken sehr stark: 2 nM TPA bei Conde *et al.* [93]

und 40 nM TPA bei Maicas *et al.* [94]. Ähnlich variabel sind ebenfalls die eingesetzten Zellzahlen zu Beginn der Stimulation. Ebenfalls sehr unterschiedlich sind die gewählten Kontrollen zur Überprüfung der erfolgreichen Differenzierung. Das von uns etablierte Differenzierungsmodell wird mit dem Rückgang des Oberflächenantigens CD235a, als später Erythrozyten-Marker, kontrolliert. Wichtiger ist jedoch die erhöhte Expression von CD41a. Dieses Oberflächenantigen gilt als eines der ersten linienspezifischen Marker für die megakaryozytäre Entwicklung und spiegelt damit am ehesten den Zeitpunkt innerhalb der Differenzierung wider, an dem wir einen Effekt auf die megakaryozytäre Entwicklung innerhalb des TAR-Syndroms vermuten.

Es ist gut dokumentiert, dass die Zugabe von TPA zu einer Differenzierung der K562-Zelllinie führt. Dieser Effekt beruht wahrscheinlich auf der bekannten Wirkung von TPA bei der konstitutiven Aktivierung der Proteinkinase C. Dadurch wird die Zusammensetzung der Transkriptionsfaktoren beeinflusst und die Zellen werden in die megakaryozytäre Linie gedrängt, ausgedrückt wird dies durch die Veränderung des Profils der exprimierten Oberflächenantigene. Genauere Beschreibungen der Effekte von TPA innerhalb von humanen Zellen bestehen nicht. Daher ist es möglich, dass einige gezeigte Effekte (zum Beispiel innerhalb der Proteinexpression) direkt auf der Wirkung von TPA beruhen und nicht auf die ausgelöste megakaryozytäre Differenzierung der K562-Zellen zurückzuführen sind.

Wie oben beschrieben (Kapitel 4.2.2) führt die Differenzierung mittels TPA zu einer Reduktion der Expression des Proteins Evi-1 in K562-Zellen. Dieser Effekt ist in mehreren unabhängig wiederholten Experimenten aufgefallen, sodass der Eindruck entstehen könnte, dass Evi-1 in der Megakaryopoese zum untersuchten Zeitpunkt (und in dem untersuchten Zellsystem) keinen signifikanten Einfluss mehr auf die Zellen nimmt. Maicas *et al.* haben jedoch in einem vergleichbaren Experiment einen umgekehrten Effekt von TPA auf die Evi-1-Expression in K562-Zellen beschrieben [94]. Bei ihrer Analyse sind die Expressionslevel ebenfalls mittels Immunoblot bestimmt worden. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen liegt in der Biologie von Zelllinien. Zunächst gibt es von vielen Zelllinien oftmals verschiedene Klone, die sich in einigen Aspekten sehr unterschiedlich verhalten können. Des Weiteren sind bei langer Kulturdauer ebenfalls weitere genetische Aberrationen möglich, die Einfluss auf die Zellbiologie nehmen können.

Auch das Protein Y14 war in unseren Studien nach der Zugabe von TPA im Immunoblot bei gleichbleibender Proteinbeladung schwächer nachzuweisen (siehe Abb. 22). Bei der mittels TPA induzierten Differenzierung der K562-Zellen scheint es – ähnlich wie Evi-1 – eine untergeordnete Rolle zu spielen. Zu beachten ist, dass es einzig unter TPA zu einem Proliferationsstopp innerhalb der Zellpopulation kommt, dies ist deutlich an der Zellzahl an Tag drei zu erkennen. Eine verstärkte Apoptoserate konnten wir als alternative Erklärung für die reduzierten Zellzahlen nicht nachweisen. Sowohl Staurosporin als auch DMSO haben in den von uns gewählten Konzentrationen keinen vergleichbaren Effekt. Der Proliferationsstopp kann auch als Indiz für die Differenzierung gewertet werden, denn durch eine weitere Differenzierung verlieren Zellen generell, demnach auch innerhalb der Hämatopoese, die Eigenschaft der Proliferation.

Bei der durchgeführten Differenzierung und den Aufnahmen im konfokalen Laserscanning-Immunofluoreszenzmikroskop fielen einzelne Zellen auf, die auch im Zellkern nur sehr schwach positiv für Y14 waren. Einzelne für Y14 negative Zellen könnten die Unterschiede im Immunoblot teilweise erklären. Die für Y14 negativen Zellen unterscheiden sich weder im Durchlicht noch in der DAPI-Färbung von den anderen Zellen. Es ist denkbar, dass Y14 als Teil des EJC innerhalb der Differenzierung oder bei ausdifferenzierten Zellen, im Vergleich zur massiven Proliferation zuvor, eine veränderte Rolle wahrnimmt,.

Innerhalb der konfokalen Mikroskopie sind die Daten zu Evi-1 nicht auswertbar gewesen. Alle Zellen lieferten mit dem verwendeten Antikörper ein unspezifisches Signal. Dieses lässt sich ebenfalls auf den Immunoblots bei einer Größe von ca. 40 kDa nachweisen (Daten nicht gezeigt). Da die Identifizierung über die Proteingröße in den LSM-Aufnahmen nicht möglich ist, lässt sich das unspezifische Signal nicht von dem spezifischen trennen.

Über alle durchgeführten LSM-Bilder (inklusive nicht gezeigter Aufnahmen) ist stets ein ähnliches Verteilungsmuster von Y14 innerhalb der einzelnen Zelle zu erkennen. Im Zytoplasma findet sich ein gleichmäßiges und schwaches Signal, wohingegen der Zellkern ein starkes Signal für Y14 liefert. Dieses ist nicht gleich verteilt, sondern es gibt innerhalb des Zellkernes Regionen mit starken Y14-Signal und andere Teile, die gänzlich frei von Y14 sind. Diese freien Teile könnten die Nucleoli sein. Für den diesbezüglichen Nachweis sind jedoch zukünftig weitere Co-Färbungen notwendig. Eine genaue

Zuordnung von Y14 zum Zentrosom – zumindest während der M-Phase des Zellzyklus – wie es Ishigaki *et al.* gezeigt haben, ist aus den oben gezeigten Abbildungen allerdings nicht möglich [53].

### 5.2.2 Y14-Herunterregulation und Differenzierung

Als nächstes sollte zur Etablierung eines der Megakaryopoese beim TAR-Syndrom ähnlichen Modelles das Protein Y14 in einer möglichst gut vergleichbaren Zielzelle herunterreguliert werden. Die Reduktion der Expression von Y14 lässt sich in Thrombozytenlysaten von TAR-Patienten zeigen [31]. Die Mikrodeletion scheint keinen größeren Einfluss auf die Expressionsstärke in Thrombozyten zu haben, die Träger einzelner SNPs ohne Mikrodeletion zeigen keine reduzierte Menge an Y14 in Thrombozytenlysaten. Wichtig bei dieser Betrachtung ist weiterhin, dass die Untersuchungen von Thrombozyten lediglich Rückschlüsse auf reife MKs zulassen, die diese freigesetzt haben. Auf MKs, die nicht ausdifferenziert oder apoptotisch werden, können leider keine direkten Rückschlüsse gezogen werden.

Die Vermutung, dass die Ausdifferenzierung an geringeren Mengen Y14 scheitert, liegt zwar nahe, lässt sich aber mit den bislang durchgeführten Experimenten nicht endgültig nachweisen. Für diesen Zusammenhang ist es nötig, in das beschriebene Differenzierungsmodell eine effektive Herunterregulation des Proteins Y14 einzufügen. Hierfür sind ab Abschnitt 4.3 lentivirale Vektoren auf Basis des pGIPZ-Plasmides verwendet worden. Diese tragen eine für Y14 spezifische shRNA. Die Herunterregulation der Expression von Y14 in HeLa-Zellen gelang effektiv und ohne den Zusatz von Puromycin. K562-Zellen sind hingegen der viralen Transduktion wesentlich schwieriger zugänglich. Dies hat verschiedene Ursachen. Während HeLa-Zellen dafür bekannt sind, unter relativ einfachen Bedingungen fremde DNA aufzunehmen und zudem eine adhärente Zelllinie sind, was das Transduktionsprotokoll weiterhin vereinfacht, ist die Infektionsrate bei K562-Zellen als klassische Suspensionszelllinie deutlich geringer. Hinzu kommt, dass, wie aus Abb. 7 zu entnehmen ist, unmittelbar vor dem CMV-Promoter eine Bleomycin-Kassette liegt. Es ist möglich, dass diese den CMV-Promoter in der Expression beeinflusst. Die Puromycin-Resistenz-Kassette, die neben der shRNA- und der turboGFP-Kassette in dem Vektor enthalten ist, bietet zumindest die Möglichkeit, geringe Transduktionsraten mittels Puromycin-basierter Selektion auszugleichen. In untransduzierten Zellen führt Puromycin allerdings unter anderem zu einer Unterbrechung der Proteinbiosynthese und verhindert dadurch die weitere Proliferation



der Zelle [95]. Hieraus ergibt sich der Nachteil, dass bei allen folgenden Experimenten keine unbehandelten K562-Zellen als zusätzliche Kontrolle verwendet werden konnten.

