

# Megakaryozytäre Apoptose in der Primären Myelofibrose

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr.rer.nat.

genehmigte Dissertation

von

M.Sc. Katharina Theophile

geboren am 11.01.1982 in Lübeck

**2009**

Referent: Prof. Dr. med. Oliver Bock

Korreferent: Prof. Dr. Hans-Jörg Jacobsen

Tag der Promotion: 14.12.2009

KURZZUSAMMENFASSUNG .....	5
ABSTRACT .....	6
1 EINLEITUNG .....	7
1.1 Megakaryozyten .....	7
1.1.1 Allgemeines .....	7
1.1.2 Megakaryopoese .....	8
1.1.3 Megakaryozytäre Apoptose .....	10
1.2 Primäre Myelofibrose .....	11
1.2.1 Neoplasien .....	11
1.2.2 Myeloproliferative Neoplasien .....	13
1.2.3 Morphologie, Klinik und molekulare Pathologie der PMF .....	15
1.3 mRNA-Expressionsanalyse in einzelnen Zellen .....	17
1.3.1 Expressionsanalyse .....	17
1.3.2 Analyse einzelner Zellen .....	19
1.3.3 Formalin-fixiertes und Paraffin-eingebettetes Material .....	20
1.3.4 Laser-Mikrodissektion .....	22
1.3.5 RNA-Amplifikation .....	22
1.4 Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit .....	25
2 METHODEN .....	27
2.1 Methylenblaufärbung und Lasermikrodissektion .....	27
2.2 RNA-Isolierung .....	28
2.2.1 RNA-Isolierung aus FFPE Knochenmark .....	28
2.2.2 RNA-Isolierung aus mikrodisszierten Zellen .....	29
2.2.3 RNA-Isolierung aus Zellkulturen .....	30
2.3 cDNA-Synthese .....	30
2.4 Amplifikation .....	31
2.4.1 Kit #1: Express Art FFPE mRNA-amplification Kit .....	31
2.4.2 RP-PCR .....	33
2.4.3 Kit #2: Full Spectrum Complete Transcriptome RNA Amplification Kit .....	33
2.4.4 Kit #3: TaqMan PreAmp Master Mix Kit .....	34
2.5 Polyacrylamidgel .....	34
2.6 Bioanalyser .....	35
2.7 RT-qPCR .....	36
2.7.1 Einzelmessungen im 96-Well-Format .....	36
2.7.2 Low Density Arrays im 384-Well-Format .....	36
2.8 DNA-Isolierung .....	36
2.9 Pyrosequenzierung .....	37
2.10 COBRA .....	38
2.11 Datenverarbeitung und Statistik .....	39

2.12	Immunhistochemie.....	40
2.13	Zellkultur.....	40
2.14	Anoxie-Inkubation .....	41
2.15	Cobaltchlorid-Inkubation.....	41
2.16	siRNA-Transfektion.....	42
2.16.1	siRNA-Transfektion durch Liposomen .....	42
2.16.2	siRNA-Transfektion durch Elektroporation.....	42
2.17	Apoptose-ELISA.....	43
2.18	Western Blot.....	44
2.19	FACS.....	45
3	MATERIAL .....	46
4	ERGEBNISSE .....	52
4.1	Amplifikation von RNA und cDNA aus mikrodisszezierten Megakaryozyten.....	52
4.1.1	RNA-Amplifikation mit Kit #1.....	52
4.1.2	Randomisierte cDNA-Amplifikation mittels RP-PCR.....	55
4.1.3	Randomisierte cDNA-Amplifikation mit Kit #2.....	55
4.1.4	Spezifische cDNA-Amplifikation mit Kit #3.....	56
4.2	Expressionsanalyse Apoptose-assoziiierter Gene in der PMF.....	58
4.2.1	mRNA-Expression in Megakaryozyten und Knochenmark .....	58
4.2.2	Methylierungsstatus des BNIP3-Gens .....	63
4.2.3	Proteinexpression von BNIP3 im Knochenmark.....	64
4.3	Untersuchungen megakaryozytärer Zelllinien unter Hypoxie.....	65
4.3.1	Expression unter Anoxie .....	65
4.3.2	Expression nach siRNA-Transfektion .....	68
4.3.3	Apoptosedetektion mittels ELISA.....	70
4.3.4	Zellmorphologie.....	70
4.3.5	FACS .....	72
5	DISKUSSION .....	74
5.1	Evaluation der Amplifikationsmethoden.....	74
5.2	Expression Apoptose-assoziiierter Gene in Megakaryozyten und Knochenmark der PMF... 78	78
5.3	Hypoxie und Apoptose in der megakaryozytären Zellkultur .....	85
	ABKÜRZUNGEN.....	93
	LITERATURVERZEICHNIS .....	98
	DANKSAGUNG.....	109
	LEBENS LAUF.....	110
	PUBLIKATIONEN.....	111
	ERKLÄRUNG .....	113

# KURZZUSAMMENFASSUNG

Die Primäre Myelofibrose (PMF) gehört zur Gruppe der myeloproliferativen Neoplasien und ist somit durch eine klonale Akkumulation bestimmter blutbildender Zellen im Knochenmark gekennzeichnet, im Fall der PMF vor allem der Granulozyten und Megakaryozyten. Letztere haben im gesunden Knochenmark die Funktion der Plättchenbildung, die über Apoptose-ähnliche Vorgänge in Form von Abschnürungen ausgebildeter Pseudopodien erfolgt. In der PMF sind Megakaryozyten dagegen in ihrer Reifung gestört und hierdurch stark vergrößert und deformiert. Es wird in diesem Zusammenhang vermutet, dass die für die PMF typische und prognostisch ungünstige Fibrose des Knochenmarks durch eine Freisetzung fibrogener Cytokine während deregulierter Apoptose-assoziiierter Mechanismen der Megakaryozyten hervorgerufen wird.

Vor diesem Hintergrund sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob Apoptosefaktoren in Megakaryozyten der PMF auf mRNA-Ebene verändert exprimiert werden. Wesentlich waren dabei die Untersuchung einer möglichst hohen Anzahl an Genen und die Verwendung von Zellen *in situ*.

Trotz des damit verbundenen Problems, dass RNA aus archivierten Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten (FFPE) Knochenmarkbiopsien nur in stark fragmentierter Form isolierbar ist, konnte durch Laser-Mikrodissektion von je 200-300 Megakaryozyten und Präamplifikation der cDNA mittels spezifischer Primer eine quantitative PCR im Array-Format ermöglicht werden. Innerhalb der 48 untersuchten Gene zeigten sich dabei mehrere signifikant aberrant exprimierte Faktoren, wodurch die These einer gestörten Apoptose untermauert werden konnte. Die Rolle des vermindert exprimierten Hypoxie-induzierbaren Faktors BNIP3 wurde darüber hinaus in megakaryozytären Zellkulturen näher untersucht, wodurch Hinweise erlangt werden konnten, die eine zunehmende Apoptoserate mit abnehmender Sauerstoffkonzentration sowie eine pro-apoptische Funktion von BNIP3 vermuten lassen.

**Schlagwörter:** Megakaryozyten, Apoptose, Primäre Myelofibrose

# ABSTRACT

Primary myelofibrosis (PMF) is one entity of myeloproliferative neoplasms and, therefore, hallmarked by a clonal accumulation of certain blood-forming cells in the bone marrow - in case of PMF these cells are primarily granulocytes and megakaryocytes. In normal hematopoiesis megakaryocytes have the capacity to generate platelets apoptosis-related processes including the fragmentation of extended pseudopodia. In contrast, megakaryocytes in PMF show maturation defects leading to strongly enlarged and deformed cells. Furthermore, it is assumed that the prognostically unfavorable fibrosis of the bone marrow, which is typical for PMF, is induced by fibrogenic cytokines released by megakaryocytes during deregulated apoptosis-associated mechanisms.

Based on this background knowledge, the aim of this study was to determine if apoptotic factors in megakaryocytes from PMF are differentially expressed on the mRNA level. Thereby, the emphasis was put on an a preferably high number of analyzed genes and the use of cells *in situ*.

Despite the associated problem that RNA from formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissues is only extractable in a highly degraded form, a quantitative PCR analysis in an array format could be achieved by laser microdissection of 200-300 megakaryocytes each, followed by cDNA preamplification using specific primers. Within the cohort of 48 analyzed genes, several factors showed a significantly aberrant expression, supporting the theory of a disturbed apoptosis. The role of the downregulated hypoxia-inducible factor BNIP3 was further characterized in megakaryocytic cell culture assays leading to the assumption that the rate of apoptosis increases with decreasing oxygen levels and that BNIP3 has a pro-apoptotic function.

**Keywords:** megakaryocytes, apoptosis, primary myelofibrosis

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Megakaryozyten

### 1.1.1 Allgemeines

Das Knochenmark ist der primäre Ort der Blutbildung und somit auch das Organ, in dem Megakaryozyten hauptsächlich lokalisiert sind. Im erwachsenen Menschen ist nur noch im Inneren von Brustbein, Rippen, Schädelknochen und Becken blutbildendes („rotes“) Knochenmark zu finden, wobei die Durchsetzung und Verdrängung durch Fettzellen mit zunehmendem Alter weiter fortschreitet. Zwischen den Fettzellen sind alle Differenzierungsstufen der Hämatopoese zu finden, wobei die Abgabe der ausdifferenzierten Zellen ins Blut über ein dichtes Netz an als „Sinusoide“ bezeichnete Kapillaren erfolgt [1, 2].

Mit einem Durchmesser von bis zu 100  $\mu\text{m}$  sind Megakaryozyten die größten hämatopoetischen Zellen des Knochenmarks und somit morphologisch sehr einfach zu identifizieren [3]. Das große Volumen wird dabei durch eine für Megakaryozyten spezifische Endomitose erreicht, also eine Mitose ohne vollständige Cytokinese. Durch dieses Ausbleiben der Zellteilung entsteht ein großer, lobulierter Kern mit einem Chromosomensatz von bis zu 128 N [4]. Charakteristisch ist weiterhin ein inneres Membransystem, das als „demarcation membrane system“ (DMS) bezeichnet wird und das Cytoplasma mit Cisternae der Plasmamembran durchzieht, sowie zahlreiche Granula [5].

Die Hauptfunktion der Megakaryozyten im Organismus ist, soweit bekannt, die Bildung von anukleären Blutplättchen und damit die Bildung der wesentlichen Effektoren der Blutgerinnung. Megakaryozyten und Plättchen sind spezifisch für

Mammalia, wobei der funktionelle Vorteil dieser Entwicklung unbekannt ist, da auch andere Vertebraten sowie Invertebraten Zellen für die Blutgerinnung besitzen. Diese sind im Gegensatz zu den Plättchen nukleäre Zellen und werden korrekterweise als Thrombozyten bezeichnet, obwohl die Begriffe „Plättchen“ und „Thrombozyten“ oft auch synonym verwendet werden [6]. Nur 1‰ der Zellen im gesunden Knochenmark sind Megakaryozyten [7], trotzdem produziert ein Erwachsener täglich  $10^{11}$ - $10^{12}$  Plättchen, also ca. ein Hundertstel der  $10^{13}$  menschlichen Zellen [8], wobei ungefähr  $10^4$  Plättchen aus einem Megakaryozyten hervorgehen [9].

### 1.1.2 Megakaryopoese

Wie alle hämatopoetischen Zellen hat auch der Megakaryozyt seinen Ursprung in der hämatopoetischen Stammzelle (HSC), deren Tochterzellen während der sogenannten „Megakaryopoese“ einer zunehmenden Differenzierung in Richtung dieses Zelltyps unterworfen sind. Dabei werden multipotente, oligopotente und unipotente Zwischenstufen durchlaufen, deren jeweilige Determinierung sowohl stochastisch durch intrinsische Faktoren als auch durch externe Faktoren bedingt ist [10]. Abbildung 1-1 zeigt die klassische Vorstellung der hämatopoetischen Entwicklung, nach der die Differenzierung zunächst in lymphatische oder myeloische Richtung verläuft und in letzterer Gruppe weiter in Richtung Megakaryozyten / Erythrozyten oder Monozyten / Granulozyten. Mittlerweile sind allerdings Abweichungen von diesem recht einfachen Schema bekannt; so wurden zum Beispiel Stammzellen entdeckt, die zwar ein Potential für alle lymphatischen Zellen und für Monozyten / Granulozyten besitzen, sich aber nicht mehr in Megakaryozyten / Erythrozyten differenzieren können [11].

Wie bei den meisten Differenzierungsprozessen spielen auch bei der Megakaryopoese eine Vielzahl an Signalmolekülen eine Rolle, darunter IL3 und Transkriptionsfaktoren wie GATA1 oder NFE2 [12]. Der wichtigste Regulator ist aber Thrombopoetin (TPO), ein Cytokin, das von Stromazellen des Knochenmarks sowie in Leber und Niere produziert wird. Rezeptor des Thrombopoetins ist MPL, das per Homologie zu einem murinen Viruskogen identifiziert wurde [13].



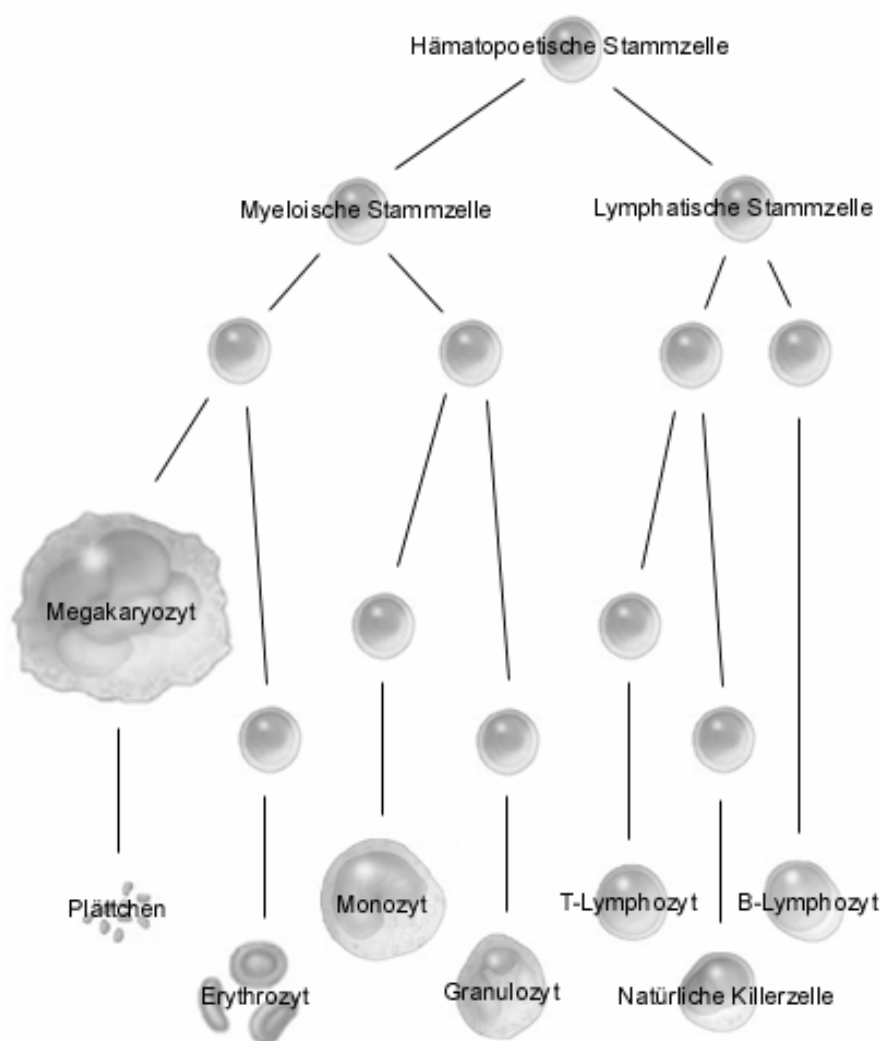


Abbildung 1-1: Vereinfachtes Schema der Hämatopoese ausgehend von der hämatopoetischen Stammzelle (modifiziert nach [14]).

Der Zusammenhang zwischen Plättchen und Megakaryozyten wurde 1906 von Wright [15] entdeckt, der durch umfangreiche mikroskopische Studien an verschiedensten Tieren zu der Überzeugung gelangt war, „daß die Blutplättchen abgeschnürte Teile des Cytoplasmas jener Riesenzellen des Knochenmarks und der Milz sind, welche ... ‚Megakaryocyten‘ ... genannt worden sind.“ Weiterhin schreibt er: „Die Mehrzahl der Riesenzellen besitzt sphärische Form, die Minderheit zeigt Formen von großer Mannigfaltigkeit und Unregelmäßigkeit, die durch Fortsatz- und pseudopodienartige Bildungen von wechselnder Länge, Form und Breite hervorgehen. ... Man kann sie zuweilen in das Lumen eines Blutgefäßes durch dessen

lückenhafte Wand hindurch hineinragen sehen. Einige von ihnen haben, wie man sehen kann, den Zusammenhang mit der Riesenzelle verloren und derartige freie Pseudopodien sind nicht nur in den Blutkanälen des Marks und der Milz, sondern auch in den Lungenkapillaren gefunden worden.“

Heute wird davon ausgegangen, dass diese Beobachtungen tatsächlich zutreffen, nachdem jahrzehntelang auch andere Modelle diskutiert worden waren. Eines davon beschreibt die Thrombopoese (Plättchenbildung) als Unterteilung des megakaryozytären Cytoplasmas durch das DMS in unzählige „platelet territories“, aus denen dann durch eine globale Fragmentierung die Thrombozyten entstehen. Das DMS gilt mittlerweile aber als Membranreservoir für die Ausbildung der Pseudopodien, auch „proplatelets“ (Proplättchen) genannt. Insbesondere durch die Studie von Junt et al. [16] konnte gezeigt werden, dass die Ausbildung von Proplättchen kein Artefakt und kein Zellkultureffekt ist, indem die Megakaryopoese und Thrombopoese direkt im Knochenmark lebender Mäuse mikroskopisch verfolgt wurde. Über die Erkenntnisse von Wright hinaus wurde gezeigt, dass die meist vereinzelt, selten in Gruppen vorkommenden Megakaryozyten immer Kontakt zu einem Sinusoid haben und durchschnittlich alle 7 h ein Fragment, das ca. 1/20 des Volumens des Megakaryozyten, aber das ca. 1000-fache Volumen eines maturen Plättchens ausmacht, abschnüren und ins Blut abgeben. Dieser Prozess wird durch den Blutfluss verstärkt und auch die letztendliche Generierung von maturen Plättchen durch den späteren Zerfall der Proplättchen scheint von der Strömung des Blutes abhängig zu sein. Nach der Abschnürung eines Großteils des megakaryozytären Cytoplasmas, wird der verbleibende „naked nuclei“ von Makrophagen phagozytiert [3], womit die Thrombopoese folglich die letzte Stufe der megakaryozytären Differenzierung ausmacht.

### **1.1.3 Megakaryozytäre Apoptose**

Die Apoptose, also der „programmierte Zelltod“, wird klassischerweise in einen extrinsischen und einen intrinsischen Signalübertragungsweg unterteilt, die entsprechend durch die Involvierung externer Rezeptoren bzw. eine Permeabilisierung von Mitochondrien gekennzeichnet sind. Ein weiteres Charakteristikum beider Wege und abgrenzendes Merkmal gegenüber der Nekrose, also dem unkontrollierten Verlust der Zellintegrität, sowie der Autophagie, also dem

lysosomalen Abbau von Proteinen und Organellen, ist die Aktivierung von Proteinabbauenden Caspasen [17]. Allerdings setzt sich auch hier immer mehr die Erkenntnis durch, dass eine strikte Trennung aufgrund zahlreicher Überschneidungen nicht möglich ist. So sind zum Beispiel BCL2 und andere Mitglieder der BCL2-Familie sowohl in Apoptose-, Nekrose- als auch Autophagie-Mechanismen involviert [18].

Aufgrund morphologischer Ähnlichkeiten mit apoptotischen Prozessen wie der Reorganisation des Cytoskeletts, dem Abschnüren von Vesikeln und dem kontrollierten Abbau durch Phagozyten wird die Thrombopoese schon lange als eine Art Apoptose bezeichnet [19]. Diese Hypothese wurde durch zahlreiche molekulare Untersuchungen bestätigt; so geht zum Beispiel die Ausbildung und Abschnürung von Proplättchen mit der lokalen Aktivierung von CASP3 einher, die nach der Abschnürung von Proplättchen in eine diffuse Verteilung übergeht [20]. Auch bei CASP9 konnte beobachtet werden, dass sich die Expression auf den Zellkörper beschränkt, Proplättchen und Plättchen aber keine CASP9 enthalten [21]. Durch diese „lokale Apoptose“ lässt sich erklären, dass nur der Megakaryozyt abgebaut wird, die Plättchen aber noch eine Lebensdauer von ungefähr 8-9 Tagen [22] aufweisen [23]. Ein weiteres Beispiel ist das anti-apoptotische BCL2L1 (auch BCLX), dessen Expression während der megakaryozytären Differenzierung ansteigt, in der letzten Phase der Thrombopoese bzw. Apoptose aber stark abnimmt [24]. Hiermit übereinstimmend führt eine Überexpression dieses Proteins zu einem Rückgang der Proplättchen-ausbildenden Megakaryozyten [25].

## **1.2 Primäre Myelofibrose**

### **1.2.1 Neoplasien**

Neoplasien („neo“ = neu, „plastein“ = formen) oder auch Tumoren im engeren Sinne sind klonale Zellen, die aufgrund aberranter vererbbarer Eigenschaften unabhängig von physiologischen Stimuli proliferieren. Unterschieden werden dabei zum einen benigne Neoplasien, die sich durch differenzierte Zellklone und eine geringere Wachstumsrate auszeichnen, und zum anderen maligne

Neoplasien, die meist aus nicht oder wenig differenzierten Zellen bestehen und die Fähigkeit zur Invasion benachbarten Gewebes sowie zur Metastasierung besitzen. Der hauptsächlich umgangssprachlich verwendete Begriff „Krebs“ steht für diese malignen Neoplasien. Darüber hinaus gibt es allerdings auch nicht eindeutig als maligne oder benigne einzuordnende Neoplasien sowie benigne Vorstufen, die eine maligne Transformation unterlaufen.

Zu den hämatologischen Neoplasien zählen grundsätzlich die myeloischen Neoplasien und die lymphatischen Neoplasien, die entsprechend Zellen des myeloischen bzw. lymphatischen Zweiges betreffen. Die myeloischen Neoplasien können dabei als akute Form vorliegen (AML) und durch eine meist rasche Ausbreitung von neoplastischen Vorläuferzellen (Blasten) gekennzeichnet sein; oder es handelt sich um chronische Formen, deren neoplastische Zellen in aberranter Weise ausdifferenzieren und mittelfristig zu verschiedenen Störungen der Hämatopoese führen [26].

Die Sichtweise, dass Anomalien des Erbmaterials ein unbegrenztes Wachstum hervorrufen können, war lange umstritten. So schreibt als Reaktion auf Boveris 1914 veröffentlichte Theorie von „teilungshemmenden“ und „teilungsfördernden Chromosomen“ [27] Ribbert: „... mißbildete Zellen sind abnorme Zellen und daher unter allen Umständen weniger wucherungsfähig als normale. Auch der mißbildete Mensch leistet stets weniger als der regelmäßig gebaute, und es ist willkürlich, für die Zellen das umgekehrte Verhältnis anzunehmen.“ [28] Nichtsdestotrotz setzte sich Boveris Sichtweise noch weit vor der Entdeckung der DNA und erster Tumorsuppressor- bzw. Onkogene durch.