Die größere apoptotische Fraktion unter einer effektiven Herunterregulation von Y14 ist, in Anbetracht der bereits veröffentlichten Daten [31, 52, 54], ein erwartbares Ergebnis. Bis dato fehlte allerdings der Nachweis, dass dies auch in einer hämatopoetischen Zelle erfolgt. Ein weiterer interessanter Effekt, der sich sowohl in den Immunoblot-Auswertungen (Abb. 27) als auch in der Durchflusszytometrie (Abb. 26) gezeigt hat, ist, dass die mit dem shRNA Ktr Vektor transduzierten Zellen mehr turboGFP exprimieren. Dieser Effekt zeigte sich in allen durchgeführten Experimenten und wird bei zunehmender Puromycin-Konzentration noch weiter verstärkt. Die aufgenommene virale DNA und damit auch die dadurch eingebrachten Expressions-Kassetten enthalten keine Introne, zur Translation der hierdurch kodierten Proteine wird der EJC somit nicht benötigt. Die Herunterregulation von Y14 ist hier demnach nicht direkt ursächlich. Pro turboGFP-Kopie wird jeweils eine shRNA-Kopie über einen gemeinsamen CMV-Promoter abgelesen. Eine starke turboGFP-Produktion kennzeichnet also gleichzeitig auch eine hohe shRNA-Translation. Das stärkere turboGFP in der Kontrolle ist als weiteres Indiz zu werten, dass eine starke Y14-Herunterregulation nicht mit der physiologischen Funktion einer Zelle zu vereinbaren ist und sehr wahrscheinlich in die Apoptose mündet.

Das erneut durchgeführte Differenzierungsprotokoll funktionierte auch nach der Transduktion mittels lentiviraler Konstrukte, wie der Vergleich der Zellklone mit Lösemittelkontrolle (0,1% DMSO) und TPA zeigt. Über die Wiederholung von insgesamt fünf unabhängigen Experimenten war kein signifikanter Unterschied zwischen den Populationen mit der *non-silencing*-shRNA (shRNA Ktr) und mit der gegen Y14-gerichteten shRNA (shRNA D) zu erkennen. Im Durchschnitt differenzieren die mit shRNA D transduzierten Zellen schlechter, was sich insbesondere bei der geoMFI des Antikörpers gegen CD41a zeigt. Dieser Unterschied war in jedem einzelnen unabhängig durchgeführten Experiment deutlich zu erkennen. In der Zusammenschau sind diese Unterschiede – wie erwähnt – statistisch nicht signifikant. Der Unterschied könnte jedoch bei einer Erhöhung der unabhängig durchgeführten Experimente signifikant werden. Wichtig ist jedoch das klare Indiz: K562-Zellen mit Herunterregulation von Y14 differenzieren schlechter in die megakaryozytäre Reihe als die entsprechende Kontrolle. Interessant ist dieses Ergebnis vor allem deshalb, da – wie oben gezeigt (Kapitel 4.2.2) und diskutiert (5.2.1) – bei untransduzierten Zellen Y14 während und nach der

Differenzierung kaum nachweisbar ist. Die Reduzierung von Y14 scheint also auch in einem System, in dem die Expression von Y14 schon durch andere Faktoren beeinflusst wird, einen regulativen Effekt zu haben.

Im gesamten Differenzierungsprotokoll wird die megakaryozytäre Differenzierung mittels des Profils von Oberflächenantigenen beurteilt. In anderen veröffentlichten Differenzierungsprotokollen wurden andere Oberflächenmarker als Kontrolle genommen, zum Beispiel CD42a. CD42a, auch Glykoprotein IX genannt, bildet einen Komplex mit CD42b bzw. Glykoprotein Ib- $\alpha$ , einer Untereinheit des von-Willebrand-Rezeptors. CD42a und CD42b sind Marker der fortgeschrittenen Megakaryopoese und neben CD41a auch auf Thrombozyten nachweisbar. Bei Knochenmarkpunktionen von TAR-Patienten konnte nur eine verminderte Anzahl von reifen MKs nachgewiesen werden [34]. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Apoptose bzw. ein Differenzierungsstopp früher MKs, insbesondere in den ersten Lebensjahren [36]. CD41a ist aber einer der frühesten und spezifischsten Marker für die MK-Differenzierung, der zudem in sehr hoher Kopienzahl exprimiert wird. Zusätzlich sind gut charakterisierte Antikörper kommerziell erhältlich. Daher war CD41a – trotz Alternativen – unsere erste Wahl in den oben gezeigten Analysen.

### **5.2.3 Relevanz von Modellen mit primären hämatopoetischen Zellen**

K562 ist eine Zelllinie, die ursprünglich aus einer 53-jährigen Frau mit chronisch myeloischer Leukämie in der Blastenkrise etabliert wurde. Sie gilt als Erythroleukämie (M6-Klassifikation) und ist positiv für das Philadelphia-Chromosom. K562-Zellen sind ein geeignetes Modell zur Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen. Die Verwendung einer erythroiden Zelllinie ist aufgrund der gemeinsamen Vorläuferzellen von MKs und Erythrozyten durchaus sinnvoll. Ausdruck eines Ausreifungsdefektes auf dieser Entwicklungsstufe könnten die Anämien einiger TAR-Patienten, insbesondere der mit 5'UTR-SNP, sein.

Eine Zelllinie entspricht aufgrund ihres monoklonalen Proliferationsverhaltens und vor allem aufgrund des aberranten Karyotyps keiner primären humanen Zelle, sondern dient stets nur als Annäherungsmodell an die Situation *in vivo*. Ein weiterer Schritt näher an die tatsächliche *in vivo*-Situation ist, die Experimente in hämatopoetischen Stammzellen, die man – ähnlich wie Zelllinien – unter *in vitro*-Bedingungen ausdifferenzieren kann, durchzuführen. Diese Stammzellen kann man beispielsweise im Rahmen von Stammzell-

Spenden gewinnen. Hierbei gilt zu bedenken, dass es unterschiedliche Quellen dieser Stammzellen gibt. HSZ können aus Nabelschnurblut oder nach Induktion auch aus dem peripheren Blut isoliert werden. Ebenfalls ist es möglich, jedoch unter größerem Aufwand, die HSZ direkt aus dem Knochenmark zu gewinnen. Es soll hier hervorgehoben werden, dass sich die HSZ abhängig von der Quelle unterscheiden können, gerade auch im Hinblick auf die Fähigkeit der megakaryozytären Ausdifferenzierung.

Zu beachten ist jedoch, dass es verschiedene Schwierigkeiten in der Etablierung eines geeigneten HSZ-Modells gibt: Zunächst einmal ist die Kultur dieser Zellen zeit- und kostenintensiver. Hinzu kommt, dass diese primären Zellen mit lentiviralen Vektoren noch schwerer zu manipulieren sind. Trotz der Erhöhung der Virustiter, zum Beispiel mittels Ultrazentrifugation, sind frühe humane HSZ und vor allem sogenannte ruhende HSZ (*resting hematopoietic stem cell*) der Transduktion schwer zugänglich. Erst nach kurzer Induktion durch verschiedene Zytokine sind sie für funktionelle Studien ausreichend transduzierbar. Nach dieser Induktion haben sich die HSZ jedoch ein Stück weit ausdifferenziert und verlieren unter Umständen Eigenschaften der HSZ. 2014 gelang es einer französischen Arbeitsgruppe mithilfe eines endogenen Pavian-Virus diese beiden technischen Hürden zu verringern. Mit dem von ihnen verwendeten Hüllprotein (*baboon endogenous virus*; BaEV) sind geringere Virustiter zur Transduktion nötig, die Zytokin-Induktion kann verkürzt werden und auch ruhende Stammzellen können in einem geringen Umfang erfolgreich transduziert werden [96].

Bei allen Analysen von CD34+-Zellen ist auch zu beachten, dass es sich hierbei um eine stark begrenzte Ressource im Vergleich zu Zelllinien handelt. Daher sind Auswertungen, die eine große Zellzahl benötigen, zum Beispiel Immunoblots, oft ungeeignet.

## 5.3 Ausblick

### 5.3.1 Mausmodelle zum TAR-Syndrom

Eine Möglichkeit, den begrenzten Möglichkeiten mit den CD34+-Zellen aus dem Weg zu gehen, wäre die Etablierung eines Mausmodells für die Pathogenese des TAR-Syndroms.