Vollständig geklärt ist das Prinzip der Tumorigenese aber bis heute nicht. Als gesichert gilt, dass der Ursprung stets in einer einzigen Zelle liegt, die durch mehrere Mutationen bzw. andere vererbare Aberrationen das Potential zur unbegrenzten Proliferation erreicht hat. Bis zur endgültigen Transformation akkumulieren die entweder spontan oder durch Faktoren wie Chemikalien, Viren oder ionisierende Strahlung ausgelösten Veränderungen dabei oft über Jahre und viele Zellgenerationen hinweg. Trotz dieses monoklonalen Ursprungs, findet man in Tumoren eine hohe funktionale Heterogenität der Zellen. Zur Erklärung dieses Phänomens werden zwei Modelle diskutiert: zum Einen kann argumentiert werden, dass sich durch weitere Mutationen und Selektionsprozesse verschiedene Subklone

entwickeln. Dies würde auch die häufig beobachtete zunehmende Aggressivität und Malignität während der Tumorprogression erklären [26]. Zum Anderen wird von der Existenz von „cancer stem cells“ ausgegangen, die in Analogie zu normalen Stammzellen durch asymmetrische Teilung eine funktional aber nicht genetisch heterogene Zellpopulation aufrecht erhalten. Durch dieses Modell lässt sich unter Anderem erklären, dass nur bestimmte Subpopulationen ein tumorigenes Potential besitzen, wenn sie in immundefiziente Mäuse injiziert werden [29].

Eine weitere Frage betrifft die „cell of origin“, also die Identifizierung der Ursprungszelle des Tumors. Theoretisch kann dies jede Zelle sein, ob Stammzelle oder voll ausdifferenzierte Zelle. Nach dem „cancer stem cell“-Modell wird allerdings meist eine multipotente Stammzelle als „cell of origin“ vermutet, obwohl verbunden mit der Transformation natürlich auch eine Dedifferenzierung von Vorläuferzellen oder ausdifferenzierten Zellen denkbar wäre [30].

Grundsätzlich gesehen könnte also durchaus die schon im vorletzten Jahrhundert postulierte „Principiosigkeit als Princip der Krebszellen“ zutreffen [31].

## **1.2.2 Myeloproliferative Neoplasien**

Grundlage jeder Diagnose, Therapie und medizinischen Forschung ist eine Systematik der Krankheiten. Diese sollte idealerweise eine allumfassende Beschreibung von klar definierten und abgegrenzten pathologischen Entitäten beinhalten und ist somit zurzeit noch einem ständigen Wandel unterworfen.

Die aktuelle Version der „WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues“ [32] klassifiziert die myeloproliferativen Neoplasien (MPN) als Untergruppe der myeloischen Neoplasien. Neben einigen sehr seltenen oder nicht eindeutig klassifizierbaren Untergruppen und der neu hinzugekommenen systemischen Mastozytose, gehören zu den „klassischen“ MPN, die in der vorherigen WHO-Klassifikation noch als „chronische myeloproliferative Erkrankungen“ bezeichnet wurden, die Chronische Myeloische Leukämie (CML), die Polycythaemia Vera (PV), die Essentielle Thrombozythämie (ET) sowie die Primäre Myelofibrose (PMF). Die CML ist dabei als einzige Entität der MPN durch das Vorliegen einer spezifischen Translokation zwischen Chromosom 9 und Chromosom 22 gekennzeichnet, durch die das Fusionsonkogen BCR-ABL exprimiert wird. Die Entdeckung dieses sogenannten „Philadelphia-Chromosoms“

im Jahr 1960 [33] war der erste genetische Defekt, der einer spezifischen Neoplasie zugeordnet werden konnte, und führte zur Entwicklung eines einzigartig wirksamen spezifischen Inhibitors [34].

Dagegen sind bei den Philadelphia-Chromosom-negativen (Ph<sup>-</sup>) PV, ET sowie PMF bisher keine Entität-spezifischen genetischen Defekte bekannt. Der klonale Ursprung liegt wahrscheinlich in der HSC, wobei der proliferierende Zellklon aber hauptsächlich die ausdifferenzierten myeloischen Zellen, also Erythrozyten, Granulozyten sowie Megakaryozyten umfasst. In der PV liegt der Schwerpunkt dabei auf den Erythrozyten, während ET und PMF hauptsächlich eine Proliferation der Megakaryozyten, letztere auch der Granulozyten aufweisen. Neben zahlreichen cytogenetischen Aberrationen sind seit einigen Jahren auch mehrere Punktmutationen bekannt, die zu unterschiedlichen Anteilen in den Ph<sup>-</sup> MPN auftreten. Hervorzuheben ist dabei die mit Abstand häufigste Mutation V617F im JAK2-Gen, die 2005 „mehr oder weniger zufällig“ von fünf verschiedenen Gruppen publiziert wurde [35-39]. JAK2(V617F) tritt in ca. 95% der PV-Fälle sowie jeweils in ca. 50% der ET- und PMF-Fälle auf. Darüber hinaus wurde die Mutation auch in einigen Fällen anderer myeloischer Neoplasien nachgewiesen [40], lymphatische Neoplasien sowie andere Tumorarten scheinen aber nicht betroffen zu sein [41, 42]. Neben den Mutationsraten unterscheiden sich innerhalb der Ph<sup>-</sup> MPN auch die jeweiligen Frequenzen der mutierten Allele, in der Literatur als „gene dosage“ bezeichnet: während die ET fast ausschließlich heterozygote Zellen aufweist, sind PV und PMF in ca. 1/3 der Fälle durch eine homozygote JAK2(V617F)-Mutation gekennzeichnet. Es gibt Hinweise, dass hierin ein Grund für die klinischen Unterschiede zwischen den Entitäten zu sehen ist [43].

Die onkogene Wirkung der JAK2(V617F)-Mutation erklärt sich durch eine drastische Konformationsänderung, die zur kontinuierlichen Autoaktivierung des Proteins führt [44]. In der nicht mutierten Form wird JAK2 dagegen wie alle Januskinasen nur durch Liganden-gebundene Cytokinrezeptoren aktiviert, um dann per Phosphorylierung das Signal weiterzuleiten. In der Hämatopoese kann die JAK2(V617F)-Mutation auf diese Weise unter anderem das Erythropoetin und Thrombopoetin ersetzen und so eine Cytokin-unabhängige Proliferation und Differenzierung hervorrufen [45].

Die JAK2(V617F)-Mutation wurde bis dato auch in familiär gehäuft auftretenden Fällen von MPN nicht als Keimbahnmutation, sondern stets als somatische Mutation identifiziert. Kürzlich konnte allerdings eine deutliche Korrelation zwischen einem SNP im JAK2-Gen und JAK2(V617F), also eine genetische Prädisposition für die Mutation an sich oder einen weiteren Selektionsvorteil von JAK2(V617F)-mutierten Zellklonen, nachgewiesen werden [46].

Trotz der nahen Verwandtschaft und vieler Überschneidungen innerhalb der Ph<sup>+</sup> MPN ist eine differenzierte Betrachtung und eindeutige Klassifikation wichtig, da sich die Prognosen der drei Entitäten deutlich voneinander unterscheiden. So geht man bei einer ET<sup>+</sup> allgemein von einer annähernd uneingeschränkten Lebenserwartung aus, bei der PV zeigt sich dagegen eine um den Faktor 1,5 erhöhte Mortalität, während die PMF die deutlich schlechteste Prognose mit einem medianen Überleben nach Diagnose von 4-5,5 Jahren hat [47].

### **1.2.3 Morphologie, Klinik und molekulare Pathologie der PMF**

Der Verlauf der PMF kann in zwei Phasen, eine präfibrotische und eine fibrotische, eingeteilt werden. Erstere ist gekennzeichnet durch eine Hyperzellularität des Knochenmarks mit erhöhtem zellulären Anteil der Granulopoese und Megakaryopoese, während die zweite Phase eine zunehmende Fibrose des Knochenmarks (Myelofibrose), also eine Vermehrung von Retikulin- und Kollagenfasern und somit eine Verdrängung der blutbildenden Zellen, ausmacht. Eine gängige Kennzeichnung bei der morphologischen Diagnostik ist dabei die Einteilung in vier Myelofibrosegrade: mf 0 bei linearen Retikulinfasern wie im gesunden Knochenmark; mf 1 bei netzwerkartig überlagerten Retikulinfasern; mf 2 bei deutlichem Anstieg an Retikulinfasern und lokalen Kollagenbündeln; mf 3 bei deutlichem Anstieg an Retikulinfasern und ausgeprägten Kollagenbündeln, oft verbunden mit einer Verhärtung des Knochengewebes [48]. Das Risiko des Übergangs aus der präfibrotischen Phase (mf 0/1) in die fibrotische Phase (mf 2/3), die eine deutlich geringere Überlebensrate aufweist, wird auf 50-70% geschätzt und somit auf deutlich höhere Werte als in der ET<sup>+</sup> oder PV [49]. Die molekularen Hintergründe der Myelofibrose sind relativ wenig untersucht, insbesondere scheinen

aber fibrogene Cytokine wie PDGF, TGF $\beta$  und BFGF, die unter Anderem von Megakaryozyten produziert werden, eine Rolle zu spielen [50].

Neben der Myelofibrose ist eine stark atypische Morphologie der Megakaryozyten die auffälligste Veränderung in der PMF, die bereits in der präfibrotischen Phase zu demonstrieren ist. So können hauptsächlich stark vergrößerte Zellen mit charakteristischen „Wolkenkernen“ beobachtet werden, die oft in ungewöhnlichen Clustern vorliegen, und darüber hinaus eine erhöhte Anzahl an „naked nuclei“ [51]. Es wird angenommen, dass diese Merkmale Charakteristika einer gestörten Megakaryopoese und somit auch einer gestörten Apoptose sind und dass sich durch einen hiermit möglicherweise einhergehenden passiven Efflux von fibrogenen Cytokinen auch die Myelofibrose erklären lässt [50].

Die Inzidenz der PMF wird zurzeit auf jährlich 0,21 pro 100.000 Personen geschätzt, wobei meist Patienten zwischen 60 und 70 Jahren betroffen sind [52]. Klinische Symptome treten oft erst in der fibrotischen Phase auf und sind eher unspezifisch wie Müdigkeit, Gewichtsverlust oder Nachtschweiß. Ein Verdacht auf PMF ergibt sich oft durch eine tastbare Milzvergrößerung in Verbindung mit veränderten Blutwerten (Anämie oder Erhöhung der Leukozyten- oder Plättchenzahl) [53]. Die eindeutige Diagnose nach WHO erfordert aber immer eine Beckenkammbiopsie zur morphologischen Untersuchung des Knochenmarks. Auch ein Mutationstest auf JAK2(V617F) wird mittlerweile häufig durchgeführt, allerdings kann bei Negativität eine PMF nicht ausgeschlossen werden und bei Positivität müssen als Differentialdiagnose auch eine PV oder ET in Betracht gezogen werden.

Zur molekularen Pathologie der PMF gibt es zahlreiche Studien über weitere Mutationen, cytogenetische Aberrationen sowie epigenetische Faktoren, wobei allerdings jeweils nur geringe Anteile der Patienten betroffen sind. Die häufigste Mutation neben JAK2(V617F) ist dabei mit ca. 5% der Fälle MPL(W515L/K), eine Punktmutation des JAK2-assoziierten Thrombopoetin-Rezeptors, die ebenfalls eine kontinuierliche Aktivierung des entsprechenden Signalweges hervorruft [54]. Ungefähr 1/3 der PMF-Fälle weisen verschiedene cytogenetische Aberrationen auf, wobei am häufigsten Chromosom 13 und Chromosom 20 betroffen sind. Allerdings konnten hieraus bisher keine pathologischen Zusammenhänge abgeleitet werden [55]. An epigenetischen Veränderungen wurde eine Hypermethylierung des SOCS3-Promotors nachgewiesen, die allerdings auch in anderen Neoplasien beobachtet



werden kann [56]. Auch zahlreiche veränderte Expressionswerte auf mRNA-Ebene wurden publiziert, darunter Microarray-Studien mit hämatopoetischen Stammzellen oder Granulozyten aus dem Blut von PMF-Patienten [57, 58].

Zusammenfassend muss man aber feststellen, dass die kausalen Ursachen der PMF sowie der anderen Ph<sup>+</sup> MPN wie bei den meisten Neoplasien nur ansatzweise verstanden sind. Die Entdeckungen der JAK2- und MPL-Mutationen leisteten zwar einen wichtigen Beitrag, lassen viele Aspekte zur Pathologie der MPN aber noch ungeklärt. Für die zukünftige Forschung steht hierbei sicherlich im Vordergrund, welche molekularen Defekte die JAK2(wt)/MPL(wt)-Fälle aufweisen und inwiefern die gleiche Mutation die Pathogenese von drei verschiedenen Entitäten beeinflusst bzw. welche zusätzlichen molekularen Ursachen diese unterschiedlichen Entitäten bedingen.

## **1.3 mRNA-Expressionsanalyse in einzelnen Zellen**

### **1.3.1 Expressionsanalyse**

Der Begriff „Expression“ oder „Genexpression“ beschreibt den Weg von der genetischen Information bis zum Funktionsträger, klassischerweise als die drei Stationen DNA-RNA-Protein beschrieben. Heutzutage gestaltet sich dieses Bild als weitaus komplexer, da auch RNA mittlerweile als wichtiger Funktionsträger erkannt wurde und sich darüber hinaus abzeichnet, dass zahlreiche epigenetische Faktoren die Expression beeinflussen [59].

Im Rahmen der Expressionsanalyse wird meist durch quantitative oder semi-quantitative Ansätze untersucht, welche Gene abhängig von verschiedenen Faktoren wie zum Beispiel Zelltyp oder Vorliegen einer Erkrankung in welchem Maße exprimiert werden. Dabei kann sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene angesetzt werden, wobei beachtet werden sollte, dass mRNA-Expressionsdaten aus funktionaler bzw. zellbiologischer Sicht weniger aussagekräftig sein können, da eine Änderung bzw. Konstanz der mRNA-Expression nicht immer mit der Expression oder Funktionalität der Proteine korreliert. Nichtsdestotrotz können mRNA-Expressionsdaten natürlich wichtige Hinweise auf funktionale Zusammenhänge

liefern, insbesondere durch „High-Throughput“-Ansätze. Diese werden auch in der klinischen Forschung in immer größerem Umfang eingesetzt. Vorrangig ist hier die Identifikation von (Surrogat-)Markergruppen, die eine genauere Subklassifizierung verschiedener Krankheiten und damit eine bessere Diagnostik und Therapie ermöglichen könnten [60].

Zwei für die Expressionsanalyse auf mRNA-Ebene oft verwendete Methoden sind Microarrays und die quantitative „real-time“-PCR (qPCR) nach reverser Transkription (RT-qPCR). Erstere erfasst die Hybridisierung fluoreszenzmarkierter cDNA an spezifische Oligonukleotide oder cDNAs, die meist im Format mehrerer 10.000 Detektionspunkte auf Glaträger gedruckt sind [61]. Auf diese Weise kann die Expression des gesamten Transkriptom untersucht werden. Allerdings sprechen viele widersprüchliche Ergebnisse der zahlreichen Microarray-Studien für eine geringe Validität der Daten(auswertung) [61]. Oft werden deshalb mittels Microarrays als differentiell identifizierte Gene per RT-qPCR reevaluiert [62]. Die qPCR-Methode ermöglicht über DNA-spezifische oder Amplikon-spezifische Fluoreszenz-Markierung eine Detektion der entsprechenden Amplifikation während der PCR. Anhand der Zyklenzahl, zu der ein bestimmter Fluoreszenz-Schwellenwert innerhalb der exponentiellen Phase erreicht wird, des sogenannten  $C_T$ -Wertes, kann die ursprüngliche mRNA-Konzentration absolut (durch parallele Messung standardisierter Proben) oder relativ zu einer endogenen Kontrolle (Referenzgen) berechnet werden [63]. Einem  $C_T$ -Wert von 24 liegt hiernach theoretisch eine doppelt so hohe Menge an cDNA zu Grunde wie einem  $C_T$ -Wert von 25. Der größte Nachteil der klassischen qPCR im Vergleich zum Microarray ist die begrenzte Probenanzahl durch das Pipettieren einzelner Reaktionen, zukünftig können hier aber deutliche Verbesserungen erwartet werden [64]. Eines der aktuell fortschrittlichsten kommerziellen Systeme ermöglicht bereits die gleichzeitige Analyse von 384 Genen durch in den Reaktionsräumen vorgelegte Primer und die Probenzuführung per Zentrifugation (Abbildung 1-2).

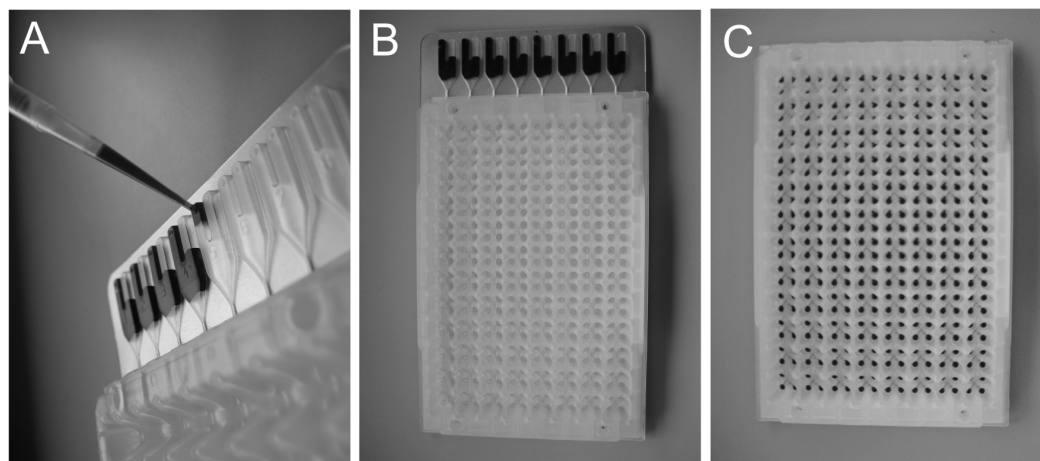


Abbildung 1-2: Quantitative PCR im LDA-Format. A: Befüllen der Proben-Slots mit cDNA und PCR-Mastermix (dunkle Färbung nur zum Zweck der besseren Visualisierung). B: Array vor Zentrifugation. C: Array nach Zentrifugation, während der die cDNA über Kanäle in die einzelnen Reaktionsräume mit vorgelegten Primern gelangt. Die Kanäle werden anschließend verschlossen und die Slots entfernt.

### 1.3.2 Analyse einzelner Zellen

Werden im Rahmen von mRNA-Expressionsanalysen makroskopische Gewebestücke oder -schnitte als Untersuchungsmaterial eingesetzt, so muss bei der Interpretation beachtet werden, dass eine Über- oder Unterexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht immer in kausalem Zusammenhang mit dem Untersuchungskriterium, zum Beispiel einer Tumorerkrankung, steht. So kann auch die Veränderung von relativen Anteilen unterschiedlicher Zelltypen für die Verschiebung von Expressionsniveaus bestimmter mRNAs innerhalb der gesamten isolierten mRNA verantwortlich sein, da sich unterschiedliche Zellarten in ihrem Transkriptom meist zu großen Teilen unterscheiden. Zum Beispiel ist eine typische Begleiterscheinung von vielen Tumorerkrankungen eine Neoangiogenese, also eine Neubildung von Gefäßen zur besseren Versorgung des Tumorgewebes, und somit auch eine Zunahme von Endothelzellen [65]. Würde man nun die Expression einer mRNA messen, die von Endothelzellen stärker exprimiert wird als von anderen Zelltypen, wäre das Ergebnis eine Überexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe, die aber in keinem direkten pathologischen Zusammenhang mit der Erkrankung steht und somit keinesfalls als „Heraufregulierung“ interpretiert werden darf.

Aussagekräftig können also immer nur Expressionsdaten sein, die sich auf die zelluläre Ebene zurückführen lassen.

Ideal wäre in dieser Hinsicht natürlich die Expressionsanalyse von jeweils einer einzigen Zelle, aber auch mehrere Zellen eines bestimmten Zelltyps können valide Ergebnisse liefern, da man hier davon ausgehen kann, dass die Transkriptome der einzelnen Zellen übereinstimmen. Möchte man dabei nicht auf *in vitro*-Systeme wie die Zellkultur ausweichen, bietet vor allem die Laser-Mikrodissektion die Möglichkeit, homogene Zellgruppen oder mehrere einzelne Zellen zu isolieren. Für bestimmte Anwendungen kann auch die Zellsortierung per FACS in Frage kommen, zum Beispiel für die Isolierung definierter Zellen aus dem Blut [66].

### 1.3.3 Formalin-fixiertes und Paraffin-eingebettetes Material

Humanes Gewebe, das zu diagnostischen Zwecken durch Resektion oder als Biopsie gewonnen wurde, muss schnellstmöglich fixiert werden, um eine enzymatische Autolyse oder einen Befall durch Mikroorganismen zu verhindern und somit die morphologische bzw. molekulare Qualität für nachfolgende Untersuchungen ausreichend zu erhalten. Darüber hinaus muss das Gewebe in eine aushärtende Lösung eingebettet werden, um per Kryostat bzw. Mikrotom in  $\mu\text{m}$ -dünne Schnitte verarbeitet werden zu können. Für die Konservierung gibt es zwei grundlegende Methoden: Die Kryofixierung sowie die chemische Fixierung.

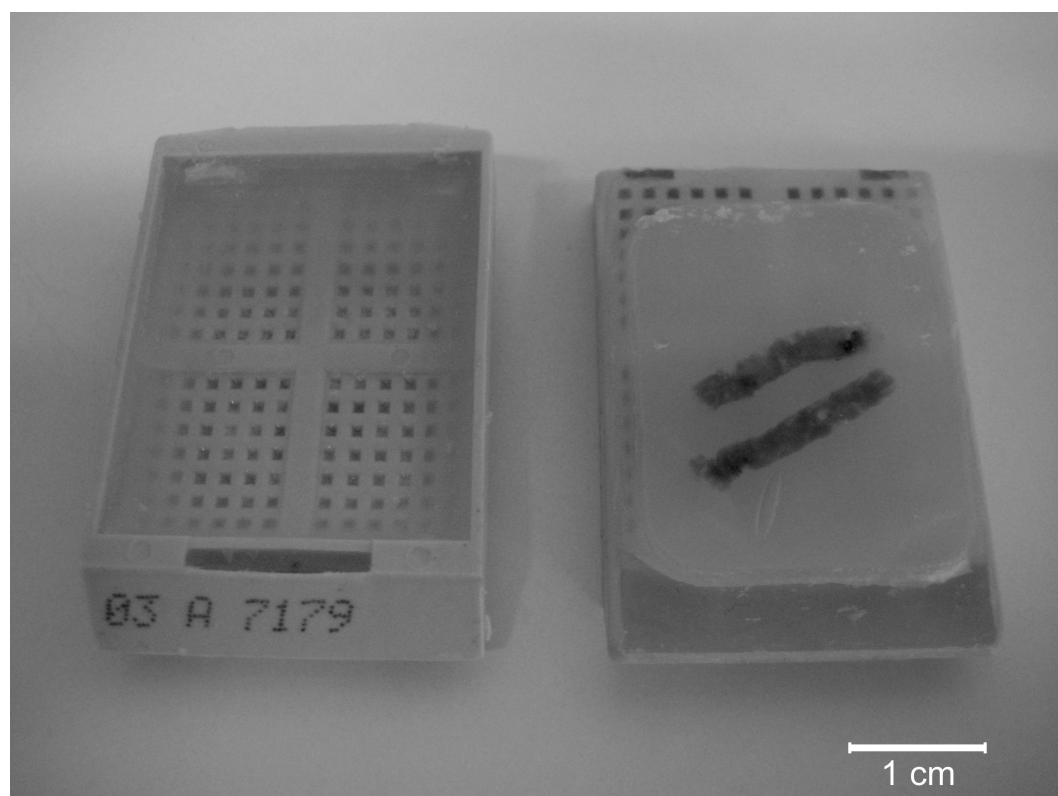
Vor der Kryofixierung wird das Gewebe zunächst in eine Lösung eingebettet, die Polyvinylalkohole und Polyethylenglykole enthält und dann bei einer Temperatur von meist  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Vorteile dieser Methode sind die sehr schnelle Prozessierung, die zum Beispiel bei intra-operativen Diagnosen benötigt wird und vor allem die gute Qualität der Nukleinsäuren für molekulare Untersuchungen. Wichtigster Nachteil ist die schlecht erhaltene Morphologie [67].

Für die chemische Fixierung wird hauptsächlich gepuffertes Formalin (Formaldehydlösung in Wasser und Methanol) verwendet. Die Fixierungszeit liegt dabei in der Praxis zwischen mehreren Stunden und mehreren Tagen. Das Formaldehyd führt zu einer Quervernetzung von Proteinen und Nukleinsäuren, was sämtliche zelluläre Prozesse unterbindet und gleichzeitig die morphologische Struktur festigt. Die Einbettung erfolgt hier nach der Fixierung, wobei meist Paraffin verwendet wird. Die Vorteile der Formalin-Fixierung und Paraffin-Einbettung

(FFPE) sind vor allem der sehr gute Erhalt zellulärer Strukturen und darüber hinaus die einfache Archivierung bei Raumtemperatur. Dem entgegen steht allerdings der große Nachteil, dass DNA und RNA nur unter deutlichen Qualitätsverlusten isolierbar sind. So können aufgrund der Quervernetzung mit Proteinen nur Fragmente der Nukleinsäuren extrahiert werden, die bei DNA typischerweise Längen von bis zu 400 bp und bei RNA von nicht mehr als 200 nt aufweisen [68].

Trotz dieser Einschränkungen können (nach geeigneten Optimierungen der Extraktionsmethoden) DNA sowie RNA in nahezu allen molekularbiologischen Methoden eingesetzt werden, solange nur die Fragmentierung beachtet wird. Bei der PCR sollten zum Beispiel die Primer so gewählt werden, dass die Amplikonlänge optimalerweise unter 100 bp liegt [69].

Auch die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Knochenmarkbiopsien werden ausschließlich als FFPE Blöcke archiviert (Abbildung 1-3), da für die oft schwierige Diagnose eine bestmögliche morphologische Qualität gegeben sein muss.



**Abbildung 1-3: FFPE Knochenmarkbiopsien (Vorder- und Rückseite mit Archivierungsnummer und an den Plastikträger fixierten Paraffinblock).**

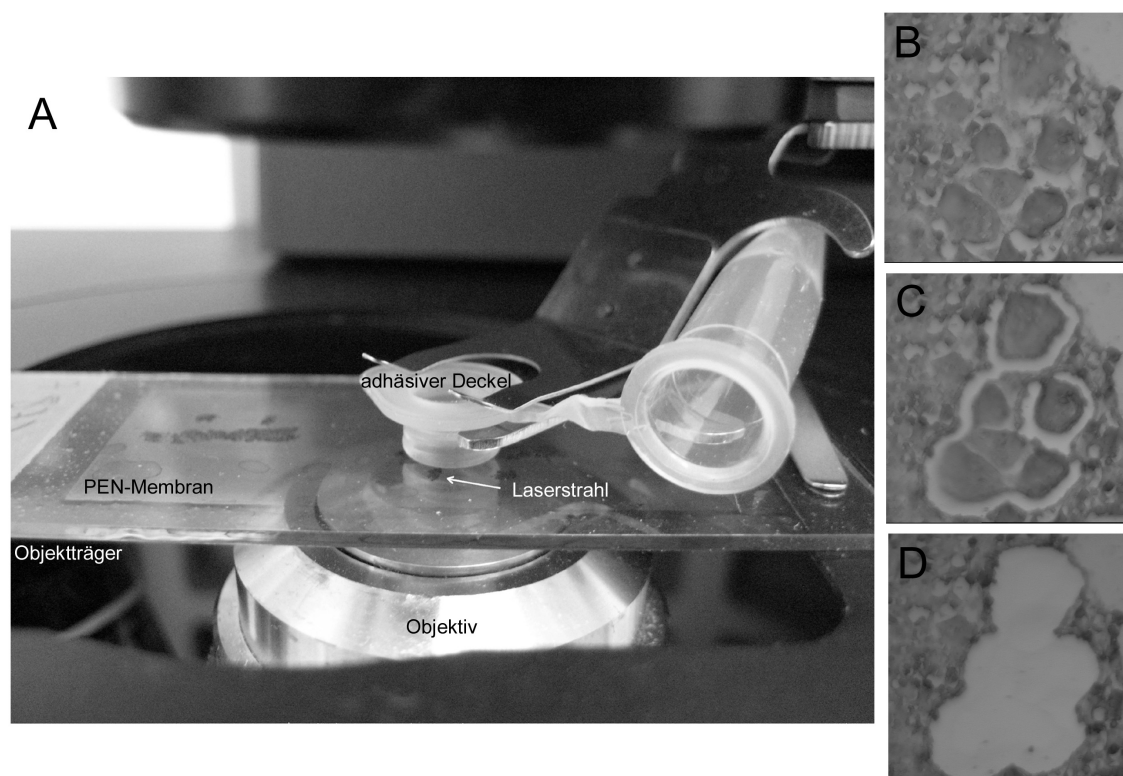
### 1.3.4 Laser-Mikrodissektion

Um definierte Zelltypen aus festem Gewebe zu isolieren und molekularbiologisch zu untersuchen, gibt es, solange man nicht auf *in vitro*-Systeme wie die Zellkultur ausweichen und das „Microenvironment“ möglichst erhalten möchte, praktisch nur die Methode des Herausschneidens, also der (Mikro-)Dissektion. Da dies ausschließlich in zwei Dimensionen praktikabel ist, müssen Gewebeschnitte verwendet werden, die deutlich dünner als der Zelldurchmesser sind. Größere Zellareale können auf diese Weise manuell per Skalpell oder Nadel disseziert werden, wobei je nach gewünschter Präzision zusätzlich ein Mikroskop in Verbindung mit einem Mikromanipulator eingesetzt werden sollte [70].

Da dieses Vorgehen allerdings nicht für die Dissektion von Einzelzellen geeignet ist, führte erst die Entwicklung von Laser-basierten Systemen zu einer größeren Akzeptanz und Verbreitung der Mikrodissektion. Hierbei können grundsätzlich zwei Methoden unterschieden werden: zum Einen kann eine über der Probe liegende Polymerfolie mittels eines Infrarotlasers entlang der Umrisse der Zelle bzw. der Zellgruppe mit der Probe verschmolzen werden, wodurch beim Anheben der Folie der gewünschte Bereich an dieser haften bleibt. Zum Anderen können UV-Laser eingesetzt werden, die Folie und Gewebe zerschneiden und das dissezierte Areal senkrecht nach oben katapultieren, wo dieses in einem Reaktionsgefäß aufgefangen werden kann [71]. Auch das im Rahmen dieser Arbeit verwendete System gehört zu letzterer Gruppe (Abbildung 1-4).

### 1.3.5 RNA-Amplifikation

Theoretisch können per Laser-Mikrodissektion so viele Zellen oder Zellgruppen isoliert werden, bis die benötigte Menge an Nukleinsäuren erreicht ist. Geht man hierbei aber zum Beispiel von 1 µg einzusetzender RNA aus, müssten bei einem Gehalt von 30 pg je Zelle [72] größenordnungsmäßig  $10^4$  Zellen mikrodisseziert werden. Dies kann insbesondere bei einzeln lokalisierten Zellen schnell an praktikable Grenzen stoßen. Als Alternative bietet sich deshalb eine Amplifikation der mRNA an.



**Abbildung 1-4: Laser-Mikrodissektion. Die Zellen auf der Membran (B) werden per Laser disseziert (C) und in den adhäsiven Deckel des Reaktionsgefäßes katapultiert (D).**

Grundsätzlich gibt es neben einer derartigen Amplifikation des Ausgangsmaterials auch die Möglichkeit einer Signalamplifikation. Bei Microarrays wird dies zum Beispiel durch enzymatische Aktivierung von Fluorophoren oder durch Fluorophor-besetzte Dendrimere, also hochverzweigte Moleküle erreicht. Bei der qPCR ist eine Signalamplifikation ohnehin schon durch das PCR-Prinzip gegeben. Während die Sensitivität einer qualitativen PCR deswegen zur Detektion von nur einem cDNA-Molekül ausreicht, erhöht sich der Bedarf bei der qPCR allerdings deutlich, da neben einer hohen Sensitivität auch eine hohe Reproduzierbarkeit gegeben sein muss. So liegen in einem theoretischen Modell von Peccoud et al. die relativen Messunsicherheiten bei fast 100%, wenn nur ein Ausgangsmolekül eingesetzt wird und bei ca. 10%, wenn die Anzahl auf 100 erhöht wird [73]. Erst mit 10.000 Molekülen war es möglich, die 1%-Grenze zu erreichen. So empfiehlt ein führender Hersteller von qPCR-Systemen den Einsatz von 1-100 ng cDNA (aus gesamter RNA) pro Reaktion [74]. Bei Analyse von einzelnen mikrodissezierten Zellen wird man also meistens auf eine zusätzliche Amplifikation der RNA oder cDNA angewiesen sein.

Derartige Amplifikationsmethoden des Ausgangsmaterials lassen sich grundsätzlich in lineare und exponentielle oder auch PCR-basierte Methoden unterteilen. Sämtliche lineare Amplifikationsmethoden basieren dabei auf dem Prinzip der 1990 veröffentlichten „Eberwine-Methode“ [75]: Die mRNA wird zunächst in cDNA umgeschrieben, wobei die Primer zusätzlich mit einem Promotor der T7 DNA-abhängigen RNA-Polymerase versehen werden. Nach dem Verdau der RNA und anschließender Synthese des komplementären cDNA-Stranges ist so eine *in vitro*-Transkription möglich. Die erhaltene antisense-RNA kann in einer oder mehreren Runden erneut amplifiziert werden und dann für die Expressionsanalyse eingesetzt werden. Bei der Verwendung von Microarrays muss hierbei darauf geachtet werden, ob sense- oder antisense-RNA bzw. cDNA benötigt wird. Im Fall der qPCR ist die Orientierung des Ausgangsmaterials ohnehin irrelevant, wodurch eine einfache cDNA-Synthese an die lineare Amplifikation angeschlossen werden kann.

Im Gegensatz zur isothermischen linearen RNA-Amplifikation beruhen die exponentiellen Methoden auf dem PCR-Prinzip. Zunächst wird dafür die RNA in cDNA umgeschrieben, um dann mittels randomisierter Primer, spezifischer Primer oder durch das Anhängen von Primerbindungsstellen (zum Beispiel per Terminaler Transferase) amplifiziert zu werden [76].

Die größte Problematik bei der Amplifikation von RNA bzw. cDNA, die anschließend für die mRNA-Expressionsanalyse eingesetzt werden soll, ist die Erhaltung von relativen Transkriptmengen. So gibt es mehrere Studien zu linearen Amplifikationsmethoden, die gerade bei geringen Ausgangsmengen eine hohe Variabilität der Daten im Vergleich zu nicht amplifizierter RNA zeigen [77]. Hauptsächlicher Grund hierfür scheint ein schneller Übergang der wirklich linearen Amplifikation in eine Art Sättigungsphase zu sein [78]. Weitere Nachteile bei der linearen Amplifikation sind die höheren Kosten und die deutlich aufwendigere Durchführung. Bei der exponentiellen cDNA-Amplifikation muss dagegen die ebenso exponentielle Fehlerfortpflanzung auch in Form unterschiedlicher Effizienzen bezüglich der verschiedenen Transkripte als nachteilig bezeichnet werden [76].

Weitere Einschränkungen sind außerdem zu beachten, wenn im Rahmen einer Laser-Mikrodissektion von einzelnen Zellen eine Amplifikation der stark



fragmentierten RNA aus FFPE Gewebe durchgeführt werden muss: Zunächst scheiden alle Amplifikationsmethoden aus, die ein Priming des Poly-A-Schwanzes beinhalten, da nur noch ein geringer Anteil der mRNA-Fragmente das ursprüngliche 3'-Ende aufweist. Darüber hinaus wäre in diesen wenigen Fragmenten das bekannte Problem des 3'-Bias [77] noch verstärkt, da hier jeder Unterschied in der Entfernung der eigentlichen Detektionspunkte vom 3'-Ende zu einer nicht den relativen Transkriptmengen entsprechenden Präsenz innerhalb der Fragmente führen würde. Als weiteres Problem bei der Amplifikation von RNA aus FFPE Gewebe könnte theoretisch auch der Einsatz von randomisierten Primern in einer exponentiellen Amplifikation zu beachten sein, da diese Methode zwangsläufig mit einer zunehmenden Verkürzung der Amplikons einhergeht und diese zu nicht mehr detektierbaren Fragmentlängen führen könnte.

Aufgrund der Abhängigkeit des Amplifikationserfolges von der Qualität der degradierten RNA ist eine vorherige Validierung in Bezug auf Erhalt der relativen Transkriptmengen also unbedingt notwendig, da die Fragmentlänge laborabhängig stark variieren kann [68].

## **1.4 Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit**

Trotz der besonderen Stellung der Apoptose in der Megakaryopoese und der Megakaryozyten in der PMF ist der Aspekt der megakaryozytären Apoptose und damit der Thrombopoese in der PMF nur wenig untersucht. Gerade hierin könnten aber die Ursachen der so auffällig aberranten Morphologie der Megakaryozyten und eines Effluxes fibrogener Cytokine in der PMF begründet liegen. Darüber hinaus kann die Analyse von Apoptosefaktoren und damit von potentiellen Tumorsuppressor- oder Onkogenen auch immer Hinweise auf mögliche Transformationsmechanismen liefern.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten deshalb Methoden etabliert werden, um eine Array-basierte Analyse von mRNA-Expressionsleveln in Laser-mikrodissezierten Megakaryozyten aus FFPE Knochenmarkbiopsien zu ermöglichen. Hierdurch sollten im Folgenden in einer hinreichend großen Studiengruppe aberrant

exprimierte Apoptose-relevante Gene identifiziert werden, um diese anschließend in Zellkulturexperimenten in ihrer funktionellen Rolle der Megakaryopoese beziehungsweise der Pathologie der PMF untersuchen zu können.

## 2 METHODEN

Alle unterstrichenen Reagenzien, Materialien, Geräte sowie Softwareprodukte sind im MATERIAL-Teil dieser Arbeit noch einmal mit genauen Artikelbezeichnungen und Herstellerangaben aufgeführt (substituierbare Standardausstattung wie Pipetten, Reaktionsgefäße, Zellkulturmaterial sowie Standardchemikalien sind in dieser Liste nicht vertreten). Kitkomponenten sind mit den vom Hersteller gewählten Namen in Anführungszeichen angegeben.

### 2.1 Methylenblaufärbung und Lasermikrodissektion

Zur Isolierung von Megakaryozyten aus FFPE Knochenmark wurden je nach Größe der Biopsie vier bis acht 4 µm starke Mikrotomschnitte im 37°C warmen Wasserbad auf PEN-Membran-Objektträger aufgezogen, die zuvor mit Poly-L-Lysin beschichtet (durch Einpinseln der Folie mit 0,017%-iger Lösung) und unter UV-Licht für ca. 30 min sterilisiert worden waren. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht im 42°C warmen Trockenschrank getrocknet und am nächsten Tag jeweils 10 min in zwei Xylolersatzbädern entparaffiniert. Es folgten mehrere Waschstrepe in Ethanolbädern (vergällter Ethanol) mit abnehmender Konzentration (2 x 2 min 100%, 2 x 2 min 90%, 2 x 2 min 70%) und eine Inkubation für 4 min in Leitungswasser, bevor die Schnitte in einer Methylenblaulösung (1:5 in

DEPC-H<sub>2</sub>O) für ca. 2 s gefärbt und über Nacht im Trockenschrank getrocknet wurden. Eine Lagerung erfolgte für höchstens eine Woche bei 4°C.

Für die Laser-Mikrodissektion wurden adhäsive Reaktionsgefäße verwendet, die in einem Abstand von wenigen mm über den eingespannten Objektträger positioniert wurden, wobei strengstens darauf geachtet wurde, dass jeglicher Kontakt zum Objektträger und somit eine eventuelle Adhäsion von nicht gewünschten Teilen der Knochenmarkbiopsie vermieden wurde. Innerhalb von ca. 2-3 h wurden je Fall 200-300 repräsentative Megakaryozyten per Laser mikrodiseziert und automatisch in den adhäsiven Deckel des Reaktionsgefäßes katapultiert. Anschließend wurde sofort mit der Isolierung der RNA begonnen.

## 2.2 RNA-Isolierung

### 2.2.1 RNA-Isolierung aus FFPE Knochenmark

Je nach Größe der Biopsie wurden fünf bis acht 15 µm starke Mikrotomschnitte eingesetzt. Diese wurden in 300 µl Proteinase K-Lösung (20 mg/ml in 0,2% DEPC-H<sub>2</sub>O), 750 µl Verdauungslösung (4,2 M Guanidinthiocyanat, 30 mM Tris-HCl pH 7,6, 2% Natrium-N-Lauroylsarcosin) und 5,5 µl 2-Mercaptoethanol über Nacht bei 55°C und 500 rpm in einem Thermoschüttler inkubiert.

Am folgenden Tag sorgte eine Zentrifugation bei höchstmöglicher Umdrehungszahl ( $13200 \text{ min}^{-1} = 16100 \text{ g}$ ) und 4°C für eine Abtrennung des Paraffins über der Lösung und eine Ansammlung des unverdaulichen Materials am Boden des Reaktionsgefäßes, wodurch mit einer Pipette die Lösung in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden konnte. Hierzu wurden nacheinander 100 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2), 630 µl saures, wassergesättigtes Phenol und 270 µl Chloroform gegeben, kräftig gevortext und die Proben für ca. 15 min auf Eis inkubiert. Zur weiteren Phasentrennung erfolgte anschließend eine Zentrifugation für ca. 20 min bei maximaler Umdrehung und 4°C. Die obere, wässrige Phase wurde dann vorsichtig abpipettiert und die darin enthaltene RNA mit dem gleichen Volumen 2-Propanol und kräftigem Vortexen ausgefällt. Für eine größere Menge an

Präzipitat und damit eine bessere Sichtbarkeit des späteren Pellets wurde jeweils 1 µl Glykogen (20 mg/ml) zugesetzt. Um die Fällung der RNA zu optimieren, folgte daraufhin eine Inkubation bei -20°C über Nacht oder alternativ eine längere Lagerung der Proben.

Zur Resolvatation wurde 20 min bei maximaler Umdrehung und 4°C zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet in ca. 300 µl Ethanol (70% in DEPC-H<sub>2</sub>O, -20°C) durch Vortexen gewaschen. Es folgte eine erneute Zentrifugation (5 min, maximale Umdrehung, 4°C) und Abnahme des Überstands. Je nach Pelletgröße und benötigter RNA-Konzentration wurde das Pellet dann nach kurzem Lufttrocknen auf Eis (unter dem Abzug) in 20-40 µl kaltem DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst, indem kräftig und wiederholt gevortext und anzentrifugiert wurde. Die RNA-Lösung konnte dann nach Bestimmung der RNA-Konzentration mit dem Photometer (260 nm) für die cDNA-Synthese eingesetzt werden. Hierbei nicht benötigte Restmengen wurden durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2 1/2 Volumen Ethanol erneut gefällt und bei -20°C gelagert.

### 2.2.2 RNA-Isolierung aus mikrodisszierten Zellen

Die mikrodisszierten Zellen wurden durch direktes Pipettieren einer Lösung aus 50 µl Proteinase K (20 mg/ml in 0,2% DEPC-H<sub>2</sub>O) und 50 µl Verdauungslösung (4,2 M Guanidinthiocyanat, 30 mM Tris-HCl pH 7,6, 2% Natrium-N-Lauroylsarcosin) auf den Deckel des adhäsiven Reaktionsgefäßes aufgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 0,5 µl 2-Mercaptoethanol wurde der Übernachtverdau in einem Wärmeschränkchen bei 50°C durchgeführt.

Zur Phasentrennung erfolgte eine Zugabe von 10 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2), 63 µl saurem, wassergesättigtem Phenol und 27 µl Chloroform sowie eine 15-minütige Inkubation auf Eis nach kräftigem Vortexen. Alle weiteren Schritte erfolgten genau wie im Fall der RNA-Isolierung aus Gesamtknochenmark. Einzig die Bestimmung der RNA-Konzentration konnte aufgrund der extrem geringen isolierbaren RNA-Mengen nicht durchgeführt werden, stattdessen wurde jedes Pellet in 10 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst, um diese dann komplett für die cDNA-Synthese einzusetzen.

### 2.2.3 RNA-Isolierung aus Zellkulturen

Im Fall von Suspensionskulturen wurden die Zellen eines Versuchsansatzes (2,5 ml-15 ml) für 10 min bei 1700 g (Raumtemperatur) zentrifugiert und das Pellet durch Dekantieren vom Überstand befreit. Auf das Pellet wurde dann 1 ml Trizol gegeben, worin die Zellen durch Pipettieren resuspendiert und lysiert wurden. Im Fall von adhärennten Kulturen konnte das Trizol direkt auf den vom Medium befreiten Zellrasen gegeben werden, der mittels eines Zellkratzers ebenfalls resuspendiert und lysiert wurde. 1 ml der Trizol-Suspension wurden dann in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und für mindestens 2 h oder über Nacht bei -20°C inkubiert.

Nach dem Auftauen wurden die Proben für ca. 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Phasentrennung erfolgte eine Zugabe von 200 µl Chloroform, kräftiges Vortexen, eine Inkubation für 3 min bei Raumtemperatur und eine Zentrifugation bei 12.000 g und 4°C für 15 min. 500 µl der oberen wässrigen Phase wurden dann in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur Fällung der RNA mit 500 µl 2-Propanol versetzt und gevortext. Nach einer Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur und einer ebenso langen Zentrifugation bei 12.000 g und 4°C wurde das Pellet durch vorsichtiges Pipettieren vom Überstand befreit und in 1 ml Ethanol (70% in DEPC-H<sub>2</sub>O, -20°C) durch leichtes Vortexen gewaschen. Der Überstand wurde nach einer Zentrifugation für 5 min bei 7500 g erneut abgenommen und das Pellet in 90 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst, anschließend mit 10 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 250 µl Ethanol gefällt, um eine Lagerung bei -20°C zu ermöglichen.

Die Resolvatation für die cDNA-Synthese erfolgte dann genau wie bei der RNA-Isolierung aus FFPE Knochenmark.

## 2.3 cDNA-Synthese

10 µl RNA gelöst in DEPC-H<sub>2</sub>O in der entsprechenden Konzentration (Knochenmark, Zellkultur: 1 µg/10 µl; mikrodissizierte Megakaryozyten: gesamte RNA) wurden zu 10 µl Mastermix des High Capacity Reverse Transcription Kits

pipettiert, der zuvor aus „10x RT Buffer“, „25x dNTP Mix“, „10x RT Random Primers“, „RNase Inhibitor“ und „MultiScribe Reverse Transcriptase“ laut Anleitung des Herstellers angesetzt worden war. Die nach einer guten Durchmischung der Komponenten folgenden Reaktionsbedingungen beliefen sich auf 10 min 25°C, 2 h 37°C sowie 5 s 85°C zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase. Zur Lagerung wurde die cDNA-Lösung bei -20°C eingefroren.