Zuerst sind natürlich auch innerhalb des murinen Systems verschiedene Zelllinien mit megakaryozytären Eigenschaften bekannt, zum Beispiel die Zelllinie L8057. Hinzu kommt, dass hämatopoetische Stammzellen in der Maus in einer größeren Anzahl zur

Verfügung stehen. Hier gibt es mehrere Möglichkeiten der Gewinnung: Sie lassen sich aus einer sogenannten fetalen Leberzellkultur kultivieren. Die Hämatopoese der Feten findet auch in der Maus hauptsächlich in der Leber statt. Diese Eigenschaft kann man ausnutzen und dazu Lebern muriner Feten an Tag 13,5 – 14,5 der Trächtigkeit präparieren. Nach mechanischer Vereinzelung können diese hämatopoetischen Stammzellen unter der Zugabe von THPO zu MKs ausreifen, die etwa am fünften Tag beginnen Proplättchen zu bilden und Thrombozyten abzuschneiden [97]. Eine andere Möglichkeit ist die Gewinnung von HSZ aus dem Knochenmark und deren Aufreinigung mittels verschiedener Oberflächenantigene. Solche Zellen können ebenfalls mit shRNA-tragenden lentiviralen Konstrukten transduziert werden, um die Auswirkung einer Y14-Herunterregulation zu untersuchen. Bei diesem Modell ist aber auf ähnliche Diskussionspunkte wie beim humanen Zellmodell hinzuweisen, zum Beispiel die Wahl des richtigen Zeitpunkts und der besten Dosis für den Y14-Knockdown .

Eine Möglichkeit, einen sehr frühen Zeitpunkt innerhalb der Hämatopoese zu verwenden, ist das „klassische“ Knockout-Mausmodell. Hierbei wird ein bestimmtes Gen im gesamten Organismus ausgeschaltet und zwar bereits ab der Zygote. Ein solches Modell für das Gen *RBM8A* existiert derzeit nicht. Es ist allerdings zu vermuten, dass eine *RBM8A*-Knockout-Maus bereits intrauterin versterben würde.

Ein Modell, das den Knockout eines bestimmten Genes lediglich innerhalb einer bestimmten Zellpopulation möglich macht, ist ein sogenanntes konditionales Mausmodell. Der Locus innerhalb des Genoms, das spezifisch und selektiv deletiert werden soll, wird gentechnisch mittels loxP-Sequenzen flankiert. Dies ermöglicht später einer ektop exprimierten bakteriellen Cre-Rekombinase diese entsprechende Stelle spezifisch zu erkennen, die DNA dort zu schneiden und die verbleibenden Stränge wieder zu rekombinieren. Der Vorteil bei dieser Art von Modellen ist, dass das Cre-Enzym lediglich unter spezifischen Promotern abgelesen wird [98]. Dadurch lassen sich sowohl vollständige Knockouts oder auch Haploinsuffizienzen ausschließlich in den gewünschten Geweben bzw. deren Zielzellen erzeugen. Wie in der Einleitung (Kapitel 2.3.2.1) bereits erwähnt, erzeugten Mao *et al.* mittels dieser Methode eine Haploinsuffizienz in neuronalen Strukturen, genauer gesagt in den Vorläuferzellen des dorsalen Telencephalons, einem Teil des Großhirnes von Mäusen. Für ein Mausmodell der Megakaryopoese beim TAR-Syndrom wäre die Kreuzung der *RBM8A*<sup>loxP/+</sup>-Maus mit einer *PF4*-Cre-Maus denkbar. *Platelet-factor 4 (PF4)* ist ein Gen, das ein Protein

(ebenfalls PF4) transkribiert, welches in MKs exprimiert wird und sich letztlich in den alpha-Granula sammelt. Mittels dieser beiden Mausmodelle ließe sich eine *RBM8A*-Haploinsuffizienz in murinen MKs erzeugen [99]. Hierbei bleibt weiterhin zu beachten, dass eine reine Haploinsuffizienz im humanen System keine pathologische Bedeutung hat, wie gesunde Mikrodeletionsträger beweisen.

### **5.3.2 Induzierte pluripotente Stammzellen**

Induzierte pluripotente Stammzellen (IPS) sind Stammzellen, die nach Einbringung einer bestimmten Genkombination mittels viraler Transduktion aus einer ursprünglich ausdifferenzierten Zelle entstehen [100]. Bei diesem Verfahren können auch humane Zellen benutzt werden, die nach der erfolgten Induktion ausdifferenzierbar und proliferativ sind. Es ist möglich, diese pluripotenten Stammzellen für alle drei Keimblätter zu erzeugen. Eine Ausdifferenzierung in hämatopoetische Zellen ist dabei möglich. Denkbar ist, dass man diese IPS von TAR-Patienten, ihren Eltern und Kontrollen verwendet. Hier ist zu beachten, dass die IPS dieselbe Genetik aufweisen wie der Spender, aus dem sie isoliert worden sind. Aufgrund dieser Eigenschaft wären weitere Untersuchungen der Genetik und ihr Einfluss insbesondere auf die hämatopoetischen Differenzierung möglich. Denkbar sind auch Untersuchungen zur ossären Entwicklung. Inzwischen liegen IPS-Zelllinien von zwei TAR-Patienten in unserer Arbeitsgruppe vor und sollen zukünftig für Analysen eingesetzt werden.

### **5.3.3 Gentherapie beim TAR-Syndrom?**

In den vorherigen Abschnitten wurden Ideen zu weiteren Untersuchungen zur Megakaryopoese beim TAR-Syndrom vorgestellt. Alle haben gemein, dass sie sich weiter darum bemühen, die genaue Pathogenese der Thrombozytopenie beim TAR-Syndrom funktionell aufzuklären

Konkrete neue Behandlungsansätze für den einzelnen Patienten mit TAR-Syndrom sind aktuell aber nicht in Sicht. Aufgrund der allgemeinen besseren medizinischen Versorgung hat sich die Lebenserwartung von Patienten mit TAR-Syndrom im Vergleich zu den ersten Beschreibungen, bei denen aus einer Kohorte von 40 Patienten zehn innerhalb der ersten vier Lebensmonate verstarben [18], enorm verbessert. Dies ist jedoch nicht auf gezielte Therapien für das TAR-Syndrom zurückzuführen. In der Studie von Hall wurden insgesamt 15 Patienten beschrieben, die im Beobachtungszeitraum verstorben sind. 13 Todesfälle standen in einem Zusammenhang mit Hämorrhagien. Diese werden heute

oftmals durch die prophylaktische oder therapeutische Gabe von Thrombozytenkonzentraten symptomatisch behandelt. Ein kausaler Therapieansatz besteht dabei aber nicht. Ein solcher Ansatz wäre jedoch vor allem für Patienten mit schwerer Thrombozytopenie über mehrere Jahre hinweg, also vor allem für Patienten mit 5'UTR-SNP interessant.

Das WAS ist eine X-chromosomale rezessive Erkrankung, bei der es durch Mutationen im WAS-Gen zur Ausbildung eines dysfunktionalen Proteins kommt [101]. Dies hat bei Patienten charakteristischerweise einen typischen Hautausschlag, verbunden mit einer Infektionsneigung und Thrombozytopenie, zur Folge. Botzug *et al.* haben im Jahr 2010 gezeigt, dass mittels Gentransfer und anschließender autologer Stammzelltransplantation eine korrekte Kopie des Gens in die HSZ eingebracht werden kann. Hierdurch kommt es zu einer Erholung der Thrombozytopenie sowie des Immundefektes [102]. Durch diesen Erfolg hoffte man, von der Notwendigkeit einer allogenen Stammzelltransplantation Abstand nehmen zu können. Wie sich im weiteren Verlauf der Studie zeigte, war die ursprüngliche Erkrankung mit diesem Konzept gut und dauerhaft behandelt. Jedoch führte der retrovirale Gentransfer in dieser Studie bei acht von neun vollständig behandelten Jungen im Verlauf der Therapie zu einer Leukämie [103]. In aktuellen Studien sind inzwischen lentivirale Konstrukte einer neueren Generation zur Behandlung des WAS mittels Gentherapie benutzt worden [104]. Diese bieten den Vorteil, dass sie die genetische Information an weniger sensiblen Stellen ins Genom einbringen. Viraler Gentransfer geschieht nicht zufällig, Retroviren integrieren oftmals in der Nähe von genregulatorischen Elementen, zum Beispiel bei Promotern und *Enhancern*. Zudem sind oftmals Strukturen im Genom betroffen, die mit Zellwachstum assoziiert sind. Lentiviren hingegen integrieren in gerade transkribierte Gen-Loci und sind damit weniger onkogen als Retroviren. Zudem werden auch sogenannte *self-inactivating*-Vektoren getestet, die das onkogene Risiko weiter senken [105, 106].

Auch für das TAR-Syndrom könnte eine ähnliche Therapie entworfen werden, jedoch bleiben weiterhin die massiven Risiken einer Gentherapie mit autologer Stammzelltransplantation bestehen. Das TAR-Syndrom hat jedoch eine wesentlich bessere hämatologische Prognose als das WAS. Daher sind die Risiken einer solchen Therapie anders zu bewerten.

## 6 Anhang

### Liste der genutzten Ausrüstung:

Amersham Imager 600	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
BD FACSCanto II	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
BD Aria	Becton Dickinson, Heidelberg Deutschland
Centrifuge Beckmann GS-6R and GS-15R	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Cytospin™ 4 Zentrifuge mit Zellsammler	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Evos XL	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Glasware	Schott, Lyngby, Dänemark
Inkubator HERAcell 240i	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Laminar flow bench HB 2448	Heraeus, Omnilab, Gehrden, Deutschland
Mega Star 1.6R	VWR, Darmstadt, Deutschland
Mikro Pipetten (2, 10, 200, 1000 µL)	Gilson, VWR, Darmstadt, Deutschland
MyCycler	Bio-rad, München, Deutschland
NanoDrop 2000c	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Tank-Blot-System	Bio-rad, München, Deutschland
TCS SP8 Confocal Mikroskop	Leica, Wetzlar, Deutschland
Wasserbad WNB	memmert, Schwabach, Deutschland
7500 Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Forster City, CA, USA

### Liste der genutzten Chemikalien:

Die folgende Liste enthält die verwendeten Chemikalien und Reagenzien mit Angabe der Herstellungsfirma. Alle oben erwähnten, hier jedoch nicht gelisteten Produkte, wurden im höchsten Reinheitsgrad von der Firma Carl Roth bezogen.

Bradfordlösung	Bio-rad, München, Deutschland
CC220	Stemcell Technologies, Vancouver, Kanada
DAPI Fluoromount G	Southern Biotech, Birmingham, AL, USA
Destilliertes Wasser	B.Braun, Melsungen, Deutschland

Dulbecco's Modified Eagle Medium	GIBCO, Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Fetales Rinderserum	Biochrom, Berlin, Deutschland
Ficoll	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix	Bio-rad, München, Deutschland
Lenti-X Concentrator	Takara/Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
Molekulargewichtsstandard (Page Ruler)	Fermentas, Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
PBS Dulbecco 1x	Biochrom, Berlin, Deutschland
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Biochrom, Berlin, Deutschland
Puromycin	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt a. Main, Deutschland
RPMI 1640 – Medium	GIBCO, Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
SR1	Cellagen Technology, San Diego, CA, USA
Staurosporin	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Stemspan Serum-Free Expansion Medium	Stemcell Technologies, Vancouver, Kanada
Super Signal West Dura – Detektionskit	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Tetradecanoyl-Phorbolacetat (TPA)	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
TRizol® Reagent	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
TurboFect	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Tween-20 Calbiochem	Merck, Darmstadt, Deutschland

### Liste des verwendeten Gebrauchsmaterials:

Alles Verbrauchsmaterial, welches nicht explizit aufgeführt ist, wurde von den Firmen Eppendorf (Hamburg, Deutschland) oder Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) bezogen.

Filterpapier für Cytospin™	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Mikroskop Träger Polysine™	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Zellkultur-Lochplatten (48-, 24-, 6-Loch)	CELLSTAR®, bio-one, Frickenhausen, Deutschland
0,22 µM Filter Millex GP	Merck-Millipore, Darmstadt, Deutschland
10 cm-Zellkultur-Schalen	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
10 mL-Einwegspritzen	B.Braun, Melsungen, Deutschland



Liste der verwendeten Kits:

APC AnnexinV Apoptosis Detection Kit with 7_AAD	Biologend, San Diego, CA, USA
DNeasy® Blood & Tissue Kit	Qiagen, Hilden Deutschland
iScript™ Select cDNA Synthesis Kit	Bio-rad, München, Deutschland
NucleoBond® Xtra Maxi	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
NucleoBond® Xtra Mini	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden Deutschland
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden Deutschland
TOPO-Cloning	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland

**Tabelle 8:** Daten von allen Patienten der untersuchten Kohorte mit klinischen Angaben: #: TARS-Nummer (Pseudonummerierung in dieser Arbeit); Alter bei letzter ärztlicher Konsultation [in Jahren]; Geschlecht: M: männlich, W: weiblich; Single Nucleotide Peptide im *RBM8A*-Gen; Humerushypoplasie; Daumenhypoplasie; Ulnahypoplasie; Phocomelie; Hypoplasie des Schultergürtels; untere Extremität; Hüftdysplasie; Knieabnormalität: Genu Varus, Genu Valgus, Kontraktur; angeborene Herzfehler: VSD: Ventrikelseptumdefekt, ASD: Atriumseptumdefekt, PFO: persistierendes Foramen ovale, PDA: persistierender Ductus arteriosus; Anomalien des Urogenitaltraktes: 1: Hufeisenniere, 2: Hypoplasie des Uterus / der Vagina, 3: Nierenbeckendilatation, 4: Nierenagenesie, 5: Kryptorchismus, 6: Funikozele; Kuhmilchintoleranz. Hinzu kommt der Hinweis in welcher Publikation der Patient zuerst beschrieben wurde. Die jeweilige Nummer entspricht der Pseudonummerierung der jeweiligen Publikation (K: Klopocki [28], B: Ballmaier [81], W: Wannack [29], F: Fiedler [24]).

#	Alter	Ge.	SNP	HH	DH	UH	PH	HS	UE	HD	KA	AHF	UGT	KI	Bemerkungen	Quelle
45	0,8	M	5'UTR												Kletterfuß	Neu
46	1,4	W	5'UTR													Neu
47	43,7	M	5'UTR													Neu
48	26,9	W	5'UTR													Neu
50	0	W	5'UTR	+								ASD				Neu
51	0,3	W	Intron	+	+	+									Hexadaktylie, Syndaktylie der Zehen (2/3 und 4/5)	Neu
52	0,1	W	5'UTR							+		-	3			Neu
53	0,5	M	5'UTR									ASD	6			Neu
01	29	W	Intron	+	+	+	-	-	-	+	-	-	1,2	-	Hörminderung	K (#01)
02	21	W	Intron	+	+	+	-	+	-	+		-	-	-	Rolandoepilepsie	K (#02)
03	21,8	W	5'UTR	-	+	+	-	+	-	-	GVR	VSD	-	-	Hypothyreoidismus	B (#5)
04	0	W	5'UTR	+	+	+	-	-	+	+	Kon	-	-	-		K (#04)
10	9,3	W	5'UTR	-	+	+	-	+	-	-	-	VSD	-	-		B (#1)
11	16,9	W	5'UTR	+		+	-	-	-	-	-	-	-	+		B (#2)
12	3,8	M	5'UTR	+	+	+	-	+	+	+		-	-	-		K (#04)
13	0	M	Intron	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+		K (#05)
14	0,8	M	5'UTR	+	+	+	+	+	-	+		-	1	-		B (#3)
15	26,8	M	Intron	+	+	+	+	+	+	+	GVL	-	1	-		K (#15)
17	1,3	W	5'UTR	+	+	+	+	+	+	+	GVR	-	-	-	Sichelfußhaltung	B (#4)
19	18,3	W	Intron													W (#104)
20	29,8	W	Intron	+	+	+	+	+		+	+		1	-		K (#20)
25	26,3	M	Intron	+		+	+				GVR					K (#25)
26	22,9	M	Intron			+				+	-	-	5			K (#26)



## 7 Literaturverzeichnis

1. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, and Weissman IL, *A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages*. Nature, 2000. **404**(6774): p. 193-7.
2. Kaimakis P, Crisan M, and Dzierzak E, *The biochemistry of hematopoietic stem cell development*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1830**(2): p. 2395-403.
3. Kaushansky K, *Thrombopoiesis*. Semin Hematol, 2015. **52**(1): p. 4-11.
4. Italiano JE, Jr., Lecine P, Shivdasani RA, and Hartwig JH, *Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes*. J Cell Biol, 1999. **147**(6): p. 1299-312.
5. Italiano JE, Jr. and Shivdasani RA, *Megakaryocytes and beyond: the birth of platelets*. J Thromb Haemost, 2003. **1**(6): p. 1174-82.
6. Junt T, Schulze H, Chen Z, Massberg S, Goerge T, Krueger A, Wagner DD, Graf T, Italiano JE, Jr., Shivdasani RA, and von Andrian UH, *Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow*. Science, 2007. **317**(5845): p. 1767-70.
7. Levine RF, Bunn PA, Jr., Hazzard KC, and Schlam ML, *Flow cytometric analysis of megakaryocyte ploidy. Comparison with Feulgen microdensitometry and discovery that 8N is the predominant ploidy class in guinea pig and monkey marrow*. Blood, 1980. **56**(2): p. 210-17.
8. Dohner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, Dombret H, Ebert BL, Fenau P, Larson RA, Levine RL, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz M, Sierra J, Tallman MS, Tien HF, Wei AH, Lowenberg B, and Bloomfield CD, *Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel*. Blood, 2017. **129**(4): p. 424-447.
9. Debili N, Issaad C, Masse JM, Guichard J, Katz A, Breton-Gorius J, and Vainchenker W, *Expression of CD34 and platelet glycoproteins during human megakaryocytic differentiation*. Blood, 1992. **80**(12): p. 3022-35.
10. Adolfsson J, Mansson R, Buza-Vidas N, Hultquist A, Liuba K, Jensen CT, Bryder D, Yang L, Borge OJ, Thoren LA, Anderson K, Sitnicka E, Sasaki Y, Sigvardsson M, and Jacobsen SE, *Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment*. Cell, 2005. **121**(2): p. 295-306.
11. 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.
12. Schulze H and Shivdasani RA, *Mechanisms of thrombopoiesis*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(8): p. 1717-24.
13. Kuter DJ, *Milestones in understanding platelet production: a historical overview*. Br J Haematol, 2014. **165**(2): p. 248-58.
14. Ballmaier M, Germeshausen M, Schulze H, Cherkaoui K, Lang S, Gaudig A, Krukemeier S, Eilers M, Strauss G, and Welte K, *c-mpl mutations are the cause of congenital amegakaryocytic thrombocytopenia*. Blood, 2001. **97**(1): p. 139-46.
15. Ballmaier M and Germeshausen M, *Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia: clinical presentation, diagnosis, and treatment*. Semin Thromb Hemost, 2011. **37**(6): p. 673-81.
16. Greenwald HM and Sherman I, *Congenital essential thrombocytopenia*. American Journal of Diseases of Children, 1929. **38**(6): p. 1245-1251.