## 2.4 Amplifikation

### 2.4.1 Kit #1: Express Art FFPE mRNA-amplification Kit

Die RNA aus 200-300 mikrodisezierten Megakaryozyten gelöst in 8 µl DEPC-H<sub>2</sub>O wurde laut Handbuch des Kits #1 folgendermaßen weiterbehandelt: Zunächst wurden 1 µl „dNTP-Mix“ und 1 µl des Trinukleotid-Primers „Primer TR“ hinzugegeben und 4 min bei 65°C inkubiert. Dann folgte für die erste cDNA-Synthese die Zugabe von 4 µl „DEPC-H<sub>2</sub>O“, 4 µl „5x RT Buffer“, 1 µl „RNase Inhibitor“ und 1 µl „RT Enzyme“ sowie eine Inkubation für 45 min bei 37°C, 10 min bei 45°C, 5 min bei 50°C und 1 min bei 37°C. Als nächstes wurden 3 µl „DEPC-H<sub>2</sub>O“, 1 µl „5x Extender Buffer“ und 1 µl „Primer Erase“ dazugegeben und 5 min bei 37°C, 15 min bei 80°C und 1 min bei 37°C inkubiert. Zum Verdau der RNA wurden dann 3 µl „DEPC-H<sub>2</sub>O“, 1 µl „5x Extender Buffer“ sowie 1 µl „RNase“ dazupipettiert und für 20 min bei 37°C in den Thermocycler gestellt. Ausgehend von der einsträngigen cDNA erfolgte dann die Synthese von dsDNA durch Zugabe von zunächst 10 µl „DEPC-H<sub>2</sub>O“, 3 µl „5x Extender Buffer“, 1 µl des Trinukleotid-Primers „Primer B“ und 1 µl „dNTP-Mix“ sowie eine Inkubation von 1 min bei 96°C und 1 min bei 37°C und anschließende Zugabe von 3 µl „DEPC-H<sub>2</sub>O“, 1 µl „5x Extender Buffer“ sowie 1 µl „Extender Enzyme A“ und einer Inkubation von 30 min bei 37°C. Für die folgende Aufschmelzung der dsDNA und die erneute Synthese von dsDNA mit integriertem T7-Promotor wurden folgende Zugaben und Inkubationen durchgeführt: 3 µl „DEPC-H<sub>2</sub>O“, 1 µl „5x Extender Buffer“, 1 µl „Primer Erase“, 5 min 37°C, 6 min 96°C, 1 min 37°C, 5 µl „Primer C“,

1 min 96°C, 1 min 37°C, 2 µl „DEPC-H<sub>2</sub>O“, 2 µl „5x Extender Buffer“, 1 µl „Extender Enzyme B“, 30 min 37°C, 15 min 65°C, 1 min 37°C.

Als nächstes folgte eine Silicasäulen-basierte Aufreinigung dieser dsDNA, die folgenderweise durchgeführt wurde: Zu der Probe wurden 350 µl „Binding Buffer“ und 3 µl „Carrier DNA“ dazupipettiert und alles auf eine „Spin Column“ gegeben. Durch Zentrifugation für 1 min bei maximaler Umdrehungszahl (16.100 g) wurde die DNA an die Silicamembran gebunden und das Eluat im „Collection Tube“ gesammelt und verworfen. Es folgten zwei Waschschrte mit 500 µl bzw. 200 µl „Washing Buffer“ und erneuter 1-minütiger Zentrifugation. Durch Zugabe von 2 x 50 µl „Elution Buffer“, je 2 min Inkubation bei Raumtemperatur und Zentrifugation für je 1 min wurde die DNA eluiert. Zu den 100 µl Eluat wurden dann zur Fällung der DNA 10 µl „Sodium Acetate“, 2 µl „Precipitation Carrier“ und 220 µl Ethanol (-20°C) gegeben. Nach gründlichem Vortexen und einer Inkubation von 2 min bei Raumtemperatur wurde 10 min zentrifugiert (16.100 g) und das Pellet vom Überstand befreit. Das Pellet wurde dann in 200 µl 70% Ethanol (-20°C) gewaschen, 5 min zentrifugiert und nach Abnahme des Überstands einige Minuten luftgetrocknet. Die Resolubilisierung erfolgte in 8 µl „Solubilisation Buffer“.

Die eigentliche *in vitro*-Transkription und somit RNA-Synthese und -Amplifikation wurde nach Zugabe von 8 µl „NTP-Mix“, 2 µl „10x Buffer“ und 2 µl „RNA Polymerase“ über Nacht bei 37°C durchgeführt. Nachfolgend wurde die DNA mit 1 µl „DNase I“ bei 37°C für 15 min verdaut.

Die anschließende RNA-Aufreinigung erfolgte wie vom Hersteller angegeben mit dem RNeasy Kit. Dafür wurden zum Ansatz 80 µl „RNase-Free Water“, 350 µl „Buffer RLT“ sowie 250 µl Ethanol pipettiert, alles auf eine „Mini Spin Column“ gegeben und 15 s bei 10.000 g zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und zweimal mit je 500 µl „Buffer RPE“ gewaschen. Zur vollständigen Entfernung der Waschlösung wurde noch einmal für 1 min bei 16.100 g zentrifugiert. Die RNA konnte dann durch zweimaliges Zugeben von je 50 µl „RNase-Free Water“, eine je zweiminütige Inkubation bei Raumtemperatur und eine Zentrifugation für 1 min bei 10.000 g eluiert werden. Es folgte eine Fällung der RNA mit Natriumacetat und Ethanol, die genauso durchgeführt wurde wie die vorherige Fällung der DNA (siehe oben), mit der Ausnahme, dass das Pellet letztendlich in 5 µl „DEPC-H<sub>2</sub>O“ statt in 8 µl gelöst wurde.



Die anschließende cDNA-Synthese erfolgte durch Zugabe bzw. Inkubation von 1 µl „dNTP-Mix“, 2 µl „Primer D“, 2 µl „Reaction Additive“, 4 min 65°C, 4 µl „DEPC-H<sub>2</sub>O“, 4 µl „5x RT Buffer“, 1 µl „RNase Inhibitor“, 1 µl „RT Enzyme“, 30 min 45°C und 15 min 70°C. Als nächstes wurde die RNA durch Zugabe von 3 µl „DEPC-H<sub>2</sub>O“, 1 µl „5x Extender Buffer“ und 1 µl „RNase“ sowie Inkubation für 20 min bei 37°C verdaut. Die Synthese von dsDNA mit T7-Promotor wurde dann mit folgenden Reagenzien und Thermocycler-Bedingungen durchgeführt: 10 µl „DEPC-H<sub>2</sub>O“, 5 µl „Primer C“, 4 µl „5x Extender Buffer“, 1 µl „dNTP-Mix“, 1 min 96°C, 1 min 37°C, 3 µl „DEPC-H<sub>2</sub>O“, 1 µl „5x Extender Buffer“, 1 µl „Extender Enzyme B“, 30 min 37°C, 15 min 65°C.

Ab diesem Punkt wurden dann für eine zweite Amplifikationsrunde die Schritte Säulen-basierte Aufreinigung der dsDNA, Fällung der DNA, *in vitro*-Transkription, Aufreinigung der RNA mit dem RNeasy Kit und die RNA-Fällung wiederholt. Zuletzt erfolgte mit der amplifizierten antisense-RNA eine cDNA-Synthese (siehe 2.3).

#### 2.4.2 RP-PCR

Leicht modifiziert nach Peng et al. [79] wurden je 5,6 µl cDNA aus Knochenmark in 10 µl-Reaktionen mit 1 µl 10x PCR-Puffer, 1 mM Magnesiumchlorid, 0,1 mM dNTP, 500 ng Random-Hexameren und 0,025 U Taq DNA-Polymerase für 5 min bei 95°C sowie für 10 Zyklen aus 1 min 95°C, 1 min 37°C, 5 min 50°C inkubiert. Die präamplifizierte cDNA wurde anschließend bei -20°C gelagert.

#### 2.4.3 Kit #2: Full Spectrum Complete Transcriptome RNA Amplification

##### Kit

Die RNA aus 200-300 mikrodisszierten Megakaryozyten bzw. 50 ng RNA aus der im Kit #2 enthaltenen Kontroll-RNA, aus Gesamtknochenmark oder aus Zellkultur wurde laut Protokoll des Herstellers in 3 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst und mit 2 µl „Universal Primer Mixture“ versetzt. Zum Annealing dieser randomisierten Primer folgte eine Inkubation bei 70°C für 4 min und bei 25°C für 5 min. Anschließend wurden jeweils 1 µl DEPC-H<sub>2</sub>O, 2 µl „5x Reverse Transcriptase Buffer“, 1 µl „dNTP Mix“, 0,5 µl „Dithiothreitol (DTT)“ sowie 0,5 µl „Reverse

Transcriptase“ hinzupipettiert und 50 min bei 42°C sowie 5 min bei 95°C zur cDNA-Synthese bzw. zur Inaktivierung des Enzyms inkubiert.

Für die Amplifikation der cDNA erfolgte dann jeweils eine Zugabe von 74 µl DEPC-H<sub>2</sub>O, 10 µl „10x PCR Buffer“, 2 µl „dNTP Mix“, 2 µl „Full Spectrum PCR Primer“ und 2 µl „PCR Polymerase“. Das anschließende Thermocycler-Programm bestand aus folgenden Schritten: 4 min 95°C, 5 min 68°C, 25 s 95°C, 1 min 58°C, 1,5 min 68°C, 14 bzw. 30 Zyklen [25 s 95°C, 1 min 68°C], und 2 min 68°C. Die amplifizierte cDNA wurde dann bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

#### 2.4.4 Kit #3: TaqMan PreAmp Master Mix Kit

Für die genspezifische Amplifikation mit dem Kit #3 musste zunächst ein Pool aus den Primern, die auch in der später durchzuführenden qPCR eingesetzt werden sollten, hergestellt werden. Dazu wurden 5 µl jedes Gene Expression Assays, also der Primerpaare, gepoolt und mit TE-Puffer (10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA) auf 500 µl aufgefüllt. Derselbe Pool wurde dann für alle Reaktionen eines Projekts verwendet und bei -20°C gelagert.

Für die Amplifikation wurden 12,5 µl dieses Pools mit 25 µl „PreAmp Master Mix“ versetzt und zu 12,5 µl der zu amplifizierenden cDNA (siehe 2.3) pipettiert. Die Reaktionen wurden anschließend für 10 min bei 95°C sowie für 14 Zyklen aus 15 s bei 95°C und 4 min bei 60°C inkubiert. Die Lagerung der amplifizierten cDNA erfolgte bei -20°C.

## 2.5 Polyacrylamidgel

Je Gel (ca. 13 x 15 cm) wurden 30 ml 6% (w/v) Acrylamid (38% Acrylamid, 2% Bisacrylamid) in 1x TBE-Puffer (1,08% (w/v) Tris, 0,55% (w/v) Borsäure, 0,002 M EDTA pH 8) mit 500 µl 10% Ammoniumpersulfat und 20 µl Tetramethylethyldiamin versetzt und daraufhin sofort zwischen zwei mit Spacern versehene horizontal liegende Glasplatten gegossen. Nach Einsetzen des Kammes und mindestens 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur konnte das polymerisierte Gel in die Gelkammer gesetzt, diese mit 1x TBE-Puffer befüllt und

die Geltaschen mit 10 µl der entsprechenden Probe und 1 µl Ladepuffer (0,2% (w/v) Bromphenolblau, 0,2% (w/v) Xylencyanol, 0,06 M EDTA, 60% (v/v) Glycerin) bzw. 3 µl DNA-Größenmarker (16,7% (v/v) in vollentsalztem H<sub>2</sub>O mit 16,7% (v/v) Ladepuffer) befüllt werden. Die Elektrophorese wurde dann bei 180-200 V durchgeführt.

## 2.6 Bioanalyzer

Die Qualitätskontrolle der amplifizierten RNA wurde mit einem Bioanalyzer und RNA-Gelchips durchgeführt. Zur Vorbereitung des Gels wurden 550 µl „Gel Matrix“ auf einen „Spin Filter“ gegeben und per 10-minütiger Zentrifugation bei 1500 g filtriert. 65 µl hiervon wurden dann mit 1 µl „Dye Concentrate“ versetzt und erneut kräftig gevortext. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 13000 g, um eventuelle ungewünschte Partikel auf dem Boden des Reaktionsgefäßes zu sammeln, wurden 9 µl des Gel-Farbstoff-Mixes in ein vorgesehene Well des Chips pipettiert und mit einer speziellen Spritze in der „Chip Priming Station“ in die Kanäle des Chips gepresst. Zwei weitere Wells wurden wie vorgeschrieben ebenfalls mit je 9 µl des Gel-Farbstoff-Mixes befüllt, während alle restlichen Wells mit 5 µl „Marker“ versetzt wurden. Als Letztes wurde je 1 µl der Proben (RNA gelöst in RNase-freiem H<sub>2</sub>O) in die Proben-Wells bzw. 1 µl eines zuvor für 2 min bei 70°C denaturierten RNA-Größenmarkers („Ladder“) in das vorgesehene Well pipettiert. Nach 1-minütigem Vortexen des Chips auf einem speziellen Schüttler wurde der Gellauf wie in der Geräteanleitung beschrieben durchgeführt.

## 2.7 RT-qPCR

### 2.7.1 Einzelmessungen im 96-Well-Format

Für die relative Quantifizierung von mRNA wurden je 20 µl-Reaktion 10 µl Gene Expression Master Mix, 1 µl des entsprechenden Gene Expression Assays, der Primer und die FAM-MGB-Sonde enthält, sowie 50-75 ng cDNA aus Zellkulturversuchen bzw. 100-150 ng cDNA aus Knochenmark eingesetzt. Im Fall einer vorherigen Präamplifikation wurden 0,5 µl der amplifizierten cDNA je Well verwendet.

Bei allen Ansätzen für die qPCR wurden stets Mastermixe mit möglichst großem Volumen verwendet und strengstens auf eine zufällige Verteilung der Proben auf den Platten geachtet.

Die qPCRs wurden in einem 7500 Real-Time PCR System im Modus „Standard 7500“ durchgeführt. Die ermittelten  $C_T$ -Werte („Auto  $C_T$ “) wurden anschließend anhand der aufgezeichneten Amplifikationskurven kontrolliert und exportiert.

### 2.7.2 Low Density Arrays im 384-Well-Format

Die Low Density Arrays wurden je 100 µl-Slot mit 50 µl Gene Expression Master Mix sowie 250-375 ng cDNA aus Zellkulturen, 1 µg cDNA aus Knochenmark bzw. 2,5 µl präamplifizierter cDNA aus Megakaryozyten und  $H_2O$  beladen. Die qPCRs wurden dann entsprechend der Array-spezifischen Einstellungsdateien auf einem 7900HT Real-Time PCR System durchgeführt. Vor dem Export der automatisch berechneten  $C_T$ -Werte wurde jede Amplifikationskurve visuell überprüft.

## 2.8 DNA-Isolierung

Eine DNA-Isolierung wurde ausschließlich mit FFPE Knochenmark durchgeführt, wobei jeweils je nach Größe der Biopsie ein bis zwei 15 µm starke Mikrotomschnitte eingesetzt wurden. Das Paraffin wurde zunächst durch Zugabe

von 1200  $\mu\text{l}$  Xyloersatz und kräftiges Vortexen gelöst und nach einer Zentrifugation bei maximaler Umdrehungszahl (16.100 g) und Raumtemperatur für 10 min als Überstand verworfen. Das Pellet wurde daraufhin zweimal mit 1200  $\mu\text{l}$  Ethanol durch kräftiges Vortexen gewaschen und jeweils nach erneutem 10-minütigen Zentrifugieren bei 16.100 g vom Waschüberstand befreit. Zur Trocknung des Pellets erfolgte anschließend eine ca. 10-minütige Inkubation der offenen Reaktionsgefäße bei 37°C unter dem Abzug.

Alle folgenden Schritte basieren auf den Reagenzien und Säulen des DNeasy Kits. Der Gewebeverdau wurde dabei in 180  $\mu\text{l}$  „ATL Buffer“ und 20  $\mu\text{l}$  „Proteinase K“ bei 55°C und 1400  $\text{min}^{-1}$  in einem Thermoschüttler für ca. 3 h durchgeführt. Nach kräftigem Vortexen für 15 s wurden 200  $\mu\text{l}$  „AL Buffer“ zugegeben, gevortext und 10 min bei 70°C inkubiert. Als nächstes erfolgte eine Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  Ethanol und ein gründliches Homogenisieren der Probe durch Vortexen, woraufhin diese auf eine „Mini Spin Column“ pipettiert wurde. Durch Zentrifugieren bei 6000 g und Raumtemperatur für 1 min wurde die Probe durch die Säule geführt und der Durchfluss verworfen. Anschließend wurde die an der Säule gebundene DNA nacheinander mit je 500  $\mu\text{l}$  „AW1 Buffer“ und „AW2 Buffer“ durch Zentrifugieren bei Raumtemperatur für 1 min bei 6000 g bzw. für 3 min bei 16.100 g gewaschen. Die Säulen wurden dann zur Eluierung der DNA in neue Reaktionsgefäße gesetzt und zweimal mit je 50  $\mu\text{l}$  „AE Buffer“ benetzt, 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und 1 min bei 6000 g zentrifugiert. Nach Bestimmung der DNA-Konzentration mit dem Photometer (260 nm) wurde diese entweder sofort weiter verwendet oder bei -20°C gelagert.

## 2.9 Pyrosequenzierung

Zunächst wurde per PCR ein Bereich des JAK2-Gens amplifiziert, der die Mutationsstelle G1849T enthält. Dafür wurden in 25  $\mu\text{l}$ -Reaktionen 2,5  $\mu\text{l}$  10x PCR-Puffer, 2,5 mM Magnesiumchlorid, 0,2 mM dNTP, 0,4  $\mu\text{M}$  Primer TAT GAT GAG CAA GCT TTC TGA CAA G, 0,4  $\mu\text{M}$  Primer AGA AAG GCA TTA GAA AGC CTG TAG TT [80], 0,5 U Taq DNA-Polymerase und 25 ng DNA für 5 min bei

95°C, 50 PCR-Zyklen (30 s 95°C, 45 s 60°C, 30 s 72°C) sowie 5 min bei 72°C inkubiert.

Für die folgende Immobilisierung des PCR-Produkts an Agarose-Beads wurden jeweils 5 µl dieses PCR-Produkts mit 35 µl H<sub>2</sub>O, 38 µl Binding-Puffer und 2 µl Streptavidin Sepharose Beads in eine 96-Well-Platte pipettiert und mindestens 5 min auf einem Vortexer inkubiert. Währenddessen wurden in eine Pyro-Platte 11 µl Annealing-Puffer und 1 µl des Sequenzierprimers GGT TTT AAA TTA TGG AGT ATG T (10 µM in H<sub>2</sub>O) vorgelegt. Anschließend wurde das „Vacuum Prep Tool“ der Vakuumstation mit vollentsalztem Wasser gespült, um dann die homogenisierten Bead-Suspensionen aufzusaugen, wobei die Beads mit der gebundenen DNA an den entsprechenden Filtern hängen blieben. Es folgte das Spülen der Filter mit Ethanol (70%), einer Denaturierungslösung (0,2 M Natronlauge) zur Einzelstrang-Generierung und einem Waschpuffer. Durch anschließendes Eintauchen der Filter in die Pyro-Platte mit vorgelegtem Sequenzierprimer und Annealing-Puffer sowie das Abschalten des Vakuums wurden die Beads von den Filtern gelöst. Das Annealing des Primers wurde für 2 min bei 80°C durchgeführt.

Die Einstellungen am Pyrosequenzierer und das Befüllen der „Capillary Dispensing Tips“ mit den Pyro-Reagenzien (Nukleotide, Enzyme und Substrate) erfolgten laut Herstellerangaben. Vom Gerät ermittelte Mutationsdosen zwischen 0% und 4,9% wurden als Wildtyp, zwischen 5% und 49,9% als heterozygot mutiert, zwischen 50% und 100% als homozygot mutiert interpretiert.

## 2.10 COBRA

Für die Bisulfitkonversion und somit die Deaminierung von nicht-methyliertem Cytosin zu Uracil wurde das EZ DNA Methylation Kit verwendet. Dabei wurden zunächst 45 µl DNA in H<sub>2</sub>O (Zellkultur: 1 µg, Knochenmark: 2 µg) mit 5 µl „M-Dilution-Buffer“ versetzt, für 15 min bei 37°C inkubiert und schließlich zu 100 µl „CT Conversion Reagent“ gegeben und leicht gevortext. Zur vollständigen Konversion erfolgte anschließend eine Inkubation bei 50°C über Nacht.

Die Aufreinigung der konvertierten DNA über Silicasäulen und die Desulfonierung der Probe wurden daraufhin wie in den Herstellerangaben vorgeschrieben durchgeführt. Zum Schluss konnte die DNA in 40 µl „M-Elution Buffer“ eluiert und bei -20°C gelagert werden.

Die BNIP3-PCR wurde dann mit 2 µl der konvertierten DNA in 25 µl-Ansätzen bestehend aus 10x PCR-Puffer, 1,5 mM Magnesiumchlorid, 0,2 mM dNTP, 0,5 U Taq DNA-Polymerase sowie je 0,4 µM der Primer TTY GGT YGG AGG AAT TTA TAG GGT AG und CCC TCR CCC ACC RCA AAA C nach Murai et al. [81] unter folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt: 5 min 95°C, 3 Zyklen (30 s 95°C, 45 s 58°C, 45 s 72°C), 4 Zyklen (30 s 95°C, 45 s 56°C, 45 s 72°C), 5 Zyklen (30 s 95°C, 45 s 54°C, 45 s 72°C) und 26 Zyklen (30 s 95°C, 45 s 52°C, 45 s 72°C). Das PCR-Produkt wurde bei -20°C gelagert.

Die methylierungsspezifische Restriktion erfolgte schließlich in 15 µl-Ansätzen bestehend aus 7 µl H<sub>2</sub>O, 6 µl des PCR-Produktes, 1,5 µl Tango-Puffer und 0,5 µl RsaI für 2 h bei 37°C. Der Nachweis von eventuell erfolgten Restriktionen erfolgte über 6%-ige Polyacrylamidgele.

## 2.11 Datenverarbeitung und Statistik

Durch die qPCR (Einzelmessungen oder Low Density Arrays) ermittelte C<sub>T</sub>-Werte wurden in Excel exportiert und dort folgendermaßen in ΔC<sub>T</sub>- und 2<sup>-ΔΔCT</sup>-Werte umgerechnet [82]:

$$\Delta C_{T,i,j} = C_{T,i,j} - C_{T,rg,j}$$

$$2^{-\Delta\Delta CT,i,j} = 2^{-(\Delta C_{T,i,j} - \Delta C_{T,i,cb})}$$

mit i: Gen 1 bis Gen n, j: Probe 1 bis Probe n, rg: Referenzgen (endogene Kontrolle), cb: Kalibrator.

Dabei wurde für den Kalibrator-Wert je nach Versuchsansatz entweder ein Einzelwert oder der Mittelwert mehrerer ΔC<sub>T</sub>-Werte eingesetzt. Die so ermittelten Werte konnten dann mit Prism den entsprechenden statistischen Tests unterzogen und grafisch dargestellt werden.

## 2.12 Immunhistochemie

1 µm dünne Mikrotomschnitte der entsprechenden FFPE Knochenmarkbiopsien auf Objektträgern wurden zunächst durch eine Inkubation von 3 x 10 min in Xylol und eine Ethanolreihe von 100% bis 20% entparaffiniert. Um die spätere Bindung des Antikörpers an das entsprechende Antigen zu erleichtern, wurden die Schnitte anschließend für 3 min bei 125°C unter Dampf erhitzt ("Antigen-Retrieval"). Es folgte ein Blocken von endogenen Peroxidasen für 10 min in 3% Wasserstoffperoxid. Für die weiteren Schritte wurde ein Peroxidase-basiertes HRP-Polymer-Kit nach entsprechender Anleitung verwendet, wobei die Inkubation mit dem BNIP3-Antikörper über Nacht in einer Konzentration von 1:50 integriert wurde. Die spezifische Färbung erfolgte schließlich mit Diaminobenzidin und gegengefärbt wurde mit Hämalaun.

## 2.13 Zellkultur

Sämtliche Zelllinien (SET-2, CMK, SD-1, HeLa) wurden von der DSMZ bezogen und nach deren Angaben ([www.dsmz.de](http://www.dsmz.de)) kultiviert.

Für CMK, SD-1 und HeLa wurde dabei RPMI-Medium (Glutamin-frei) mit 10% (v/v) fötalem Rinderserum, 1% (v/v) L-Glutamin sowie 1% (v/v) Pen/Strep verwendet und für SET-2 nur der Serumgehalt auf 20% (v/v) erhöht. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 15 ml-Zellkulturflaschen (Deckel mit sterilem Filter zum Gasaustausch) oder 6-Well-Zellkulturplatten in einem Zellkulturschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

Das Splitten wurde bei den Suspensionskulturen durch einfaches Abnehmen eines Teils der Kultur und Überführung in frisches Medium durchgeführt. Adhärenz Kulturen wurden dagegen zunächst vom Medium befreit, mit 5 ml vorgewärmtem PBS gewaschen, mit 3 ml Trypsin versetzt und bis zur Zellablösung kurz bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung des Trypsins erfolgte eine Zugabe von mindestens 7 ml Medium. Die Zellsuspension konnte anschließend wie bei den Suspensionskulturen gesplittet werden.



## 2.14 Anoxie-Inkubation

Die Zellen wurden ca. 24 h zuvor gesplittet, damit sie sich während des Versuchs in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Die eigentliche Inkubation erfolgte in einer gasdicht verschlossenen Anoxie-Inkubationsbox (Abbildung 2-1), die für die entsprechende Versuchszeit in den Zellkulturschrank gestellt wurde. Eine anschließende RNA- oder Protein-Isolierung wurde (schnellstmöglich) unter normalen Sauerstoffbedingungen durchgeführt.



Abbildung 2-1: Sauerstoff-reduzierte Zellkultur durch Anoxie-Inkubationsbox, die in den normalen Zellkulturschrank gestellt wird.

## 2.15 Cobaltchlorid-Inkubation

Die Zellen einer 15 ml-Kultur wurden in ihrer exponentiellen Wachstumsphase mit 15  $\mu$ l einer sterilfiltrierten 1 M Cobaltchlorid-Lösung (Kontrolle: 15  $\mu$ l  $H_2O$ ) versetzt. Die weitere Inkubation und anschließende RNA-Isolation erfolgte unter normalen Bedingungen.

## 2.16 siRNA-Transfektion

Vor den Transfektionsversuchen wurde die lyophilisiert gelieferte siRNA (5 nmol) in 250  $\mu$ l siRNA-Suspensionspuffer gelöst und 1 min bei 90°C sowie 1 h bei 37°C inkubiert, um eventuelle Aggregate aufzulösen. Die Lagerung erfolgte bei -20°C. Als Negativkontroll-siRNA diente in sämtlichen Versuchen eine vom Hersteller als unwirksam gegenüber jeder humanen mRNA validierte Sequenz.

### 2.16.1 siRNA-Transfektion durch Liposomen

Zunächst wurden 12  $\mu$ l der siRNA-Lösung (20  $\mu$ M) mit 376  $\mu$ l Antibiotika- und Serum-freiem Medium sowie 12  $\mu$ l Transfektionsreagenz versetzt, gevortext und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Lösung wurde dann je Well in eine vorbereitete 6-Well-Zellkulturplatte mit 6 x 400  $\mu$ l Zellen in normalem Medium (logarithmische Phase, ca. 24 h vorher gesplittet) tropfenweise pipettiert. Nach einer Durchmischung der Lösung durch gründliche Drehbewegungen der Zellkulturplatte wurde diese für 6 h unter normalen Bedingungen kultiviert. Anschließend wurden je Well 1,6 ml normales Medium dazugeben, um eine letztendliche siRNA-Konzentration von 100 nM zu erzielen. Eine weitere Analyse der Zellen erfolgte dann nach mindestens 24 h Inkubation unter normoxischen oder anoxischen Bedingungen.

### 2.16.2 siRNA-Transfektion durch Elektroporation

Die Zellen einer 15 ml-Kultur in der logarithmischen Phase (ca. 24 h vorher gesplittet) wurden bei Raumtemperatur zentrifugiert (10 min, 1700 g) und durch Dekantieren vom Medium befreit. Durch ein Resuspendieren des Pellets in ca. 5 ml PBS und erneutem Zentrifugieren unter gleichen Bedingungen wurden die Zellen von restlichen Mediumsrückständen befreit und daraufhin in 800  $\mu$ l Antibiotika- und Serum-freiem Medium resuspendiert. 800  $\mu$ l der Zellsuspension wurden dann in eine Elektroporationsküvette pipettiert und mit 20  $\mu$ l der entsprechenden siRNA-Lösung (20  $\mu$ M) versetzt, wobei auf eine gute Durchmischung beider Komponenten durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren geachtet wurde. Die Elektroporation erfolgte dann mit dem Gene Pulser II bei eingestellten Parametern von 500 V und 50  $\mu$ F zu je zwei Pulsen im Abstand von ca. 10 s. Nach einer anschließenden Inkubation von

30 min bei Raumtemperatur wurden die Zellen in 15 ml frisches Medium ausgesät und weiter unter normoxischen oder anoxischen Bedingungen inkubiert.

## 2.17 Apoptose-ELISA

Zur Bestimmung der Apoptoseraten anhand immunchemischer Detektion von cytoplasmatischen Mono- und Oligonucleosomen mit dem Apoptose-ELISA wurden jeweils 10.000 Zellen direkt aus der Kultur abgenommen und für 10 min bei Raumtemperatur und 200 g zentrifugiert. Der Mediumüberstand wurde dann vorsichtig abdekantiert oder abpipettiert und das Pellet in 200 µl „Lysis Buffer“ durch leichtes Vortexen resuspendiert. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 200 g für 10 min. Vom Überstand wurden dann 20 µl in ein Well der „Streptavidin Coated Microplate“ pipettiert und mit 80 µl des direkt zuvor angesetzten Immunreagenz (5% (v/v) „Anti-DNA-POD“, 5% (v/v) „Anti-Histone-Biotin“, 90% (v/v) „Incubation Buffer“) versetzt. Zur Assemblierung beider Antikörper und der Oligonucleosomen als Sandwich-Komplex an die Streptavidin-Beschichtung erfolgte nach Verschließen der Wells mit „Cover Foil“ eine Inkubation für 2 h in einem Schüttler (ca. 300 rpm) bei Raumtemperatur.

Die Inkubationslösung wurde anschließend wieder abpipettiert und die Wells wurden dreimal mit je 250 µl „Incubation Buffer“ gewaschen. Die enzymatische Farbreaktion konnte dann durch Zugabe von 100 µl „ABTS Solution“ gestartet werden. Nach einer sichtbaren Farbentwicklung innerhalb von 10-20 min wurde die Reaktion durch 100 µl „ABTS Stop Solution“ gestoppt. Die Absorptionmessung bei 405 nm (Referenz: 490 nm) erfolgte anschließend in einem Microplate-Reader.

## 2.18 Western Blot

Das Zellpellet einer Suspensionskultur oder der Zellrasen einer vom Medium befreiten adhären Kultur wurden in 1 ml 1%-iger SDS-Lösung sowie je 10 µl Proteinase-Inhibitor und EDTA suspendiert, wobei im Fall der adhären Zellen ein Cellscrapper das Ablösen erleichterte. Die Lysate wurden sofort auf Eis gekühlt und mit Hilfe eines Sonifiers homogenisiert (2 x ca. 2 s, Amplitude: 60%). Die Bestimmung der Proteinkonzentration (mg/ml) erfolgte im Photometer bei 260 nm und 280 nm nach der Formel  $(1,55 \times A_{280}) - (0,76 \times A_{260})$  [83].

Für die Gelelektrophorese wurden je Probe 20-30 µg Protein in 10 µl 1%-iger SDS-Lösung mit je 10 µl Lämmli-Puffer (+ 5% (v/v) 2-Mercaptoethanol) versetzt. Zur endgültigen Denaturierung folgte eine Inkubation von 5 min bei 95°C. Die so vorbereiteten Proben sowie 10 µl eines Proteinmarkers wurden in die Geltaschen eines Ready Gel-Gradientengels pipettiert, das zuvor in eine mit Laufpuffer (3,025 g Tris, 14,42 g Glycin, 1 g SDS in 1 l vollentsalztem H<sub>2</sub>O) gefüllte Mini-Gelkammer eingebaut worden war. Die Auftrennung der Proteine erfolgte dann für ca. 40 min bei konstanten 200 V.

Zur Equilibrierung des Gels wurde dieses zunächst 15 min in den Blotting-Puffer (1 l: 3,03 g Tris, 14,4 g Glycin, 200 ml Methanol, H<sub>2</sub>O) gelegt und anschließend mit 1,4 mm starkem Gel-Blotting-Papier und einer Nitrocellulose-Membran zum Blotting-Sandwich zusammengebaut, wobei das Mini Trans-Blot-System zum Einsatz kam. Der Membrantransfer der Proteine erfolgte dann für 1 h bei 350 mA und das anschließende Blocken der noch nicht an Protein gebundenen Bindungsstellen über Nacht bei 4°C in Blotting-Puffer mit 5% (w/v) Milchpulver.

Für die immunochemische Detektion der Proteinbanden wurde die Membran in jeweils 10 ml Waschpuffer (PBS +10% [v/v] Tween20) und den vom Hersteller angegebenen Antikörperkonzentrationen für jeweils 1 h inkubiert und zwischen sowie nach den Inkubationen durch viermaliges Waschen (je 5 min) in Waschpuffer von nicht gebundenen Antikörpern befreit. Die Detektion erfolgte per ECL und CCD-Kamera.

## 2.19 FACS

Vor der FACS-Analyse erfolgte eine Fixierung der Zellen in 70% Ethanol, indem ca.  $1 \times 10^6$  Zellen in 300  $\mu$ l PBS zu 700  $\mu$ l Ethanol (100%,  $-20^\circ\text{C}$ ) gegeben und nach gründlichem Schütteln für mindestens 1 h bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert wurden. Für die Analyse wurden die Zellen 5 min bei 1700 g zentrifugiert, in PBS gewaschen und in 1 ml PBS mit 5 mM EDTA resuspendiert.

Die Messung von Zellgröße und -granularität per "Forward Scatter Plot" und "Sideward Scatter Plot" erfolgte dann mit dem FACSCalibur laut Herstellerangaben.

## 3 MATERIAL

### 10x PCR-Puffer

10x PCR Rxn Buffer (-MgCl<sub>2</sub>), Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

### 7500 Real-Time PCR System

7500 Fast Real-Time PCR System mit Software SDS 1.3, Applied Biosystems, Foster City, USA

### 7900HT Real-Time PCR System

7900HT Fast Real-Time PCR System mit Software SDS 2.3, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

### adhäsive Reaktionsgefäße

Adhesive Caps 500 opaque, P.A.L.M. Microlaser Technologies, Bernried, Deutschland

### Annealing-Puffer

PyroMark Annealing Buffer, Qiagen, Hilden, Deutschland

### Anoxie-Inkubationsbox

Anaeropack for cell culture, Mitsubishi Gas Chemicals, Tokio, Japan

### Antikörper

HIF1A: sc-10790, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; Actin: sc-10731, Santa Cruz Biotechnology; BNIP3: ab38621, abcam, Cambridge, Großbritannien

### Apoptose-ELISA

Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup>, Roche, Basel, Schweiz

### Binding-Puffer

PyroMark Binding Buffer, Qiagen, Hilden, Deutschland

Bioanalyzer

Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologie, Santa Clara, CA, USA

DEPC-H<sub>2</sub>O

0,2% (v/v) Diethyl-Pyrocarbonat, Fluka, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA,  
in vollentsalztem Wasser (2x autoklaviert)

DNA-Größenmarker

pBR322 DNA/BsuRI (HaeIII) Marker, 5, Fermentas, St. Leon-Rot,  
Deutschland

DNeasy Kit

DNeasy Tissue Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland

dNTP

100 mM dNTP Set, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

ECL

Pierce ECL Western Blotting Substrate, Thermo Fisher Scientific, Waltham,  
MA, USA

Elektroporationsküvette

Gene Pulser Cuvette, 0.4 cm electrode gap, Bio-Rad Laboratories, Hercules,  
CA, USA

EZ DNA Methylation Kit

EZ DNA Methylation Kit, Zymo Research, Orange, CA, USA

FACSCalibur

BD FACSCalibur Flow Cytometer, Franklin Lakes, NJ, USA

fötales Rinderserum

FBS, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Gene Expression Assay

20x TaqMan Gene Expression Assay (Primer: je 18 µM, FAM-Farbstoff-  
assoziierte MGB-Sonde: 5 µM), Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

Gene Expression Master Mix

2x TaqMan Gene Expression Master Mix, Applied Biosystems, Foster City,  
CA, USA

Gene Pulser II

Gene Pulser II Electroporation System, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA,  
USA

Glykogen

Glycogen for mol. biol. (20 mg/ml), Roche, Basel, Schweiz

H<sub>2</sub>O

Water, Baker HPLC analyzed, Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, NJ, USA

High Capacity Reverse Transcription Kit

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

HRP-Polymer-Kit

ZytoChem Plus HRP Polymer Kit, Zytomed, Berlin, Deutschland

Kit #1

Express Art FFPE mRNA-amplification Kit, AmpTec, Hamburg, Deutschland

Kit #2

Full Spectrum Complete Transcriptome RNA Amplification Kit, System Biosciences, Mountain View, CA, USA

Kit #3

TaqMan PreAmp Master Mix Kit, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

L-Glutamin

L-Glutamine 200 mM (100x), PAA Laboratories, Pasching, Österreich

Laser-Mikrodissektion

PALM Laser-MicroBeam System, P.A.L.M. Microlaser Technologies, Bernried, Deutschland

Low Density Array

TaqMan Array Micro Fluidic Cards (Custom Array), TaqMan Human Apoptosis Array, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

Methylenblau

Löffler's methylene blue solution, Merck, Darmstadt, Deutschland

Magnesiumchlorid

50 mM MgCl<sub>2</sub>, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Microplate Reader

Model 550 Microplate Reader, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA



Mini-Gelkammer

Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

Mini Trans-Blot-System

Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

Nitrocellulose-Membran

PROTRAN Nitrocellulose Transfer Membrane, pore size 0.2 µm, Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland

PBS

Phosphate Buffered Saline 1x, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

PEN-Membran-Objektträger

MembraneSlide 1.0 PEN, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Bernried, Deutschland

Pen/Strep

Penicillin/Streptomycin (100x) PAA Laboratories, Pasching, Österreich

Poly-L-Lysin

Poly-L-lysine solution, 0.1% (w/v) in H<sub>2</sub>O (preservative added), Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

Prism

Prism 5.0, GraphPad Software, San Diego, USA

Proteinase K

Proteinase K 30 mAnson-U/mg, Merck, Darmstadt, Deutschland

Proteinase-Inhibitor und EDTA

Halt Protease Inhibitor Cocktail, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Pyro-Platte

PyroMark Q96 HS Plate, Qiagen, Hilden, Deutschland

Pyro-Reagenzien

PyroMark Gold Q96 CDT Reagents, Qiagen, Hilden, Deutschland

Pyrosequenzierer

PyroMark Q96 MD, Qiagen, Hilden, Deutschland

Random-Hexamere

p(dN)<sub>6</sub> Random Hexamer (500 ng/μl), Amersham, GE Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien

Ready Gel-Gradientengel

Ready Gel Tris-HCl Gel, 4–20% resolving gel, 4% stacking gel, 12-well, 20 μl, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

RNA-Gelchips

Eukaryote Total RNA Nano Assay, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA

RNeasy Kit

RNeasy Mini Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland

RPMI-Medium

RPMI 1640 1x [-] L-Glutamine, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

RsaI

Rsa I #ER1121 10 units/μl, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

saures, wassergesättigtes Phenol

Roti-Aqua-Phenol, Roth, Karlsruhe, Deutschland

siRNA

HP GenomeWide siRNA (Hs\_HIF1A\_5 #SI02664053; Hs\_BNIP3\_10 #SI02662429) und AllStars Negative Control siRNA #1027280, Qiagen, Hilden, Deutschland

siRNA-Suspensionspuffer

siRNA Suspension Buffer, Qiagen, Hilden, Deutschland

Sonifier

Digital Sonifier Model 450-D, Branson, Danbury, CT, USA

Streptavidin Sepharose Beads

Streptavidin Sepharose High Performance, GE Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien

Tango-Puffer

10x Buffer Tango with BSA, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

Taq DNA-Polymerase

Platinum Taq DNA Polymerase, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Transfektionsreagenz

HiPerFect Transfection Reagent, Qiagen, Hilden, Deutschland

Trizol

TRIzol Reagent, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Trypsin

Trypsin-EDTA (1x), PAA Laboratories, Pasching, Österreich

Tween20

Tween20 für die Molekularbiologie, AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Vakuumstation

PyroMark Q96 Vacuum Prep Workstation, Qiagen, Hilden, Deutschland

Waschpuffer

PyroMark Wash Buffer 10x, Qiagen, Hilden, Deutschland

Xylolersatz

XEM-200, Vogel, Gießen, Deutschland

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Amplifikation von RNA und cDNA aus mikrodissezierten Megakaryozyten

#### 4.1.1 RNA-Amplifikation mit Kit #1

Die Amplifikation des Probenmaterials auf RNA-Ebene führte zu einer mittels UV-Spektrophotometer messbaren Zunahme an RNA, zeigte aber nach anschließender cDNA-Synthese keine verwertbaren Signale in der quantitativen PCR (Tabelle 4-1). So war die cDNA von mikrodissezierten Megakaryozyten auch nach der RNA-Amplifikation noch immer nicht detektierbar und die  $C_T$ -Werte der im Kit enthaltenen Positivkontrolle zeigten keine übereinstimmenden Änderungen zwischen nicht amplifizierter und amplifizierter RNA.

Die Ergebnisse der Analyse mit dem Agilent Bioanalyzer zeigten für die amplifizierte Kontroll-RNA (Abbildung 4-1 C) eine relativ gleichmäßige Fragmentverteilung bis ca. 2000 nt mit einem Maximum bei ca. 500 nt. Hingegen ließ das Elektropherogramm der amplifizierten Megakaryozyten-RNA (Abbildung 4-1 B) erkennen, dass die Fragmente hier deutlich kürzer waren. Ähnlich wie in der nicht amplifizierten RNA aus Knochenmark (Abbildung 4-1 A) war hier eine maximale Länge von ca. 200 nt auszumachen, allerdings war der Anteil an längeren Fragmenten deutlich reduziert. Die Proben der amplifizierten Kontroll-RNA und der RNA aus Gesamtknochenmark waren zuvor auf den Bereich von 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  verdünnt worden, was in etwa den vom Bioanalyzer errechneten Werten entsprach. Auch die ermittelte Konzentration von 110  $\text{ng}/\mu\text{l}$  im Fall der amplifizierten Megakaryozyten-RNA entsprach dem per UV-Spektrophotometer gemessenen Wert (vgl. Tabelle 4-1, MK

#3), da die komplette RNA für die Analyse in 2 µl gelöst worden war. Darüber hinaus wurde auch die nicht amplifizierte RNA aus mikrodisszierten Megakaryozyten mit dem Bioanalyzer untersucht, wobei die Geräte-Software eine Konzentration von 5 ng/µl, also 10 ng RNA aus 200-300 Megakaryozyten, errechnete (Daten nicht gezeigt).

		<b>MK #1</b>	<b>MK #2</b>	<b>MK #3</b>	<b>Kontrolle</b>
RNA	vorher	n.d.	n.d.	n.d.	29,67 ng
	nach 1. IVT	35,5 ng	61,0 ng	n.d.	500 ng
	nach 2. IVT	7,18 µg	2,35 µg	253,9 ng	23,96 µg
Primer GUSB	vorher	n.d.	n.d.	-	22,73
	nach 1. IVT	n.d.	n.d.	-	16,82
	nach 2. IVT	n.d.	n.d.	-	-
Primer POLR2A	vorher	n.d.	n.d.	-	23,15
	nach 1. IVT	n.d.	n.d.	-	27,46
	nach 2. IVT	n.d.	n.d.	-	-
Primer DICER1	vorher	-	-	-	24,83
	nach 1. IVT	-	-	-	21,42
	nach 2. IVT	-	-	-	-

Tabelle 4-1: RNA-Mengen und C<sub>T</sub>-Werte vor und nach Amplifikation mit Kit #1 (n.d.: nicht detektierbar; MK: Megakaryozyten).

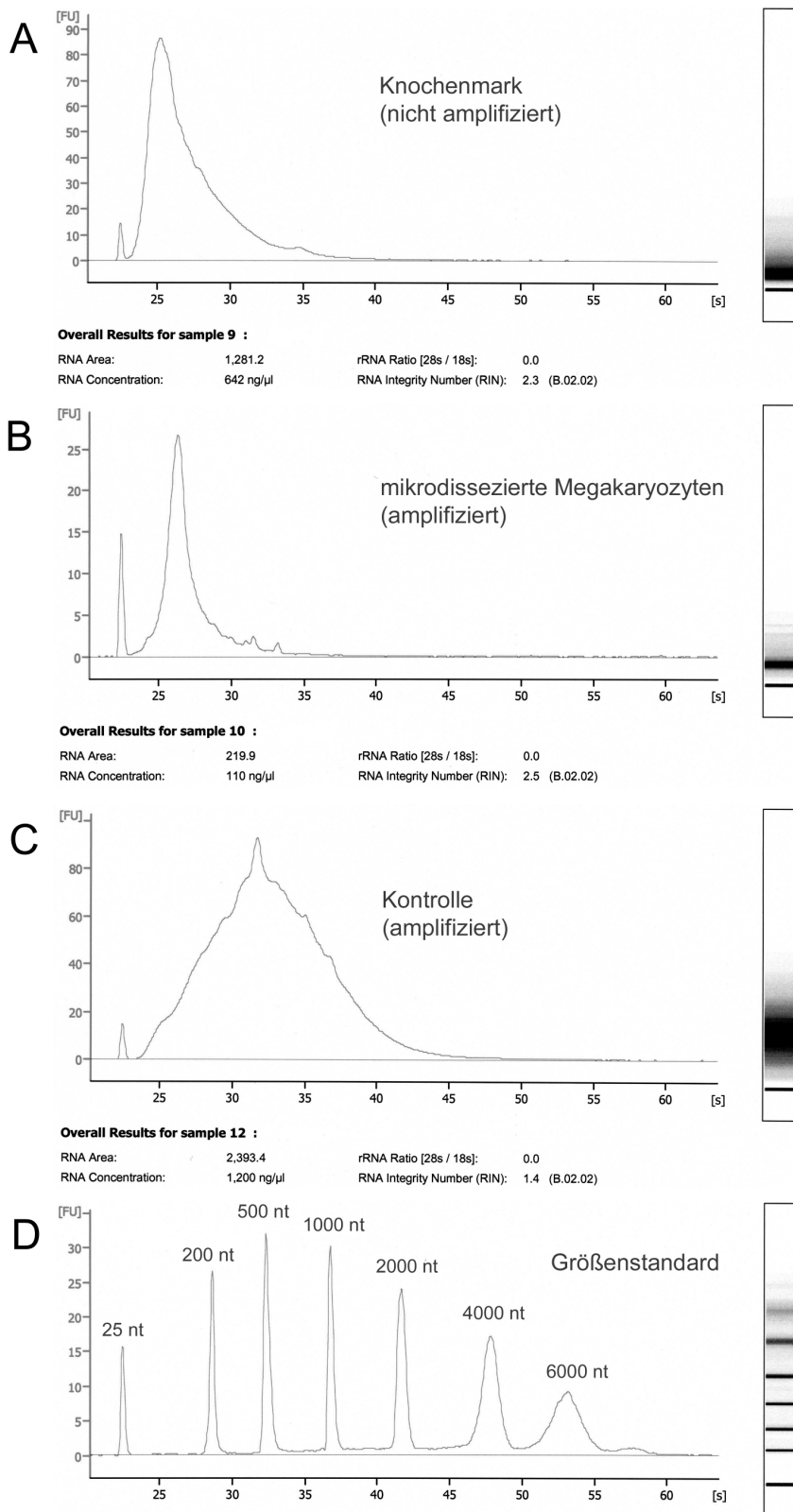


Abbildung 4-1: Elektropherogramme des Bioanalyzers. Angegeben sind außerdem die ermittelte RNA-Konzentration und die „RNA Integrity Number“, eine Maßzahl für die Qualität der RNA zwischen 1 (stark degradiert) und 10 (vollständig intakt).

#### 4.1.2 Randomisierte cDNA-Amplifikation mittels RP-PCR

Die einfache Amplifikation von cDNA aus mikrodisszierten Megakaryozyten mittels „Random“-Hexamer-Primer nach Peng et al. [79] zeigte zwar in einigen Fällen von Gesamtknochenmark eine geringe Reduzierung der  $C_T$ -Werte, blieb aber in sämtlichen getesteten cDNA-Proben von mikrodisszierten Megakaryozyten erfolglos (Tabelle 4-2).