17. Shaw S and Oliver RA, *Congenital hypoplastic thrombocytopenia with skeletal deformities in siblings*. Blood, 1959. **14**(4): p. 374-7.
18. Hall JG, Levin J, Kuhn JP, Ottenheimer EJ, van Berkum KA, and McKusick VA, *Thrombocytopenia with absent radius (TAR)*. Medicine (Baltimore), 1969. **48**(6): p. 411-39.
19. Hedberg VA and Lipton JM, *Thrombocytopenia with absent radii. A review of 100 cases*. Am J Pediatr Hematol Oncol, 1988. **10**(1): p. 51-64.
20. Ray R, Zorn E, Kelly T, Hall JG, and Sommer A, *Lower limb anomalies in the thrombocytopenia absent-radius (TAR) syndrome*. Am J Med Genet, 1980. **7**(4): p. 523-8.
21. Anyane-Yeboah K, Jaramillo S, Nagel C, and Grebin B, *Tetraphocomelia in the syndrome of thrombocytopenia with absent radii (TAR syndrome)*. Am J Med Genet, 1985. **20**(4): p. 571-6.
22. Toriello HV, *Thrombocytopenia Absent Radius Syndrome*, in *GeneReviews(R)*, R.A. Pagon, et al., Editors. 1993: Seattle (WA).
23. Niihori T, Ouchi-Uchiyama M, Sasahara Y, Kaneko T, Hashii Y, Irie M, Sato A, Saito-Nanjo Y, Funayama R, Nagashima T, Inoue S, Nakayama K, Ozono K, Kure S, Matsubara Y, Imaizumi M, and Aoki Y, *Mutations in MECOM, Encoding Oncoprotein EVI1, Cause Radioulnar Synostosis with Amegakaryocytic Thrombocytopenia*. Am J Hum Genet, 2015. **97**(6): p. 848-54.
24. Fiedler J, Strauss G, Wannack M, Schwiebert S, Seidel K, Henning K, Klopocki E, Schmutz M, Gaedicke G, and Schulze H, *Two patterns of thrombopoietin signaling suggest no coupling between platelet production and thrombopoietin reactivity in thrombocytopenia-absent radii syndrome*. Haematologica, 2012. **97**(1): p. 73-81.
25. Whitfield MF and Barr DG, *Cows' milk allergy in the syndrome of thrombocytopenia with absent radius*. Arch Dis Child, 1976. **51**(5): p. 337-43.
26. Greenhalgh KL, Howell RT, Bottani A, Ancliff PJ, Brunner HG, Verschuuren-Bemelmans CC, Vernon E, Brown KW, and Newbury-Ecob RA, *Thrombocytopenia-absent radius syndrome: a clinical genetic study*. J Med Genet, 2002. **39**(12): p. 876-81.
27. Houeijeh A, Andrieux J, Saugier-veber P, David A, Goldenberg A, Bonneau D, Fouassier M, Journal H, Martinovic J, Escande F, Devisme L, Bisiaux S, Chaffiotte C, Baux M, Kerckaert JP, Holder-Espinasse M, and Manouvrier-Hanu S, *Thrombocytopenia-absent radius (TAR) syndrome: a clinical genetic series of 14 further cases. impact of the associated 1q21.1 deletion on the genetic counselling*. Eur J Med Genet, 2011. **54**(5): p. e471-7.
28. Klopocki E, Schulze H, Strauss G, Ott CE, Hall J, Trotier F, Fleischhauer S, Greenhalgh L, Newbury-Ecob RA, Neumann LM, Habenicht R, König R, Seemanova E, Megarbane A, Ropers HH, Ullmann R, Horn D, and Mundlos S, *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.
29. Wannack M, *Pathophysiologie der Blutbildung bei Patienten mit Thrombocytopenia absent radii (TAR)-Syndrom*, in *Klinik für Allgemeine Pädiatrie*. 2011, Charité - Universities Berlin. p. 104.
30. Ahmad R and Pope S, *Association of Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome with Thrombocytopenia Absent Radii syndrome: a rare presentation*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2008. **139**(2): p. 257-8.
31. Albers CA, Paul DS, Schulze H, Freson K, Stephens JC, Smethurst PA, Jolley JD, Cvejic A, Kostadima M, Bertone P, Breuning MH, Debili N, Deloukas P, Favier R, Fiedler J, Hobbs CM, Huang N, Hurles ME, Kiddle G, Krapels I, Nurden P, Ruivenkamp CA, Sambrook JG, Smith K, Stemple DL, Strauss G, Thys C, van Geet C, Newbury-Ecob R, Ouweland WH, and Ghevaert C, *Compound inheritance of a low-frequency regulatory SNP and a rare null*

- mutation in exon-junction complex subunit RBM8A causes TAR syndrome.* Nat Genet, 2012. **44**(4): p. 435-9, S1-2.
32. Jameson-Lee M, Chen K, Ritchie E, Shore T, Al-Khattab O, and Gergis U, *Acute myeloid leukemia in a patient with thrombocytopenia with absent radii: A case report and review of the literature.* Hematol Oncol Stem Cell Ther, 2017.
  33. Michalewicz R, Baron S, and Burstein Y, *Osteoclast-like cells grow in cultures of multipotent hematopoietic progenitors in thrombocytopenia and absent radii (TAR) syndrome.* Isr J Med Sci, 1988. **24**(1): p. 42-5.
  34. de Alarcon PA, Graeve JA, Levine RF, McDonald TP, and Beal DW, *Thrombocytopenia and absent radii syndrome: defective megakaryocytopoiesis-thrombocytopoiesis.* Am J Pediatr Hematol Oncol, 1991. **13**(1): p. 77-83.
  35. Homans AC, Cohen JL, and Mazur EM, *Defective megakaryocytopoiesis in the syndrome of thrombocytopenia with absent radii.* Br J Haematol, 1988. **70**(2): p. 205-10.
  36. Letestu R, Vitrat N, Masse A, Le Couedic JP, Lazar V, Rameau P, Wendling F, Vuillier J, Boutard P, Plouvier E, Plasse M, Favier R, Vainchenker W, and Debili N, *Existence of a differentiation blockage at the stage of a megakaryocyte precursor in the thrombocytopenia and absent radii (TAR) syndrome.* Blood, 2000. **95**(5): p. 1633-41.
  37. Aquino VM, Mustafa MM, Vaickus L, Wooley R, and Buchanan GR, *Recombinant interleukin-6 in the treatment of congenital thrombocytopenia associated with absent radii.* J Pediatr Hematol Oncol, 1998. **20**(5): p. 474-6.
  38. Dempfle CE, Burck C, Grutzmacher T, Wizenmann J, and Heene DL, *Increase in platelet count in response to rHuEpo in a patient with thrombocytopenia and absent radii syndrome.* Blood, 2001. **97**(7): p. 2189-90.
  39. Brochstein JA, Kirkpatrick D, Giardina PJ, Weinberg RS, Alter BP, Driscoll C, Wolfe L, Shank B, and O'Reilly RJ, *Bone marrow transplantation in two multiply transfused patients with thalassaemia major.* Br J Haematol, 1986. **63**(3): p. 445-56.
  40. Zhao XF, Nowak NJ, Shows TB, and Aplan PD, *MAGOH interacts with a novel RNA-binding protein.* Genomics, 2000. **63**(1): p. 145-8.
  41. Salicioni AM, Xi M, Vanderveer LA, Balsara B, Testa JR, Dunbrack RL, Jr., and Godwin AK, *Identification and structural analysis of human RBM8A and RBM8B: two highly conserved RNA-binding motif proteins that interact with OVCA1, a candidate tumor suppressor.* Genomics, 2000. **69**(1): p. 54-62.
  42. Kataoka N, Yong J, Kim VN, Velazquez F, Perkinson RA, Wang F, and Dreyfuss G, *Pre-mRNA splicing imprints mRNA in the nucleus with a novel RNA-binding protein that persists in the cytoplasm.* Mol Cell, 2000. **6**(3): p. 673-82.
  43. Dostie J and Dreyfuss G, *Translation is required to remove Y14 from mRNAs in the cytoplasm.* Curr Biol, 2002. **12**(13): p. 1060-7.
  44. Bono F and Gehring NH, *Assembly, disassembly and recycling: the dynamics of exon junction complexes.* RNA Biol, 2011. **8**(1): p. 24-9.
  45. Schweingruber C, Rufener SC, Zund D, Yamashita A, and Muhlemann O, *Nonsense-mediated mRNA decay - mechanisms of substrate mRNA recognition and degradation in mammalian cells.* Biochim Biophys Acta, 2013. **1829**(6-7): p. 612-23.
  46. Hall GW and Thein S, *Nonsense codon mutations in the terminal exon of the beta-globin gene are not associated with a reduction in beta-mRNA accumulation: a mechanism for the phenotype of dominant beta-thalassemia.* Blood, 1994. **83**(8): p. 2031-7.
  47. Holbrook JA, Neu-Yilik G, Hentze MW, and Kulozik AE, *Nonsense-mediated decay approaches the clinic.* Nat Genet, 2004. **36**(8): p. 801-8.