		10 Zyklen				15 Zyklen			
		KM #1	KM #2	KM #3	KM #4	KM #5	MK #1	MK #2	MK #3
Primer GUSB	vorher	31,11	31,40	30,26	32,13	30,35	n.d.	n.d.	n.d.
	nachher	31,21	29,75	30,70	30,34	29,47	n.d.	n.d.	n.d.
Primer MYC	vorher	33,29	33,58	32,08	33,39	29,99	n.d.	n.d.	n.d.
	nachher	32,37	30,82	32,36	31,84	28,90	n.d.	n.d.	n.d.

Tabelle 4-2:  $C_T$ -Werte vor und nach Amplifikation mittels RP-PCR (n.d.: nicht detektierbar; KM: Knochenmark; MK: Megakaryozyten).

#### 4.1.3 Randomisierte cDNA-Amplifikation mit Kit #2

Die ebenfalls auf randomisierten Primern beruhende cDNA-Amplifikation mittels Kit #2 zeigte im Fall von Gesamtknochenmark, Zellkultur oder Kontroll-RNA des Herstellers eine relativ deutliche Verringerung der  $C_T$ -Werte von durchschnittlich 7,73 (Minimum: 4,92, Maximum: 9,45) nach 30 Zyklen Amplifikation (Tabelle 4-3). Allerdings konnte an der stark variierenden Differenz der  $C_T$ -Werte nach 14 Zyklen ein uneinheitlicher zeitlicher Ablauf der Amplifikation erkannt werden. Im Fall der mikrodisszierten Megakaryozyten konnte nach 30 Zyklen Amplifikation mit drei verschiedenen Primern keine cDNA detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

		KM #1	Δ	KM #2	Δ	HeLa	Δ	Kontroll -RNA	Δ
Primer GUSB	vorher	38,08		36,78		27,03		27,30	
	nach 14 Zykl.	36,34	1,74	33,29	3,49	20,78	6,25	-	
	nach 30 Zykl.	30,62	7,46	27,90	8,88	19,28	7,75	19,55	7,75
Primer POLR2A	vorher	37,50		37,88		30,38		30,69	
	nach 14 Zykl.	30,36	7,14	29,69	8,19	26,24	4,14	-	
	nach 30 Zykl.	30,03	7,47	29,15	8,73	23,28	7,1	23,34	7,35
Primer DICER1	vorher	38,44		38,67		31,25		33,07	
	nach 14 Zykl.	29,31	9,13	28,77	9,90	28,68	2,57	-	
	nach 30 Zykl.	30,00	8,44	29,22	9,45	26,33	4,92	25,67	7,40

Tabelle 4-3: C<sub>T</sub>-Werte und entsprechende Differenzen nach Amplifikation mit Kit #2 (KM: Knochenmark).

#### 4.1.4 Spezifische cDNA-Amplifikation mit Kit #3

Die spezifische cDNA-Amplifikation mit den gleichen Primern wie in der qPCR erzielte eine relativ konstante Reduzierung der C<sub>T</sub>-Werte um ca. 14, also genau der theoretisch zu erwartende Wert nach 14 Zyklen Amplifikation (Tabelle 4-4). Im Gegensatz zu den anderen Amplifikationsmethoden konnte hier auch aus mikrodisszierten Megakaryozyten detektierbare cDNA generiert werden. Darüberhinaus wurden auch mikrodisszierte Bereiche aus FFPE Mammakarzinom-, Kolonkarzinom- und Bronchialgewebe (Letzteres nicht gezeigt) getestet. Auch hier ergab sich entweder eine Abnahme des C<sub>T</sub>-Wertes um ca. 14 oder eine erstmalige Detektion von cDNA. Abbildung 4-2 B fasst diese Ergebnisse noch einmal zusammen.



		KM	Δ	MK	Δ	MaK	Δ	KK	Δ
Primer GUSB	vorher	30,36		n.d.		n.d.		39,51	
	nach 14 Zykl.	16,71	13,92	37,73		26,18		25,86	13,65
Primer POLR2A	vorher	27,54		n.d.		38,16		37,09	
	nach 14 Zykl.	14,01	13,53	24,90		24,94	13,22	24,06	13,03
Primer BAX	vorher	30,19		n.d.		n.d.		35,23	
	nach 14 Zykl.	16,02	14,17	25,21		23,30		20,80	14,43
Primer PRKCB1	vorher	29,73		n.d.		n.d.		n.d.	
	nach 14 Zykl.	15,76	13,97	25,14		32,39		28,03	
Primer FLI1	vorher	30,97		n.d.		n.d.		n.d.	
	nach 14 Zykl.	17,09	13,88	25,79		n.d.		29,23	
Primer BID	vorher	34,11		n.d.		n.d.		38,38	
	nach 14 Zykl.	19,24	14,87	27,26		26,26		24,47	13,91
Primer TGFB1	vorher	27,04		34,90		n.d.		37,55	
	nach 14 Zykl.	13,06	13,98	21,03	13,87	23,37		23,56	13,99
Primer CLU	vorher	31,16		36,79		34,90		n.d.	
	nach 14 Zykl.	16,15	15,01	23,04	13,75	19,98	14,92	25,40	

**Tabelle 4-4: C<sub>T</sub>-Werte und entsprechende Differenzen nach Amplifikation mit Kit #3 (n.d.: nicht detektierbar; KM: Knochenmark; MK: Megakaryozyten; MaK: Mammakarzinom; KK: Kolonkarzinom).**

Zur Bestimmung der PCR-Effizienzen wurden mit der nicht amplifizierten und der amplifizierten cDNA aus mikrodisszierten Megakaryozyten sowie aus gesamtem Knochenmark quantitative PCRs in verschiedenen Verdünnungsstufen durchgeführt (Abbildung 4-2 A). Hieraus ließ sich bei beiden getesteten Primerpaaren eine durch die cDNA-Amplifikation hervorgerufene Abnahme der PCR-Effizienz um jeweils 6% erkennen.

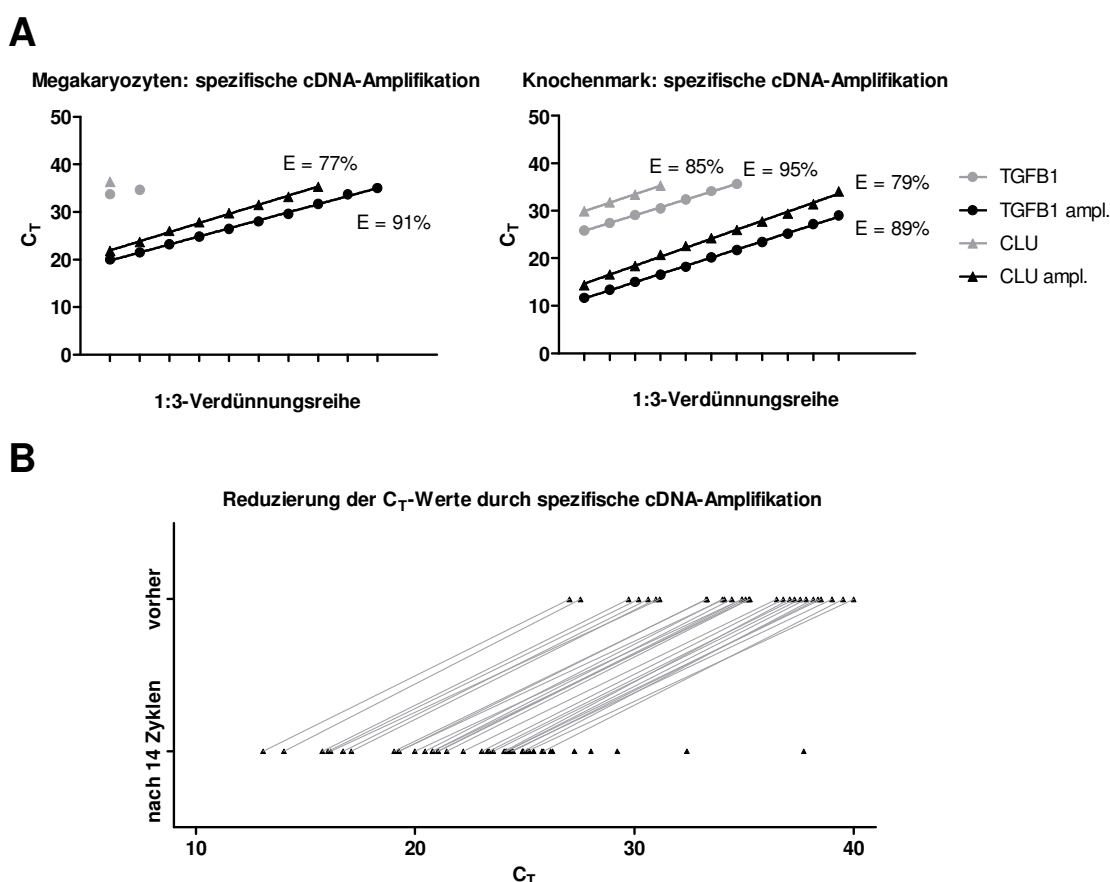


Abbildung 4-2: Reduzierung der  $C_T$ -Werte und somit Erhöhung der cDNA-Menge durch Kit #3 (TaqMan PreAmp Master Mix Kit). (A): Anhand der Verdünnungsreihen berechnete PCR-Effizienzen  $E = 3^{(1/s)-1}$  mit  $s$  als Steigung der linearen Regression (ampl.: amplifizierte cDNA). (B): Gesamtheit aller Vergleichsmessungen vor und nach Präamplifikation.

## 4.2 Expressionsanalyse Apoptose-assoziiierter Gene in der PMF

### 4.2.1 mRNA-Expression in Megakaryozyten und Knochenmark

Die Expressionsdaten des LDA können als Gruppenmediane der  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Werte (Referenzgen: POLR2A) sowohl für die Megakaryozyten als auch für das gesamte Knochenmark aus Tabelle 4-5 ersehen werden. Dabei sind die Gene

absteigend nach der mittleren Expressionsstärke der Kontrollgruppe des Knochenmarks geordnet, BCL2L1 erwies sich also als das am stärksten exprimierte Gen, während CASP14 und TERT überhaupt keine mRNA-Expression aufwiesen. Die weitere Analyse ergab bei insgesamt 11 Genen eine signifikant aberrante Expression in mindestens einer der Gruppen, die sowohl nach Fibrosegrad als auch nach JAK2-Mutationsstatus gebildet wurden. Letztere Gruppierung erbrachte allerdings keine Hinweise auf Unterschiede zwischen JAK2(V617F) und JAK2(wt), weshalb im Folgenden die Einteilung nach dem Fibrosegrad zu Grunde gelegt wird.

Gen (ID-Nr. des Herstellers)	Megakaryozyten					gesamtes Knochenmark				
	Kontr. n = 10	PMF mf 0/1 n = 12	PMF mf 2/3 n = 10	PMF JAK2 (wt) n = 11	PMF JAK2 (V617F) n = 11	Kontr. n = 10	PMF mf 0/1 n = 12	PMF mf 2/3 n = 10	PMF JAK2 (wt) n = 11	PMF JAK2 (V617F) n = 11
BCL2L1-Hs00236329_m1	1,20	0,75	1,05	0,82	1,03	1,07	0,96	0,59	0,67	0,81
TGFB1-Hs00171257_m1	1,34	<b>0,36</b> *	0,69	0,55	0,60	0,98	1,28	1,25	1,41	1,15
PECAM1-Hs00169777_m1	1,00	<b>0,47</b> (*)	<b>1,08</b> (*)	0,83	0,98	1,21	1,26	1,38	1,35	1,32
AATF-Hs00201719_m1	1,83	0,83	0,73	0,70	0,86	1,17	1,08	0,92	1,00	0,99
APAF1-Hs00559441_m1	1,05	0,63	1,21	0,75	1,18	1,00	1,59	1,47	1,48	1,69
STAT1-Hs00234829_m1	1,12	0,29	0,76	0,48	0,75	0,96	1,57	1,23	1,26	1,43
TUBB1-Hs00258236_m1	0,94	0,57	0,66	0,66	0,74	1,11	<b>2,69</b> ***	<b>2,74</b> ***	<b>2,78</b> ***	<b>2,59</b> ***
ETS1-Hs00901425_m1	0,86	0,49	0,84	0,87	0,41	1,37	1,00	0,94	0,91	1,02
TLR4-Hs00152937_m1	1,00	0,68	n.d.	1,02	0,33	1,04	1,08	0,66	0,65	1,01
GUSB-Hs99999908_m1	0,96	0,25	0,21	0,28	<b>0,22</b> *	1,12	1,44	1,19	1,19	1,33
CLU-Hs00156548_m1	1,09	<b>0,34</b> *	0,47	0,45	0,43	1,12	<b>2,66</b> *	<b>2,72</b> *	<b>2,70</b> *	2,50
BAX-Hs00180269_m1	1,22	0,82	1,26	1,21	0,85	1,06	0,88	1,12	0,91	1,09
FLI1-Hs00231107_m1	1,10	1,15	1,12	1,20	1,04	1,12	<b>2,36</b> **	1,79	<b>2,04</b> **	<b>2,12</b> *
E2F2-Hs00231667_m1	1,00	1,52	0,64	1,52	1,19	1,01	1,47	1,12	1,21	1,58
PRKCB1-Hs00176998_m1	0,98	1,46	1,61	1,54	1,66	0,95	<b>1,98</b> **	<b>1,80</b> *	<b>1,96</b> **	<b>1,96</b> *
SIVA-Hs00276002_m1	0,91	0,44	0,54	0,49	0,56	1,03	0,80	0,78	0,80	0,79
DEDD-Hs00172768_m1	0,71	0,87	0,74	0,82	0,81	1,02	1,24	1,15	1,35	1,13
CASP9-Hs00154260_m1 []	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,13	1,78	1,29	1,33	1,38
DAPK1-Hs00234480_m1	0,85	0,69	0,39	0,44	0,61	1,20	1,71	1,24	1,34	1,64
FAS-Hs00163653_m1	1,02	0,73	0,58	0,51	0,95	1,10	1,65	1,13	1,31	1,20
BCL2L1-Hs00197982_m1	0,58	0,71	0,59	0,62	0,69	1,05	0,77	0,67	0,76	0,73
TNFSF10-Hs00234356_m1	0,82	0,45	0,30	0,42	0,51	1,42	0,98	1,08	0,83	1,19
BNIP3-Hs00969293_mH	1,03	<b>0,24</b> *	<b>0,21</b> *	<b>0,25</b> *	<b>0,22</b> **	1,02	0,48	<b>0,47</b> *	0,62	<b>0,39</b> *
DIABLO-Hs00219876_m1	0,77	0,83	0,83	0,83	0,67	1,16	1,16	1,24	1,18	1,20

DNASE2-Hs00172391_m1	1,22	1,02	1,12	1,19	0,76	0,93	1,19	0,95	0,99	1,24
PLK1-Hs00153444_m1	1,18	1,38	0,76	1,00	0,67	1,05	<b>1,36</b> (**)	<b>0,67</b> (**)	0,78	1,17
E2F1-Hs00153451_m1	1,77	0,10	0,30	0,11	0,22	1,05	1,83	0,93	1,57	1,63
BAD-Hs00188930_m1	0,89	0,98	0,87	0,88	1,27	0,93	1,47	1,17	1,20	1,19
TP53-Hs00153349_m1	1,32	1,32	1,00	1,58	1,00	0,80	1,09	0,71	0,87	0,87
NFKB1-Hs00765730_m1	1,07	0,59	0,46	0,43	0,57	1,06	0,73	0,74	0,72	0,73
GAPDH-Hs99999905_m1	0,67	0,19	0,22	0,16	0,34	1,20	1,70	2,26	1,17	2,40
MPL-Hs00180489_m1	1,23	0,99	1,25	1,24	0,93	1,06	<b>3,03</b> **	<b>4,16</b> **	<b>4,76</b> **	<b>2,70</b> *
GATA1-Hs00231112_m1	1,01	0,58	0,40	0,49	0,77	1,09	1,21	0,89	0,81	1,07
BCL3-Hs00180403_m1	1,00	0,07	0,25	0,17	0,12	0,94	1,97	1,24	1,10	<b>2,09</b> *
CASP3-Hs00234385_m1	1,44	0,40	0,73	0,78	0,58	1,11	1,96	2,08	2,18	1,53
BID-Hs00609630_m1	1,32	0,73	0,85	0,87	0,81	1,11	1,24	1,55	1,40	1,43
SMAD3-Hs00232222_m1	1,00	0,88	1,34	0,88	n.d.	1,53	1,05	1,19	1,33	0,99
BCL2-Hs00608023_m1 †	1,00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,84	0,80	0,46	0,54	0,62
BIRC5-Hs00153353_m1 []	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,79	1,93	1,86	2,10	1,78
SCIN-Hs00263961_m1 ‡	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,00	3,71	3,87	3,71	3,87
TRADD-Hs00182558_m1	1,25	0,60	0,26	0,32	0,57	1,17	0,95	0,80	0,88	0,76
TNF-Hs00174128_m1	1,02	0,43	1,06	0,39	1,05	0,75	0,65	0,93	1,09	0,44
LIF-Hs00171455_m1 ¶	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,04	0,37	0,73	0,80	0,37
TP73-Hs00232088_m1 §	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,09	2,14	0,92	1,43	1,33
CASP14-Hs00201637_m1 #	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TERT-Hs00162669_m1 #	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Tabelle 4-5: Ergebnisse der LDA-Analyse. (Mediane der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte; \* / \*\* / \*\*\* signifikanter Unterschied ( $p < 0.05$  /  $p < 0.01$  /  $p < 0.001$ ) zur Kontrollgruppe; (\*) / (\*\*) / (\*\*\*) signifikanter Unterschied zur anderen PMF-Gruppe (Dunns-Post-Test nach Kruskal-Wallis-Test); n.d.: nicht detektierbar / nicht zu berechnen; †: bei Megakaryozyten nur in einem Fall der Kontrollgruppe detektierbar; ‡: bei Megakaryozyten nur in zwei Fällen der mf 2/3-Gruppe detektierbar; §: bei Megakaryozyten nur in je einem Fall der mf 0/1- und der mf 2/3-Gruppe detektierbar; []: in Megakaryozyten überhaupt nicht detektierbar; ¶: bei Megakaryozyten nur in drei Fällen der mf 2/3-Gruppe detektierbar; #: überhaupt nicht detektierbar).

Zur weiteren Verdeutlichung sind zwei ausgewählte Gene - BNIP3 sowie TUBB1 - auch als Punktediagramm dargestellt (Abbildung 4-3). BNIP3 zeigte hierbei in der PMF eine signifikant geringere mRNA-Expression sowohl in Megakaryozyten als auch im Knochenmark (Abbildung 4-3 A). Man beachte, dass im Fall der Megakaryozyten in der PMF mf 0/1-Gruppe nur 11 Werte angegeben sind, da in einem Fall eine Detektion wahrscheinlich aufgrund einer zu geringen Expression

nicht möglich war. Im Gegensatz zu BNIP3 wies TUBB1 eine deutliche Überexpression im Knochenmark auf, die sich in den Megakaryozyten nicht bestätigte (Abbildung 4-3 B).

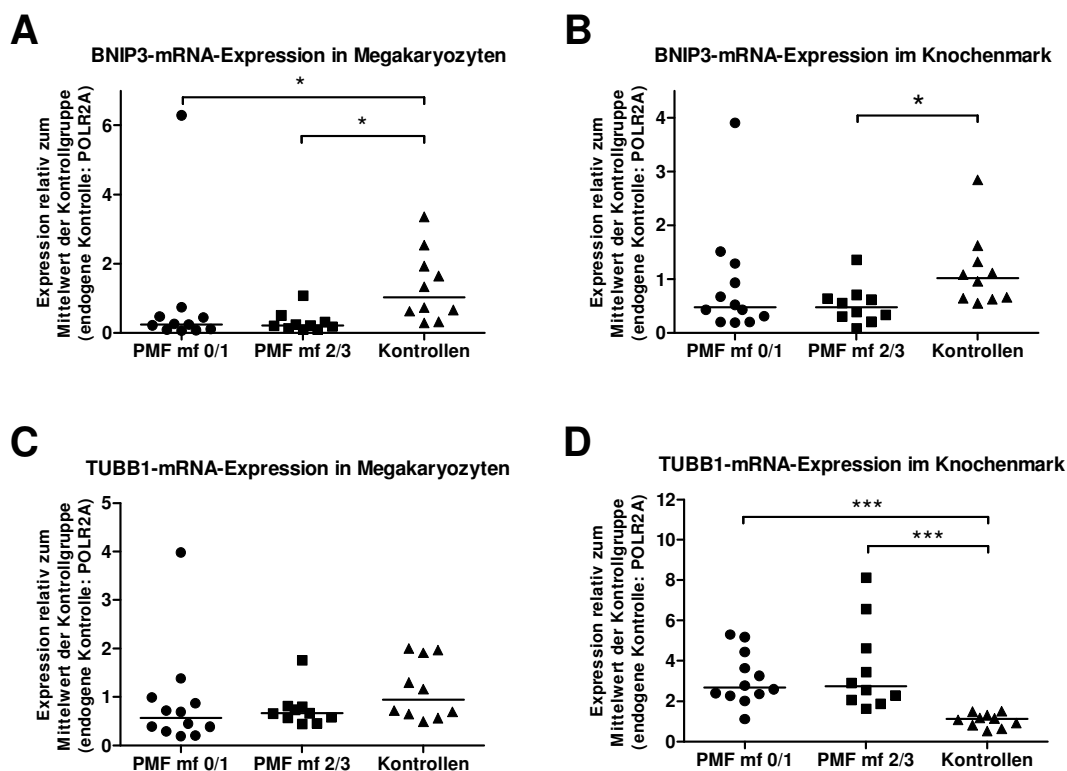


Abbildung 4-3: Einzelne  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte der LDA-Analyse und Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests und Dunns-Post-Tests (\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Zur Verifizierung der LDA-Ergebnisse wurden ausgehend von derselben präamplifizierten cDNA Einzelmessungen per qPCR durchgeführt. Hierbei zeigten sich eine hohe Korrelation zwischen den jeweiligen  $\Delta C_T$ -Werten und eine Bestätigung der nicht detektierbaren BNIP3-Expression in einem der PMF-Fälle (Abbildung 4-4 B). Zusätzlich wurden die Megakaryozyten von 10 ET-Fällen in ihrer BNIP3-Expression untersucht, wobei sich eine Tendenz zu geringerer Expression zeigte (Median 0,55; Abbildung 4-4 A), die darüber hinaus durch eine in einem Fall nicht detektierbare Expression ergänzt wurde.

Durch ergänzende Untersuchungen in unterschiedlichen Verlaufsfällen konnte festgestellt werden, dass sich die BNIP3-Expression in 7 von 9 Fällen im

Vergleich zur Erstdiagnose verringert hatte, wobei der stärkste Rückgang mit der stärksten Zunahme des Fibrosegrades von 0 auf 2 einherging (Abbildung 4-4 C).

In jeweils 8 Fällen der drei LDA-Studiengruppen wurde außerdem die mRNA-Expression von BNIP3L evaluiert (Abbildung 4-4 D). Hierbei erwies sich die Expression in der PMF mf 2/3-Gruppe als im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant herabreguliert (Median 0,50), während die PMF-Gruppe der Fibrosegrade 0 und 1 ähnliche Werte (Median 0,81) wie die Kontrollgruppe aufwies (Median 0,93).