48. Bono F, Ebert J, Lorentzen E, and Conti E, *The crystal structure of the exon junction complex reveals how it maintains a stable grip on mRNA*. Cell, 2006. **126**(4): p. 713-25.
49. Gehring NH, Lamprinaki S, Kulozik AE, and Hentze MW, *Disassembly of exon junction complexes by PYM*. Cell, 2009. **137**(3): p. 536-48.
50. Gehring NH, Lamprinaki S, Hentze MW, and Kulozik AE, *The hierarchy of exon-junction complex assembly by the spliceosome explains key features of mammalian nonsense-mediated mRNA decay*. PLoS Biol, 2009. **7**(5): p. e1000120.
51. Ballut L, Marchadier B, Baguet A, Tomasetto C, Seraphin B, and Le Hir H, *The exon junction core complex is locked onto RNA by inhibition of eIF4AIII ATPase activity*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(10): p. 861-9.
52. Ishigaki Y, Nakamura Y, Tatsuno T, Hashimoto M, Shimasaki T, Iwabuchi K, and Tomosugi N, *Depletion of RNA-binding protein RBM8A (Y14) causes cell cycle deficiency and apoptosis in human cells*. Exp Biol Med (Maywood), 2013. **238**(8): p. 889-97.
53. Ishigaki Y, Nakamura Y, Tatsuno T, Hashimoto M, Iwabuchi K, and Tomosugi N, *RNA-binding protein RBM8A (Y14) and MAGOH localize to centrosome in human A549 cells*. Histochem Cell Biol, 2014. **141**(1): p. 101-9.
54. Mao H, Pilaz LJ, McMahan JJ, Golzio C, Wu D, Shi L, Katsanis N, and Silver DL, *Rbm8a haploinsufficiency disrupts embryonic cortical development resulting in microcephaly*. J Neurosci, 2015. **35**(18): p. 7003-18.
55. Ishigaki Y, Nakamura Y, Tatsuno T, Ma S, and Tomosugi N, *Phosphorylation status of human RNA-binding protein 8A in cells and its inhibitory regulation by Magoh*. Exp Biol Med (Maywood), 2015. **240**(4): p. 438-45.
56. Chuang TW, Chang WL, Lee KM, and Tarn WY, *The RNA-binding protein Y14 inhibits mRNA decapping and modulates processing body formation*. Mol Biol Cell, 2013. **24**(1): p. 1-13.
57. Muromoto R, Taira N, Ikeda O, Shiga K, Kamitani S, Togi S, Kawakami S, Sekine Y, Nanbo A, Oritani K, and Matsuda T, *The exon-junction complex proteins, Y14 and MAGOH regulate STAT3 activation*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **382**(1): p. 63-8.
58. Ohbayashi N, Taira N, Kawakami S, Togi S, Sato N, Ikeda O, Kamitani S, Muromoto R, Sekine Y, and Matsuda T, *An RNA binding protein, Y14 interacts with and modulates STAT3 activation*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **372**(3): p. 475-9.
59. Silver DL, Watkins-Chow DE, Schreck KC, Pierfelice TJ, Larson DM, Burnett AJ, Liaw HJ, Myung K, Walsh CA, Gaiano N, and Pavan WJ, *The exon junction complex component Magoh controls brain size by regulating neural stem cell division*. Nat Neurosci, 2010. **13**(5): p. 551-8.
60. Alachkar A, Jiang D, Harrison M, Zhou Y, Chen G, and Mao Y, *An EJC factor RBM8a regulates anxiety behaviors*. Curr Mol Med, 2013. **13**(6): p. 887-99.
61. Mao H, Brown HE, and Silver DL, *Mouse models of Casc3 reveal developmental functions distinct from other components of the exon junction complex*. RNA, 2017. **23**(1): p. 23-31.
62. Mao H, McMahan JJ, Tsai YH, Wang Z, and Silver DL, *Haploinsufficiency for Core Exon Junction Complex Components Disrupts Embryonic Neurogenesis and Causes p53-Mediated Microcephaly*. PLoS Genet, 2016. **12**(9): p. e1006282.
63. Lu CC, Lee CC, Tseng CT, and Tarn WY, *Y14 governs p53 expression and modulates DNA damage sensitivity*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 45558.
64. Rosenfeld JA, Traylor RN, Schaefer GB, McPherson EW, Ballif BC, Klopocki E, Mundlos S, Shaffer LG, Aylsworth AS, and q21.1 Study G, *Proximal microdeletions and microduplications of 1q21.1 contribute to variable abnormal phenotypes*. Eur J Hum Genet, 2012. **20**(7): p. 754-61.

65. Consortium EP, Birney E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, Guigo R, Gingeras TR, Margulies EH, Weng Z, Snyder M, Dermitzakis ET, Thurman RE, Kuehn MS, Taylor CM, Neph S, Koch CM, Asthana S, Malhotra A, Adzhubei I, Greenbaum JA, Andrews RM, Flicek P, Boyle PJ, Cao H, Carter NP, Clelland GK, Davis S, Day N, Dhami P, Dillon SC, Dorschner MO, Fiegler H, Giresi PG, Goldy J, Hawrylycz M, Haydock A, Humbert R, James KD, Johnson BE, Johnson EM, Frum TT, Rosenzweig ER, Karnani N, Lee K, Lefebvre GC, Navas PA, Neri F, Parker SC, Sabo PJ, Sandstrom R, Shafer A, Vetriche D, Weaver M, Wilcox S, Yu M, Collins FS, Dekker J, Lieb JD, Tullius TD, Crawford GE, Sunyaev S, Noble WS, Dunham I, Denoeud F, Reymond A, Kapranov P, Rozowsky J, Zheng D, Castelo R, Frankish A, Harrow J, Ghosh S, Sandelin A, Hofacker IL, Baertsch R, Keefe D, Dike S, Cheng J, Hirsch HA, Sekinger EA, Lagarde J, Abril JF, Shahab A, Flamm C, Fried C, Hackermuller J, Hertel J, Lindemeyer M, Missal K, Tanzer A, Washietl S, Korb J, Emanuelsson O, Pedersen JS, Holroyd N, Taylor R, Swarbreck D, Matthews N, Dickson MC, Thomas DJ, Weirauch MT, Gilbert J, Drenkow J, Bell I, Zhao X, Srinivasan KG, Sung WK, Ooi HS, Chiu KP, Foissac S, Alioto T, Brent M, Pachter L, Tress ML, Valencia A, Choo SW, Choo CY, Ucla C, Manzano C, Wyss C, Cheung E, Clark TG, Brown JB, Ganesh M, Patel S, Tammana H, Chrast J, Henrichsen CN, Kai C, Kawai J, Nagalakshmi U, Wu J, Lian Z, Lian J, Newburger P, Zhang X, Bickel P, Mattick JS, Carninci P, Hayashizaki Y, Weissman S, Hubbard T, Myers RM, Rogers J, Stadler PF, Lowe TM, Wei CL, Ruan Y, Struhl K, Gerstein M, Antonarakis SE, Fu Y, Green ED, Karaoz U, Siepel A, Taylor J, Liefer LA, Wetterstrand KA, Good PJ, Feingold EA, Guyer MS, Cooper GM, Asimenos G, Dewey CN, Hou M, Nikolaev S, Montoya-Burgos JI, Loytynoja A, Whelan S, Pardi F, Massingham T, Huang H, Zhang NR, Holmes I, Mullikin JC, Ureta-Vidal A, Paten B, Seringhaus M, Church D, Rosenbloom K, Kent WJ, Stone EA, Program NCS, Baylor College of Medicine Human Genome Sequencing C, Washington University Genome Sequencing C, Broad I, Children's Hospital Oakland Research I, Batzoglou S, Goldman N, Hardison RC, Haussler D, Miller W, Sidow A, Trinklein ND, Zhang ZD, Barrera L, Stuart R, King DC, Ameer A, Enroth S, Bieda MC, Kim J, Bhinge AA, Jiang N, Liu J, Yao F, Vega VB, Lee CW, Ng P, Shahab A, Yang A, Moqtaderi Z, Zhu Z, Xu X, Squazzo S, Oberley MJ, Inman D, Singer MA, Richmond TA, Munn KJ, Rada-Iglesias A, Wallerman O, Komorowski J, Fowler JC, Couttet P, Bruce AW, Dovey OM, Ellis PD, Langford CF, Nix DA, Euskirchen G, Hartman S, Urban AE, Kraus P, Van Calcar S, Heintzman N, Kim TH, Wang K, Qu C, Hon G, Luna R, Glass CK, Rosenfeld MG, Aldred SF, Cooper SJ, Halees A, Lin JM, Shulha HP, Zhang X, Xu M, Haidar JN, Yu Y, Ruan Y, Iyer VR, Green RD, Wadelius C, Farnham PJ, Ren B, Harte RA, Hinrichs AS, Trumbower H, Clawson H, Hillman-Jackson J, Zweig AS, Smith K, Thakkapallayil A, Barber G, Kuhn RM, Karolchik D, Armengol L, Bird CP, de Bakker PI, Kern AD, Lopez-Bigas N, Martin JD, Stranger BE, Woodroffe A, Davydov E, Dimas A, Eyraes E, Hallgrimsdottir IB, Huppert J, Zody MC, Abecasis GR, Estivill X, Bouffard GG, Guan X, Hansen NF, Idol JR, Maduro VV, Maskeri B, McDowell JC, Park M, Thomas PJ, Young AC, Blakesley RW, Muzny DM, Sodergren E, Wheeler DA, Worley KC, Jiang H, Weinstock GM, Gibbs RA, Graves T, Fulton R, Mardis ER, Wilson RK, Clamp M, Cuff J, Gnerre S, Jaffe DB, Chang JL, Lindblad-Toh K, Lander ES, Koriabine M, Nefedov M, Osoegawa K, Yoshinaga Y, Zhu B and de Jong PJ, *Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project*. *Nature*, 2007. **447**(7146): p. 799-816.
66. Mucenski ML, Taylor BA, Ihle JN, Hartley JW, Morse HC, 3rd, Jenkins NA, and Copeland NG, *Identification of a common ecotropic viral integration site, Evi-1, in the DNA of AKXD murine myeloid tumors*. *Mol Cell Biol*, 1988. **8**(1): p. 301-8.
67. Delwel R, Funabiki T, Kreider BL, Morishita K, and Ihle JN, *Four of the seven zinc fingers of the Evi-1 myeloid-transforming gene are required for sequence-specific binding to GA(C/T)AAGA(T/C)AAGATAA*. *Mol Cell Biol*, 1993. **13**(7): p. 4291-300.
68. Morishita K, Parganas E, William CL, Whittaker MH, Drabkin H, Oval J, Taetle R, Valentine MB, and Ihle JN, *Activation of EVI1 gene expression in human acute myelogenous leukemias by translocations spanning 300-400 kilobases on chromosome band 3q26*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(9): p. 3937-41.



69. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, and Vardiman JW, *The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia*. Blood, 2016. **127**(20): p. 2391-405.
70. Yamazaki H, Suzuki M, Otsuki A, Shimizu R, Bresnick EH, Engel JD, and Yamamoto M, *A remote GATA2 hematopoietic enhancer drives leukemogenesis in inv(3)(q21;q26) by activating EVI1 expression*. Cancer Cell, 2014. **25**(4): p. 415-27.
71. Kataoka K, Sato T, Yoshimi A, Goyama S, Tsuruta T, Kobayashi H, Shimabe M, Arai S, Nakagawa M, Imai Y, Kumano K, Kumagai K, Kubota N, Kadowaki T, and Kurokawa M, *Evi1 is essential for hematopoietic stem cell self-renewal, and its expression marks hematopoietic cells with long-term multilineage repopulating activity*. J Exp Med, 2011. **208**(12): p. 2403-16.
72. Goyama S, Yamamoto G, Shimabe M, Sato T, Ichikawa M, Ogawa S, Chiba S, and Kurokawa M, *Evi-1 is a critical regulator for hematopoietic stem cells and transformed leukemic cells*. Cell Stem Cell, 2008. **3**(2): p. 207-20.
73. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, and Mello CC, *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998. **391**(6669): p. 806-11.
74. Sliva K and Schnierle BS, *Selective gene silencing by viral delivery of short hairpin RNA*. Virol J, 2010. **7**: p. 248.
75. Peng HY and Liao HF, *Staurosporine induces megakaryocytic differentiation through the upregulation of JAK/Stat3 signaling pathway*. Ann Hematol, 2011. **90**(9): p. 1017-29.
76. Fukuda M, *Tumor-promoting phorbol diester-induced specific changes in cell surface glycoprotein profile of K562 human leukemic cells*. Cancer Res, 1981. **41**(11 Pt 1): p. 4621-8.
77. Sutherland JA, Turner AR, Mannoni P, McGann LE, and Turc JM, *Differentiation of K562 leukemia cells along erythroid, macrophage, and megakaryocyte lineages*. J Biol Response Mod, 1986. **5**(3): p. 250-62.
78. Strassel C, Brouard N, Mallo L, Receveur N, Mangin P, Eckly A, Bieche I, Tarte K, Gachet C, and Lanza F, *Aryl hydrocarbon receptor-dependent enrichment of a megakaryocytic precursor with a high potential to produce proplatelets*. Blood, 2016. **127**(18): p. 2231-40.
79. Boitano AE, Wang J, Romeo R, Bouchez LC, Parker AE, Sutton SE, Walker JR, Flaveny CA, Perdew GH, Denison MS, Schultz PG, and Cooke MP, *Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells*. Science, 2010. **329**(5997): p. 1345-8.
80. Smith KJ, Murray IA, Tanos R, Tellew J, Boitano AE, Bisson WH, Kolluri SK, Cooke MP, and Perdew GH, *Identification of a high-affinity ligand that exhibits complete aryl hydrocarbon receptor antagonism*. J Pharmacol Exp Ther, 2011. **338**(1): p. 318-27.
81. Ballmaier M, Schulze H, Strauss G, Cherkaoui K, Wittner N, Lynen S, Wolters S, Bogenberger J, and Welte K, *Thrombopoietin in patients with congenital thrombocytopenia and absent radii: elevated serum levels, normal receptor expression, but defective reactivity to thrombopoietin*. Blood, 1997. **90**(2): p. 612-9.
82. Strauss G, Vollert C, von Stackelberg A, Weimann A, Gaedicke G, and Schulze H, *Immature platelet count: a simple parameter for distinguishing thrombocytopenia in pediatric acute lymphocytic leukemia from immune thrombocytopenia*. Pediatr Blood Cancer, 2011. **57**(4): p. 641-7.
83. Morishita K, Parganas E, Douglass EC, and Ihle JN, *Unique expression of the human Evi-1 gene in an endometrial carcinoma cell line: sequence of cDNAs and structure of alternatively spliced transcripts*. Oncogene, 1990. **5**(7): p. 963-71.
84. Pietrangelo A, *Genetics, Genetic Testing, and Management of Hemochromatosis: 15 Years Since Hfe*. Gastroenterology, 2015. **149**(5): p. 1240-1251 e4.