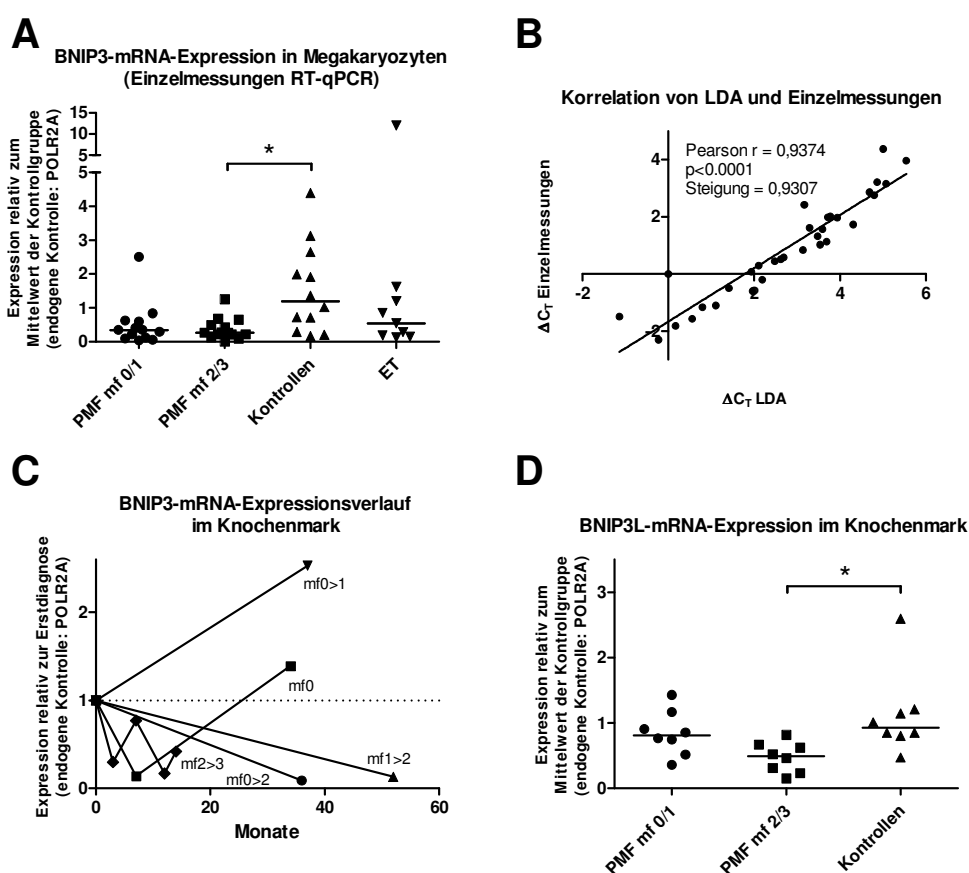


Abbildung 4-4: Ergänzende Genexpressionsanalysen im Rahmen des LDA-Screenings. (A):  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Werte von BNIP3 und Ergebnis eines Kruskal-Wallis-Tests plus Dunns-Post-Test (\*  $p < 0,05$ ). (B): Korrelation der  $\Delta C_T$ -Werte. (C): Expressionsverlauf von BNIP3 in 5 PMF-Patienten mit Angabe der Entwicklung bzw. Stagnation des Fibrosegrades. (D):  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Werte von BNIP3L und Ergebnis eines Kruskal-Wallis-Tests plus Dunns-Post-Test (\*  $p < 0,05$ ).

Berechnet man im Rahmen der Analyse der LDA-Ergebnisse die Mediane der  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Werte aller Gene, so erhält man für die Kontrollen, PMF mf 0/1, PMF

mf 2/3, PMF JAK2(wt), PMF JAK2(V617F) in den Megakaryozyten 1,02; 0,63; 0,73; 0,70; 0,72 und für das gesamte Knochenmark 1,06; 1,28; 1,15; 1,20; 1,20.

Die Berechnung der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte wurde daraufhin noch in einer zweiten Variante durchgeführt, wobei als endogene Kontrolle nicht standardmäßig POLR2A, sondern der Mittelwert aller 48  $C_T$ -Werte des jeweiligen Falles verwendet wurde. In Tabelle 4-6 sind die so ermittelten Expressiondaten aller Gene, die in mindestens einer Gruppe einen Median kleiner gleich 0,5 oder größer gleich 2 zeigten, aufgelistet.

Gen (ID-Nr. des Herstellers)	Megakaryozyten			Gesamtknochenmark		
	Kontrolle n = 10	PMF mf 0/1 n = 12	PMF mf 2/3 n = 10	Kontrolle n = 10	PMF mf 0/1 n = 12	PMF mf 2/3 n = 10
BCL2L1-Hs00236329_m1	1,00	1,70	<b>2,67 **</b>	0,96	0,93	<b>0,65 *</b>
PECAM1-Hs00169777_m1	1,16	<b>1,15 (**)</b>	<b>2,98 * (**)</b>	1,06	<b>1,11 (*)</b>	<b>1,52 (*)</b>
APAF1-Hs00559441_m1	1,18	1,39	<b>2,50 *</b>	0,93	1,44	1,28
STAT1-Hs00234829_m1	1,37	<b>0,87 (*)</b>	<b>2,01 (*)</b>	0,87	1,51	1,40
TUBB1-Hs00258236_m1	1,03	1,18	1,73	1,13	<b>2,70 **</b>	<b>3,29 ***</b>
CLU-Hs00156548_m1	1,03	0,78	1,16	1,21	1,87	<b>2,84 **</b>
BAX-Hs00180269_m1	1,09	<b>2,17 *</b>	<b>3,51 ***</b>	1,00	<b>0,85 (*)</b>	<b>1,08 (*)</b>
FLI1-Hs00231107_m1	1,15	2,45	<b>2,99 **</b>	1,18	<b>2,14 ***</b>	<b>1,88 *</b>
PRKCB1-Hs00176998_m1	1,05	<b>2,70 *</b>	<b>3,54 **</b>	1,05	<b>1,79 ***</b>	<b>1,72 **</b>
BNIP3-Hs00969293_mH	1,16	0,34	0,55	1,03	0,47	0,45
MPL-Hs00180489_m1	0,95	1,64	<b>3,21 *</b>	0,97	<b>2,83 *</b>	<b>4,67 ***</b>
BID-Hs00609630_m1	0,95	1,23	<b>2,60 *</b>	0,94	1,36	1,62
BCL2-Hs00608023_m1				0,96	0,91	0,49

Tabelle 4-6: Mediane der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte (endogene Kontrolle: Mittelwert aller 48  $C_T$ -Werte; \* / \*\* / \*\*\* signifikanter Unterschied ( $p < 0.05$  /  $p < 0.01$  /  $p < 0.001$ ) zur Kontrollgruppe; (\*) / (\*\*) / (\*\*\*) signifikanter Unterschied zur anderen PMF-Gruppe).

#### 4.2.2 Methylierungsstatus des BNIP3-Gens

Im Rahmen der COBRA konnte im Knochenmark in 14 PMF-Fällen und 3 Kontrollen keine Restriktion des PCR-Produktes und somit keine Hypermethylierung nachgewiesen werden (Abbildung 4-5).

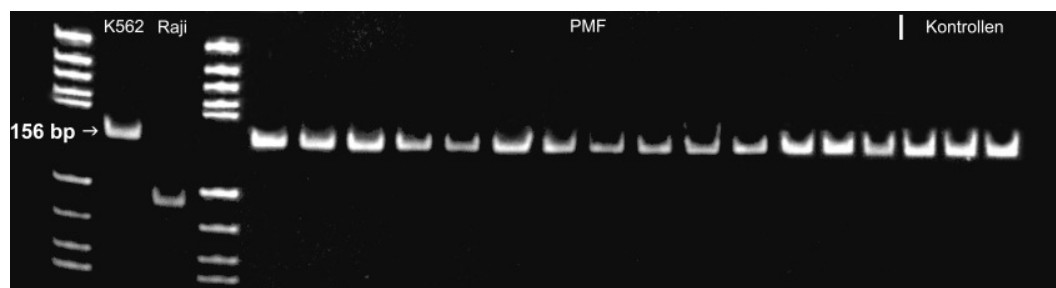


Abbildung 4-5: DNA nach Konversion, PCR und Restriktionsverdau im Rahmen der COBRA (K562: Negativkontrolle, Raji: Positivkontrolle).

#### 4.2.3 Proteinexpression von BNIP3 im Knochenmark

Die immunhistochemische Färbung von BNIP3 im Knochenmark mit megakaryozytärer Hyperplasie als Kontrolle (n = 8), präfibrotischer PMF (n = 4) sowie fibrotischer PMF (n = 5) zeigte tendenziell eine schwächere nukleäre Färbung der PMF-Megakaryozyten im Vergleich zu den Megakaryozyten der Kontrollfälle (Abbildung 4-6).

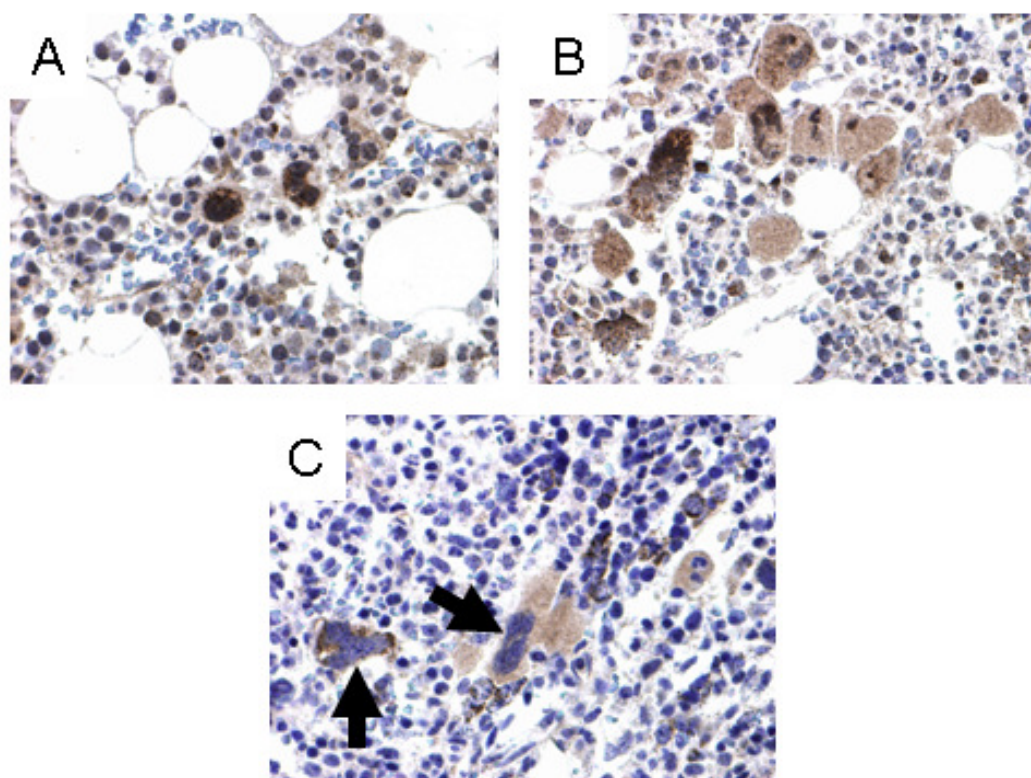


Abbildung 4-6: Immunhistochemie (Vergrößerung: 400x) von BNIP3 im Knochenmark einer repräsentativen Kontrolle (A), eines präfibrotischen PMF-Falles (B) und einer fibrotischen PMF (C, Pfeile kennzeichnen nicht angefärbte Nuclei).



## 4.3 Untersuchungen megakaryozytärer Zelllinien unter Hypoxie

### 4.3.1 Expression unter Anoxie

Der Hypoxie-induzierbare Faktor HIF3A zeigte nach 24 h Anoxie-Inkubation eine ca. 15- bzw. 8-fache Überexpression im Vergleich zur Normoxiekontrolle in SET-2- bzw. CMK-Zellen, während HIF1A und HIF2A keine nennenswerten Änderungen in ihrer mRNA-Expression aufwiesen (Abbildung 4-8 A). Im Western Blot konnte dagegen eine deutliche Steigerung der Expression von HIF1A auf Proteinebene demonstriert werden (Abbildung 4-7).

Im Fall von BNIP3 wurde zunächst die Expressionsstärke relativ zu POLR2A untersucht (Abbildung 4-8 B), wobei sich in SET-2 die geringste Expression mit einem relativen Median von 0,12 ergab, gefolgt von CMK (Median 0,44), SD-1 (Median 0,61) und HeLa (Median 1,4).

Die relativ zur Normoxie berechnete mRNA-Expression von BNIP3 unter Anoxie zeigte einen deutlichen Anstieg in annähernd exponentieller Form, bis nach ca. 24 h die Sättigungspunkte bei Faktoren von ca. 43 (SET-2) bzw. 17 (CMK) erreicht waren. 24 h nach Beendigung der Anoxie-Inkubation zeigte sich ein erneuter Rückgang der BNIP3-mRNA auf annähernd ursprüngliche Werte. Auch durch Zugabe von 1 mM Cobaltchlorid konnte eine 13- bzw. 3,5-fache Überexpression von BNIP3 nach 24 h in SET-2 bzw. CMK erzielt werden (Abbildung 4-8 C).

Der Vergleich der BNIP3-mRNA-Expression mit der von VEGFA nach 24 h Anoxie macht deutlich, dass BNIP3 im Fall von SET-2 und CMK deutlich stärker überexprimiert wurde als VEGFA. Dagegen zeigte sich im Fall der SD-1-Zelllinie eine vergleichbar ausgeprägte Zunahme beider mRNAs unter Anoxie (Abbildung 4-8 D).

BCL2, BCL2L1, BAX und BID, vier neben BNIP3 und BNIP3L weitere Mitglieder der BCL2-Familie, zeigten nach 24 bzw. 72 h Anoxie in allen Fällen eine zum Teil sehr deutliche Reduktion ihrer mRNA-Level. Allein die BCL2-Expression in SD-1-Zellen, zu denen nur Daten nach 24 h Anoxie-Inkubation erhoben wurden, erwies sich als tendenziell überexprimiert (Abbildung 4-8 E).

In Abbildung 4-8 F sind diejenigen Faktoren dargestellt, die auf einem LDA mit 96 Apoptose-assoziierten Genen in mindestens einer der beiden Zelllinien SET-2 und CMK einen mindestens um einen Faktor von 3 herauf- oder herabregulierten Wert nach 24 h Anoxie aufwiesen und im anderen Fall einen mindestens um einen Faktor von 2 herauf- oder herabregulierten Wert. Dabei zeigte sich bei allen auf diese Weise als dereguliert klassifizierten Faktoren ein gleicher Trend in SET-2 und CMK, wobei nur ein Faktor, nämlich BIRC5, eine Reduktion seiner relativen mRNA-Menge erkennen ließ, während die übrigen Faktoren mit einer Überexpression durch die Anoxie-Inkubation aufwarteten. BNIP3 war dabei im Mittel am stärksten heraufreguliert (Faktor 22,18), dicht gefolgt von BIRC3 (Faktor 21,97).

Die Analyse von mehreren Faktoren, die sich im Rahmen der LDA-Untersuchungen in Megakaryozyten und Knochenmark als aberrant exprimiert erwiesen hatten, lieferte als auffälligste Ergebnisse eine ca. zweifache Überexpression von CLU und APAF1 sowie eine vergleichbar starke Herabregulierung von PECAM1 in CMK-Zellen unter Anoxie (Abbildung 4-8 I).

Darüber hinaus konnte durch die Untersuchung von drei megakaryozytären Proliferationsmarkern in SET-2-Zellen außerdem eine deutliche Zunahme von CD9-mRNA unter Anoxie festgestellt werden (Abbildung 4-8 J).

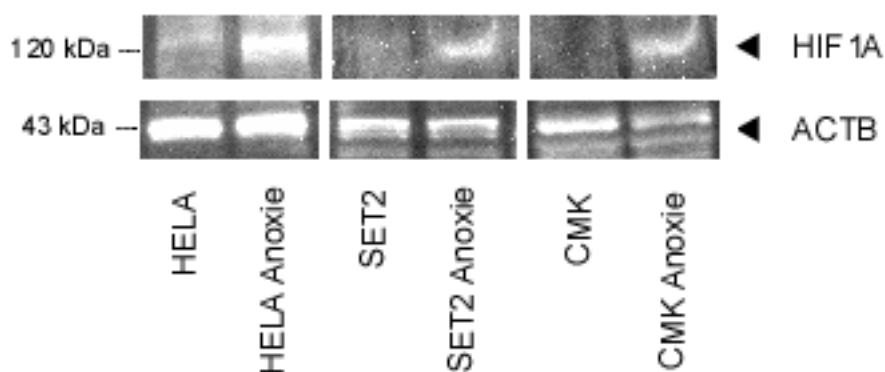


Abbildung 4-7: Proteinexpression von HIF1A (und ACTB als Ladekontrolle) unter normoxischen und anoxischen Zellkulturbedingungen.

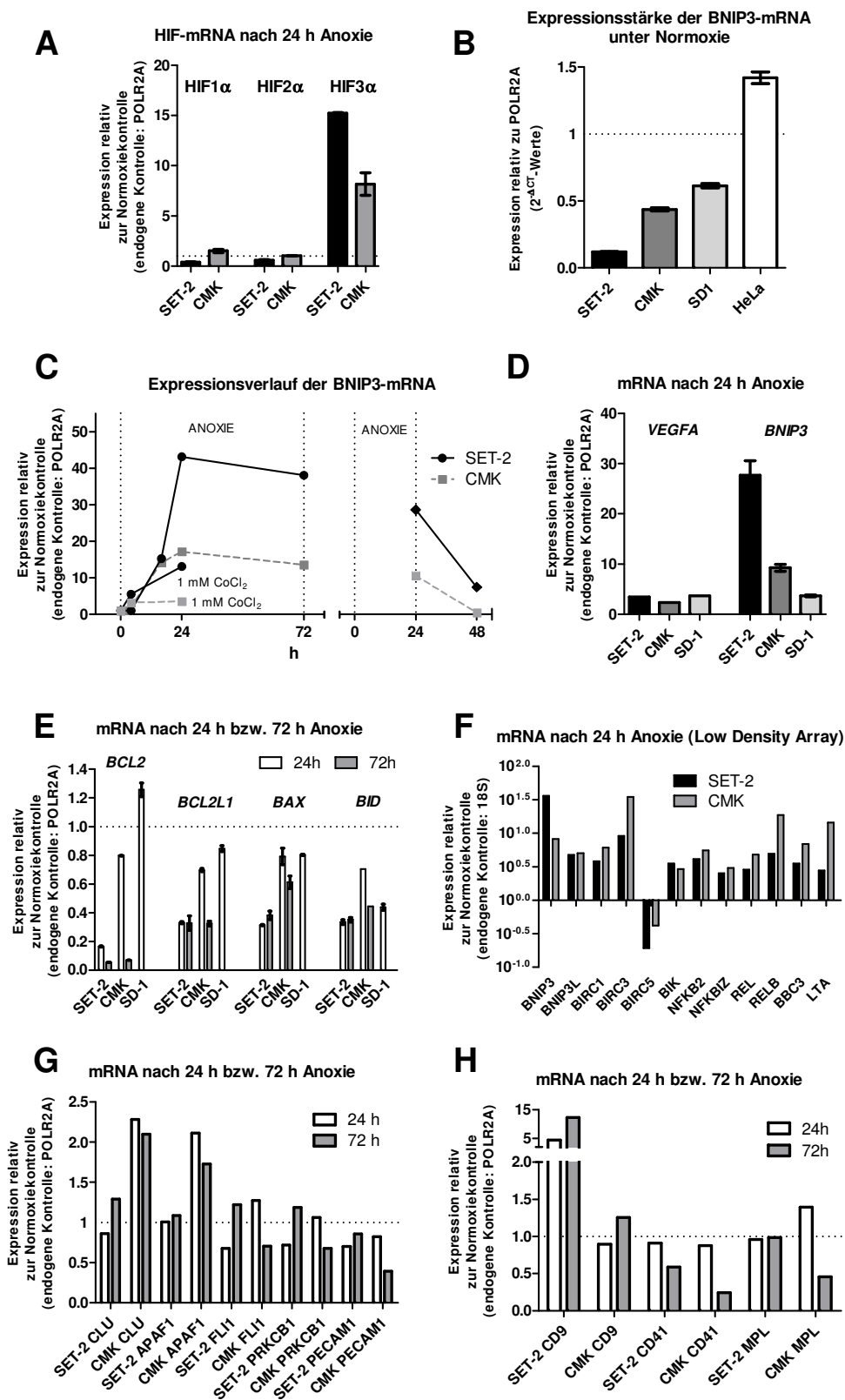


Abbildung 4-8:  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte (ggf. Mittelwerte und Spannweiten) der Genexpressionsanalysen im Rahmen der Anoxie-Inkubation.

#### 4.3.2 Expression nach siRNA-Transfektion

Nach liposomaler Transfektion von HIF1A-siRNA konnte nur im Fall der HeLa-Zelllinie ein deutlicher Rückgang der HIF1A-mRNA (um 88%) festgestellt werden, während CMK und SET-2 praktisch überhaupt keine Veränderungen zeigten (Abbildung 4-9 A). Die HIF1A-Inhibierung im Fall von HeLa führte unter Anoxie zu einer Reduktion sowohl der BNIP3-mRNA als auch der BNIP3L-mRNA um ca. 50 bzw. 40% (Abbildung 4-9 B).

SET-2 und CMK zeigten erst durch Transfektion mittels Elektroporese deutlich reduzierte Level der HIF1A-mRNA, wobei mit 64% bzw. 42% Rückgang allerdings nicht die hohe Effizienz der liposomalen Transfektion bei HeLa erreicht werden konnte (Abbildung 4-9 C). Abbildung 4-9 D macht deutlich, dass der relative Gehalt an BNIP3-mRNA unter Normoxie innerhalb von 72 h nach der Transfektion nur minimal zurückging, während der mRNA-Gehalt von HIF1A wieder bis fast auf den Normalwert anstieg. Unter Anoxie konnte dagegen eine Reduktion der BNIP3-mRNA um 72% (SET-2) und 57% (CMK) sowie eine Reduktion der BNIP3L-mRNA um 40% (SET-2) und 46% (CMK) demonstriert werden (Abbildung 4-9 E).

Bei der liposomalen bzw. elektroporativen Transfektion von BNIP3-siRNA ergaben sich ähnliche Knockdown-Effizienzen wie im Fall der HIF1A-siRNA, nämlich 45% (SET-2) bzw. 77% (HeLa) unter Normoxie und 64% (SET-2) bzw. 87% (HeLa) unter Anoxie (Abbildung 4-9 F).

Die mRNA-Expression weiterer 96 Apoptose-assoziiierter Gene nach BNIP3-siRNA-Transfektion wurde mittels LDA in HeLa-Zellen ermittelt. Abbildung 4-9 G zeigt diejenigen Gene, deren Expression sich durch die BNIP3-siRNA um einen Faktor bzw. Divisor von mindestens 4/3 veränderte, wobei BNIP3 selbst die stärkste Veränderung mit einem Rückgang auf 19% aufwies, gefolgt von BCL2L1 (auf 39%), BIRC1 (auf 59%) und CASP14 (auf 62%). Dagegen konnten bei RIPK2 sowie CASP6 Expressionssteigerungen um Faktoren von ca. 2,7 bzw. 1,7 festgestellt werden. Die Reduktion der BCL2L1-mRNA konnte allerdings in SET-2-Zellen nicht bestätigt werden, da sich hier nur Abnahmen um einige Prozent ergaben (Daten nicht gezeigt). Der ebenfalls Apoptose-assoziierte Faktor AIF wies eine mRNA-Reduktion unter Anoxie auf, zeigte aber keine Reaktion auf die Transfektion mit BNIP3-siRNA (Abbildung 4-9 H).