85. Alter BP, *Diagnosis, genetics, and management of inherited bone marrow failure syndromes*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2007: p. 29-39.
86. Rivers A and Slayton WB, *Congenital cytopenias and bone marrow failure syndromes*. Semin Perinatol, 2009. **33**(1): p. 20-8.
87. National Cancer Institut. *Inherited Bone Marrow Failure Syndrome Study*. 2017 02.07.2017; Available from: <https://marrowfailure.cancer.gov/disorders.html>.
88. Mehta PA and Tolar J, *Fanconi Anemia*, in *GeneReviews(R)*, R.A. Pagon, et al., Editors. 1993: Seattle (WA).
89. Camitta BM and Rock A, *Acute lymphoid leukemia in a patient with thrombocytopenia/absent radii (Tar) syndrome*. Am J Pediatr Hematol Oncol, 1993. **15**(3): p. 335-7.
90. Rao VS, Shenoi UD, and Krishnamurthy PN, *Acute myeloid leukemia in TAR syndrome*. Indian J Pediatr, 1997. **64**(4): p. 563-5.
91. Fadoo Z and Naqvi SM, *Acute myeloid leukemia in a patient with thrombocytopenia with absent radii syndrome*. J Pediatr Hematol Oncol, 2002. **24**(2): p. 134-5.
92. Go RS and Johnston KL, *Acute myelogenous leukemia in an adult with thrombocytopenia with absent radii syndrome*. Eur J Haematol, 2003. **70**(4): p. 246-8.
93. Conde I, Pabon D, Jayo A, Lastres P, and Gonzalez-Manchon C, *Involvement of ERK1/2, p38 and PI3K in megakaryocytic differentiation of K562 cells*. Eur J Haematol, 2010. **84**(5): p. 430-40.
94. Maicas M, Vazquez I, Vicente C, Garcia-Sanchez MA, Marcotegui N, Urquiza L, Calasanz MJ, and Odero MD, *Functional characterization of the promoter region of the human EVI1 gene in acute myeloid leukemia: RUNX1 and ELK1 directly regulate its transcription*. Oncogene, 2013. **32**(16): p. 2069-78.
95. Darken MA, *Puromycin Inhibition of Protein Synthesis*. Pharmacol Rev, 1964. **16**: p. 223-43.
96. Girard-Gagnepain A, Amirache F, Costa C, Levy C, Frecha C, Fusil F, Negre D, Lavillette D, Cosset FL, and Verhoeyen E, *Baboon envelope pseudotyped LVs outperform VSV-G-LVs for gene transfer into early-cytokine-stimulated and resting HSCs*. Blood, 2014. **124**(8): p. 1221-31.
97. Schulze H, *Culture, Expansion, and Differentiation of Murine Megakaryocytes from Fetal Liver, Bone Marrow, and Spleen*. Curr Protoc Immunol, 2016. **112**: p. 22F 6 1-22F 6 15.
98. Missirlis PI, Smailus DE, and Holt RA, *A high-throughput screen identifying sequence and promiscuity characteristics of the loxP spacer region in Cre-mediated recombination*. BMC Genomics, 2006. **7**: p. 73.
99. Lefrancais E, Ortiz-Munoz G, Caudrillier A, Mallavia B, Liu F, Sayah DM, Thornton EE, Headley MB, David T, Coughlin SR, Krummel MF, Leavitt AD, Passegue E, and Looney MR, *The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors*. Nature, 2017. **544**(7648): p. 105-109.
100. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, and Yamanaka S, *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 2007. **131**(5): p. 861-72.
101. Chandra S, Bronicki L, Nagaraj CB, and Zhang K, *WAS-Related Disorders*, in *GeneReviews(R)*, R.A. Pagon, et al., Editors. 1993: Seattle (WA).
102. Boztug K, Schmidt M, Schwarzer A, Banerjee PP, Diez IA, Dewey RA, Bohm M, Nowrouzi A, Ball CR, Glimm H, Naundorf S, Kuhlcke K, Blasczyk R, Kondratenko I, Marodi L, Orange JS, von Kalle C, and Klein C, *Stem-cell gene therapy for the Wiskott-Aldrich syndrome*. N Engl J Med, 2010. **363**(20): p. 1918-27.

103. Braun CJ, Boztug K, Paruzynski A, Witzel M, Schwarzer A, Rothe M, Modlich U, Beier R, Gohring G, Steinemann D, Fronza R, Ball CR, Haemmerle R, Naundorf S, Kuhlcke K, Rose M, Fraser C, Mathias L, Ferrari R, Abboud MR, Al-Herz W, Kondratenko I, Marodi L, Glimm H, Schlegelberger B, Schambach A, Albert MH, Schmidt M, von Kalle C, and Klein C, *Gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome--long-term efficacy and genotoxicity*. *Sci Transl Med*, 2014. **6**(227): p. 227ra33.
104. Aiuti A, Biasco L, Scaramuzza S, Ferrua F, Cicalese MP, Baricordi C, Dionisio F, Calabria A, Giannelli S, Castiello MC, Bosticardo M, Evangelio C, Assanelli A, Casiraghi M, Di Nunzio S, Callegaro L, Benati C, Rizzardi P, Pellin D, Di Serio C, Schmidt M, Von Kalle C, Gardner J, Mehta N, Neduva V, Dow DJ, Galy A, Miniero R, Finocchi A, Metin A, Banerjee PP, Orange JS, Galimberti S, Valsecchi MG, Biffi A, Montini E, Villa A, Ciceri F, Roncarolo MG, and Naldini L, *Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome*. *Science*, 2013. **341**(6148): p. 1233151.
105. Singh S, Khan I, Khim S, Seymour B, Sommer K, Wielgosz M, Norgaard Z, Kiem HP, Adair J, Liggitt D, Nienhuis A, and Rawlings DJ, *Safe and Effective Gene Therapy for Murine Wiskott-Aldrich Syndrome Using an Insulated Lentiviral Vector*. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2017. **4**: p. 1-16.
106. David RM and Doherty AT, *Viral Vectors: The Road to Reducing Genotoxicity*. *Toxicol Sci*, 2017. **155**(2): p. 315-325.

## 8 Eidesstattliche Versicherung

Ich, Hendrik Bösing, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Klinische und funktionelle Untersuchungen zur Hämatopoese beim *Thrombocytopenia-Absent-Radii* (TAR-) Syndrom“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE - [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Teile, der unter 4.1 abgebildeten Ergebnisse wurden aus Prioritätsgründen bereits in dem Artikel „*Impact of genetic variants on haematopoiesis in patients with thrombocytopenia absent radii (TAR) syndrome*“ im *British Journal of Haematology* veröffentlicht.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Ort und Datum

Unterschrift

**Anteilerklärung an erfolgten Publikationen**

Hendrik Bösing hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Manukjan G, **Bösing H**, Schmugge M, Strauss G, Schulze H; Impact of Genetic Variants on Haematopoiesis in Patients with Thrombocytopenia Absent Radii (TAR) Syndrome; British Journal of Haematology; 2017; DOI: 10.1111/bjh.14913

Beitrag im Einzelnen: Für Tabelle 1 bis 3 erhob H. Bösing die Daten und stellte diese zusammen. Zu Abbildungen 1 bis 4 erfolgte die Datenerhebung durch H. Bösing. Gemeinsam mit G. Manukjan führte er zudem die statistische Auswertung durch und erstellte die Grafiken.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

## **9 Lebenslauf**

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

## 10 Komplette Publikationsliste

### Veröffentlichte Artikel:

Semeniak D, Kulawig R, Stegner D, Meyer I, Schwiebert S, **Bösing H**, Eckes B, Nieswandt B, Schulze H; Proplatelet formation is selectively inhibited by collagen type I through Syk-independent GPVI signaling; Journal of Cell Science; 2016; DOI: 10.1242/jcs.187971

Manukjan G, **Bösing H**, Schmugge M, Strauss G, Schulze H; Impact of Genetic Variants on Haematopoiesis in Patients with Thrombocytopenia Absent Radii (TAR) Syndrome; British Journal of Haematology; 2017; DOI: 10.1111/bjh.14913

### Vorträge:

59<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society of Thrombosis and Hemostasis Research; Düsseldorf, Februar 2015

Titel: Role of single nucleotide polymorphisms for platelet production in patients with thrombocytopenia with absent radii (TAR) syndrome

## 11 Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt meinem Betreuer, Prof. Dr. Harald Schulze, für die zahlreichen sehr lehrreichen und stets heiteren Gespräche, das stete Wecken der wissenschaftlichen Neugierde und nicht zuletzt für die entgegengebrachte Gastfreundschaft.

Großer Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Harald Schulze. Zuerst erwähnt seien die Berliner mit Silke Schwiebert und Rebecca Kulawig. Danke für ein tolles Jahr im Labor, die unendliche Unterstützung und die Geduld beim Beibringen der zahlreichen Methoden. Weiterhin möchte ich mich bei Georgi Manukjan für die Beantwortung zahlreicher Fragen, die vielen Hilfestellungen bei der Arbeit und insbesondere für die Begleitung des Schreibprozesses und bei Daniela Semeniak für die gemeinsamen Stunden am Mikroskop bedanken.

Des Weiteren sei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Christian Hagemeyer aus Berlin und der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Bernhardt Nieswandt in Würzburg für die vielen kleinen und großen Hilfen im Laboralltag gedankt.

Für den klinischen Bezug der Arbeit und die Beantwortung der entsprechenden Fragen, die stets bei guter Verpflegung stattfanden, möchte ich mich bei Frau Dr. Gabriele Strauß bedanken. Hinzu kommt der Dank an PD Dr. Markus Schmutz vom Kinderspital in Zürich für die Zusammenarbeit. Besonders herzlich möchte ich mich natürlich bei allen TAR-Patienten, die in den letzten Jahren von unserer Arbeitsgruppe betreut wurden, bedanken. Ohne ihre Mithilfe wäre die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Prof. Dr. Dr. Ute Modlich möchte ich für die Unterstützung bei der Etablierung der Transduktion danken.

Meinem Bruder danke ich für die Kommentare zu statistischen Besonderheiten. Ein großer Dank gilt meinen Eltern für die jahrelange Unterstützung und die Ermöglichung der Freiräume, die für das Anfertigen der Arbeit unerlässlich waren. Abschließend möchte ich mich bei meiner Frau für die stete Motivation und den unerschütterlichen Glauben in mich bedanken.