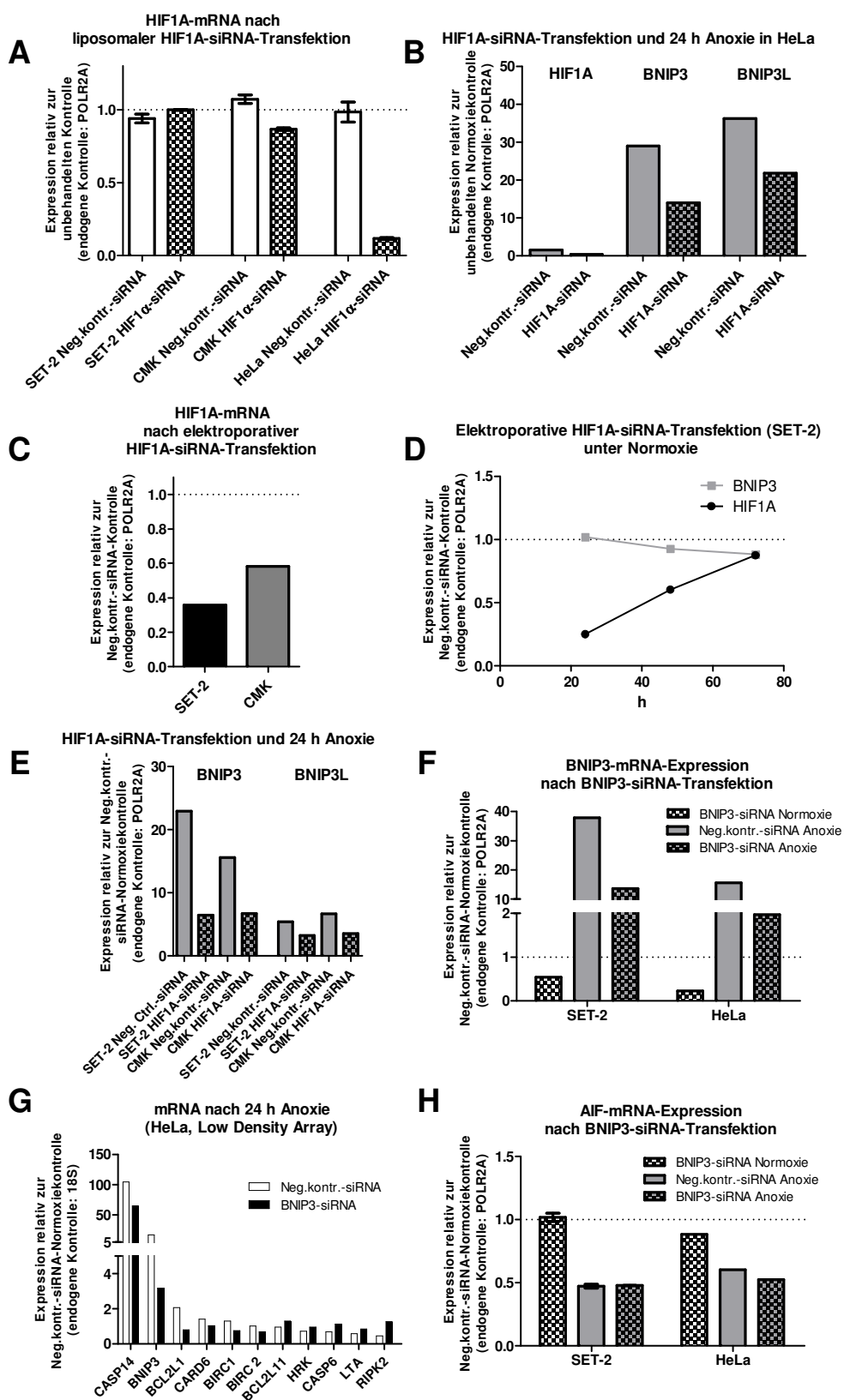


Abbildung 4-9:  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte (ggf. Mittelwerte und Spannweiten) der Genexpressionsanalysen nach siRNA-Transfektion.

### 4.3.3 Apoptosedetektion mittels ELISA

Per immunchemischer Messung von Mono- und Oligonucleosomen konnte trotz relativ großer interexperimenteller Schwankungen demonstriert werden, dass in SET-2 die Apoptoseraten unter Anoxie signifikant anstiegen, während CMK-Zellen nur einen Trend in diese Richtung aufwiesen (Abbildung 4-10 A). Beachtet werden muss hierbei, dass für die ELISA-Analysen gleiche Volumina der Zellsuspensionen eingesetzt wurden, die per Zählkammer und photometrischer RNA-Messung (Abbildung 4-10 B) nach Anoxie ermittelten Werte allerdings Unterschiede aufwiesen.

Abbildung 4-10 C zeigt die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten mit SET-2-Zellen (jeweils Doppelbestimmung), wobei keine Unterschiede der Apoptoseraten durch Transfektion von BNIP3-siRNA festgestellt werden konnten. Dagegen erwies sich in der HeLa-Zelllinie die Apoptoserate nach BNIP3-siRNA-Transfektion und 24 h Anoxie als um ca. 10% signifikant reduziert (Abbildung 4-10 D).

### 4.3.4 Zellmorphologie

Per Lichtmikroskop konnten keine Unterschiede zwischen normoxisch und anoxisch kultivierten Zellen festgestellt werden. Allerdings ließen sich bei SET-2-Zellen, nicht aber bei CMK-Zellen, abgeschnürte Proplättchen erkennen (Abbildung 4-11).

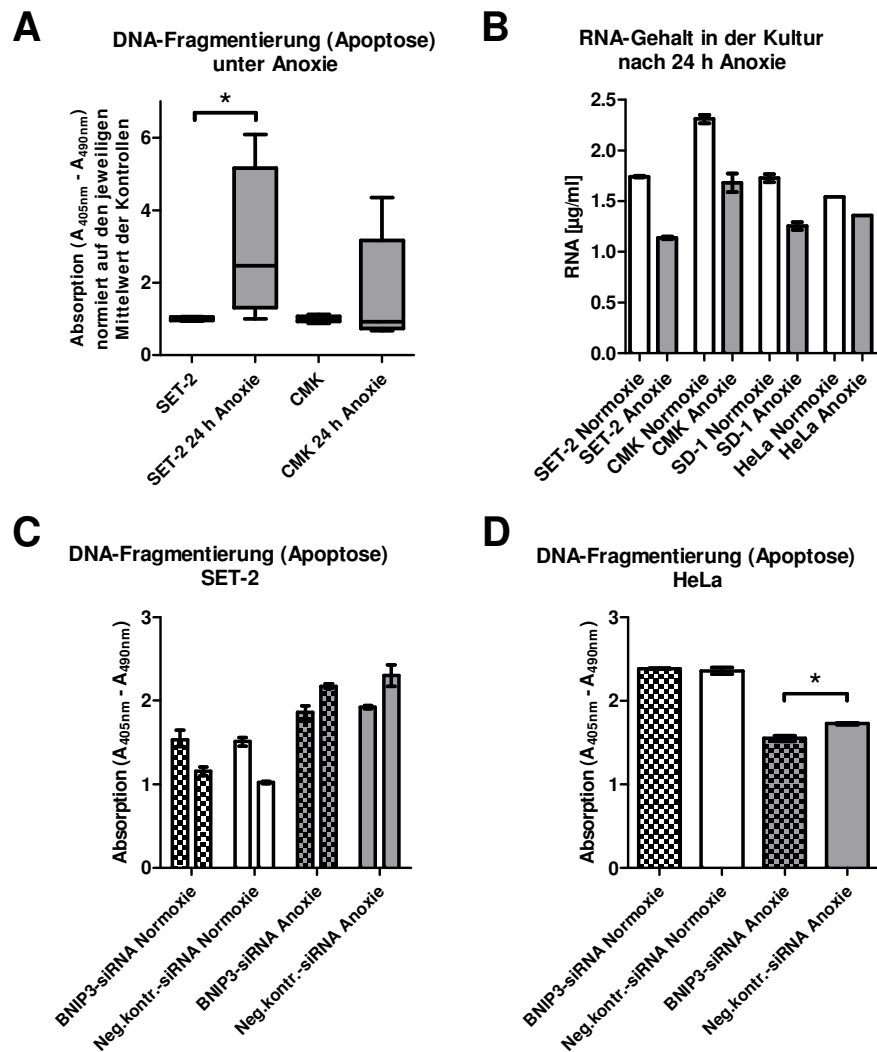


Abbildung 4-10: Ergebnisse der ELISA-Analysen. (A): Minimum-Maximum-Box-Whisker-Plot mit Ergebnis eines zweiseitigen ungepaarten t-Tests (\* p<0,05). (B): Mittelwerte und Spannweiten aus Doppelbestimmungen; Einfachbestimmungen bei HeLa. (C): Jeweils Mittelwert und Spannweite aus Dreifachbestimmungen zweier Experimente. (D): Mittelwert und Spannweite aus Doppelbestimmungen und Ergebnis eines zweiseitigen ungepaarten t-Tests (\* p<0,05).

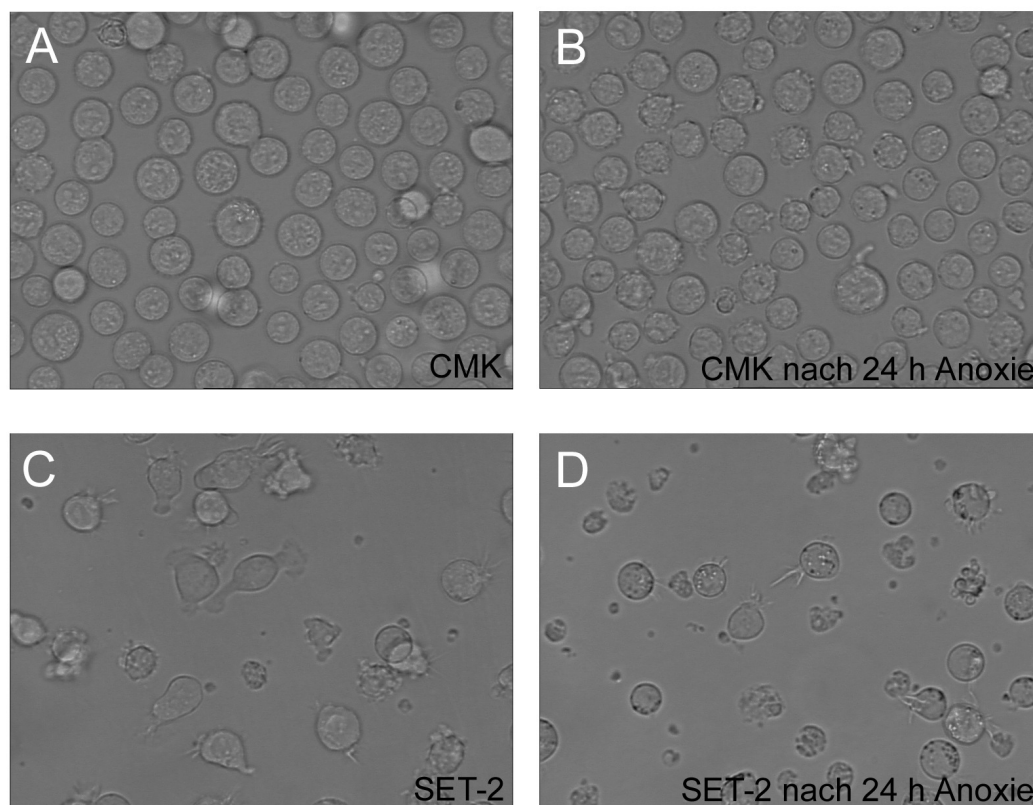


Abbildung 4-11: CMK- bzw. SET-2-Zellen nach 24 h Normoxie (A, C) oder 24 h Anoxie (B, D), Vergrößerung: 400x.

#### 4.3.5 FACS

Zur Auswertung der FACS-Analyse wurden Side Scatter gegen Forward Scatter aufgetragen (Abbildung 4-12). Hierbei zeigte sich, dass sich SET-2 (Abbildung 4-12 A, B) und CMK (Abbildung 4-12 C, D) vor allem im Bereich mittlerer Zellgrößen unterschieden, da diese bei SET-2 deutlich häufiger waren. Beim Vergleich von normoxischen SET-2-Zellen (Abbildung 4-12 A) und anoxischen SET-2-Zellen (Abbildung 4-12 B) konnte mittels Geräte-Software ermittelt werden, dass durch die Anoxie eine Erhöhung des relativen Anteils dieser mittelgroßen Zellen von 13% auf 19% hervorgerufen wurde, während die großen Zellformen mit 52% bzw. 56% annähernd konstant blieben und die sehr kleinen Partikel eine Reduktion ihres Anteils von 29% auf 17% zeigten. Bei den CMK-Zellen erfolgte lediglich eine Aufteilung in zwei Subpopulationen, wobei die kleinsten Partikel ebenfalls eine Reduktion von 13% unter Normoxie (Abbildung 4-12 C) auf 7% unter



Anoxie (Abbildung 4-12 D) zeigten, während die großen Zellen mit 84% bzw. 88% in ihrem Anteil relativ konstant blieben.

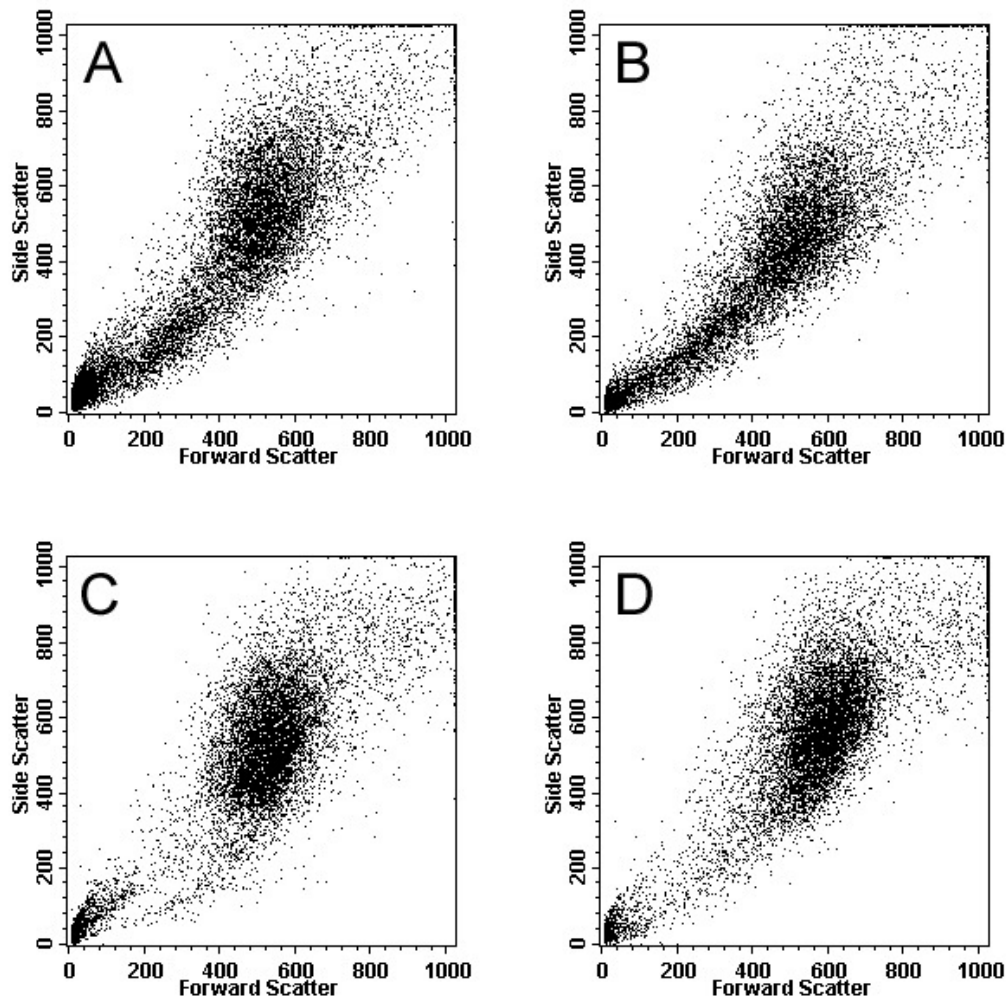


Abbildung 4-12: Per FACS ermittelte Größe und Granularität der Zellkulturen unter Anoxie oder Normoxie. A: SET-2 nach 24 h Normoxie. B: SET-2 nach 24 h Anoxie. C: CMK nach 24 h Normoxie. D: CMK nach 24 h Anoxie.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Evaluation der Amplifikationsmethoden

Die Ergebnisse der vier unterschiedlichen Ansätze zur Amplifikation der Megakaryozyten-RNA bzw. -cDNA zeigen, wie vorsichtig auf diesem Gebiet vorgegangen werden muss. Denn die größte Gefahr besteht darin, ursprünglich nicht detektierbares Material ohne Erhalt der relativen Transkriptmengen zu amplifizieren, und dieses aufgrund fehlender Vergleichsmöglichkeiten durch den nicht messbaren Wert vor Amplifikation zu übersehen. Diese Gefahr sollte in der vorliegenden Arbeit dadurch minimiert werden, dass zusätzlich zu der eigentlich zu amplifizierenden Megakaryozyten-RNA auch gesamtes Knochenmark, für das aufgrund ausreichend isolierbarer RNA-Mengen eigentlich keine Amplifikation notwendig ist, für die Testreihen verwendet wurde. Da es sich hierbei um das umgebende Gewebe der mikrodissezierten Megakaryozyten handelt und damit materialtechnisch gesehen um eine einfache Erhöhung der Ausgangsmenge, kann von einem übereinstimmenden Verhalten der RNA während der Amplifikation ausgegangen werden.

Betrachtet man die Ergebnisse der einzelnen Methoden genauer, so müssen Kit #1 und Kit #2 eindeutig negativ beurteilt werden, insbesondere vor dem Hintergrund, dass diese Methoden von den Herstellern ausdrücklich für den Gebrauch mit FFPE Gewebe empfohlen werden [84, 85].

So gelang es mit Kit #1 zwar, hohe Mengen an Megakaryozyten-RNA im µg-Bereich zu generieren, eine entsprechend erwartete Detektion in der qPCR blieb aber aus. Vergleicht man in diesem Zusammenhang die Elektropherogramme von amplifizierter Megakaryozyten-RNA (Abbildung 4-1 B) und nicht-amplifizierter

RNA aus Knochenmark (Abbildung 4-1 A), so zeigt sich, dass durch die Amplifikation ein großer Anteil der längeren RNA-Fragmente „verschwunden“ ist, die Breite der Kurve also abgenommen hat, und außerdem das Maximum etwas nach rechts verschoben ist. Letzteres lässt sich durch das Anhängen von diversen Primern und eines T7-Promotors während des umfangreichen Amplifikationsprozesses erklären. Die geringen Mengen an längeren RNA-Fragmenten im Vergleich zum gesamten Knochenmark könnten dagegen durch die ergänzende Vorbehandlung der Gewebeschnitte für die Mikrodissektion hervorgerufen worden sein, bei deren Rehydratation endogene RNasen aktiviert werden können. In dieser zusätzlichen Verkürzung der RNA-Fragmente könnte auch ein Grund für die nicht mögliche Detektion per PCR liegen. Zudem ist ein Verlust an Sequenzinformation auch durch die speziellen Primer des Kits möglich, die im ersten Schritt die Poly-dT-Primer der Ursprungsmethode von Eberwine [75] ersetzen. Angeblich sollen diese „Box-random-trinucleotide Primer“ zwar „3'-proximal“ binden, aber eine gewisse Verkürzung der Sequenz und somit auch eine Zerstörung von Amplikons für die PCR ist wahrscheinlich.

Das Elektropherogramm der Kit-zugehörigen Kontroll-RNA (Abbildung 4-1 C) zeigt eine Längenverteilung weitaus weniger degradierter RNA mit Längen bis zu 2000 nt. Der Hersteller gibt hierzu nur die Bezeichnung „human total RNA“ an, erwähnt aber nicht, ob es sich um FFPE Material handelt. Letzteres ist aufgrund der Längen bis zu 2000 nt sehr unwahrscheinlich, aber auch um gesamte RNA aus unfixierten Zellen kann es sich wegen fehlender 18S- und 28S-Banden nicht gehandelt haben. Am wahrscheinlichsten ist also mRNA aus frischem Material - eine denkbar ungünstige Kontrolle für ein Kit, das gesamte RNA aus FFPE Gewebe amplifizieren soll.

Durch die höhere Qualität der Kontroll-RNA konnten im Gegensatz zur amplifizierten Megakaryozyten-RNA auch relative mRNA-Mengen per qPCR gemessen werden, wobei allerdings nur in zwei von drei Fällen eine Reduktion der  $C_T$ -Werte und somit eindeutig kein Erhalt von relativen Transkriptmengen nachgewiesen wurde (Tabelle 4-1).

Auch Kit #2 lieferte nicht die gewünschten Ergebnisse. So gelang im Fall der Megakaryozyten erneut keine Detektion in der qPCR, während im Knochenmark und in HeLa zwar eine deutliche, aber keine durchgehend einheitliche Reduktion der

$C_T$ -Werte beobachtet werden konnte. Einzig die Kontroll-RNA des Kits zeigte nach 30 Zyklen Amplifikation eine hohe Konstanz der relativen Transkriptmengen (Tabelle 4-3). Prinzipiell scheint diese auf die Kontroll-RNA optimierte Methode also sehr abhängig von Art und Qualität der RNA zu sein. Dies zeigen auch zwei Studien, die ebenfalls Kit #2 verwendeten: Chong et al. amplifizierten damit angeblich erfolgreich 5 ng RNA aus FFPE Haut der Maus, zeigten aber keine Untersuchungen bezüglich der Validität der Amplifikation [86]. Dagegen konnten Steg et al. nur in gefrorenem Gewebe eine Amplifikation detektieren, nicht aber in FFPE Gewebe. Auch die Korrelation der  $C_T$ -Werte von amplifiziertem und nicht-amplifiziertem Material lag in dieser Studie nur bei  $r = 0,75$  (Pearson) und zudem konnten knapp 30% der Gene zwar vor, aber nicht mehr nach der Amplifikation detektiert werden [87].

Die Methode nach Peng et al., die ebenfalls keine detektierbare cDNA aus Megakaryozyten lieferte (Tabelle 4-2), ist für genomische DNA aus FFPE Gewebe entwickelt worden [79]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob diese einfache, aber theoretisch überzeugende Methode einer PCR mit Random-Hexamer-Primern auch auf cDNA-Ebene eine Amplifikation ermöglicht. Allerdings scheinen hier aufgrund des ähnlichen Ansatzes wie bei Kit #2 auch ähnliche Probleme vorzuliegen.

Die einzige Methode, die eine cDNA-Detektion aus Megakaryozyten ermöglichte und sich zudem als Amplifikation mit Erhalt der relativen Transkriptmengen erwies (Tabelle 4-4), war Kit #3. Auch die leichte Abnahme der PCR-Effizienz durch den Einsatz von präamplifizierter cDNA (Abbildung 4-2 B) - wahrscheinlich bedingt durch die höhere Transkriptmenge und schon in der Präamplifikation akkumulierte Nebenprodukte - konnte die konstante Reduktion der  $C_T$ -Werte um 14 Zyklen nicht beeinträchtigen.

Im Vergleich mit den anderen getesteten Methoden ist der prinzipielle Unterschied der Amplifikation mittels spezifischer Primer zugleich der große Vorteil dieser Methode. Das Problem der Amplikonverkürzung durch randomisierte Primer (Abbildung 5-1) scheint im Rahmen der hier verwendeten RNA in Kombination mit den extrem geringen Mengen von ca. 10 ng pro 200-300 Megakaryozyten eine erfolgreiche Amplifikation mit Kit #2, mit der RP-PCR und wahrscheinlich auch mit Kit #1 unmöglich zu machen. Der Verlust an vollständigen Amplikons (für die

nachfolgende qPCR) während der Amplifikation mit randomisierten Primern zeigt sich auch daran, dass die Reduktion der  $C_T$ -Werte bei Kit #2 deutlich geringer war als die Zyklenanzahl der vorherigen Amplifikation, während die entsprechenden Werte im Fall der Amplifikation mit spezifischen Primern bei Kit #3 genau übereinstimmten (Reduktion der  $C_T$ -Werte um ca. 14 nach 14 Zyklen Amplifikation).

Nachteile der spezifischen Präamplifikation sind hingegen die Beschränkung der nachfolgenden Genexpressionsanalyse auf die Methode der qPCR, während andere Amplifikationsmethoden durch Generierung von kompletter cDNA bzw. RNA mehr Einsatzmöglichkeiten offenhalten. Zudem können mit dem hier verwendeten Kit nur bis zu 100 Primerpaare in einer Reaktion verwendet werden [74].

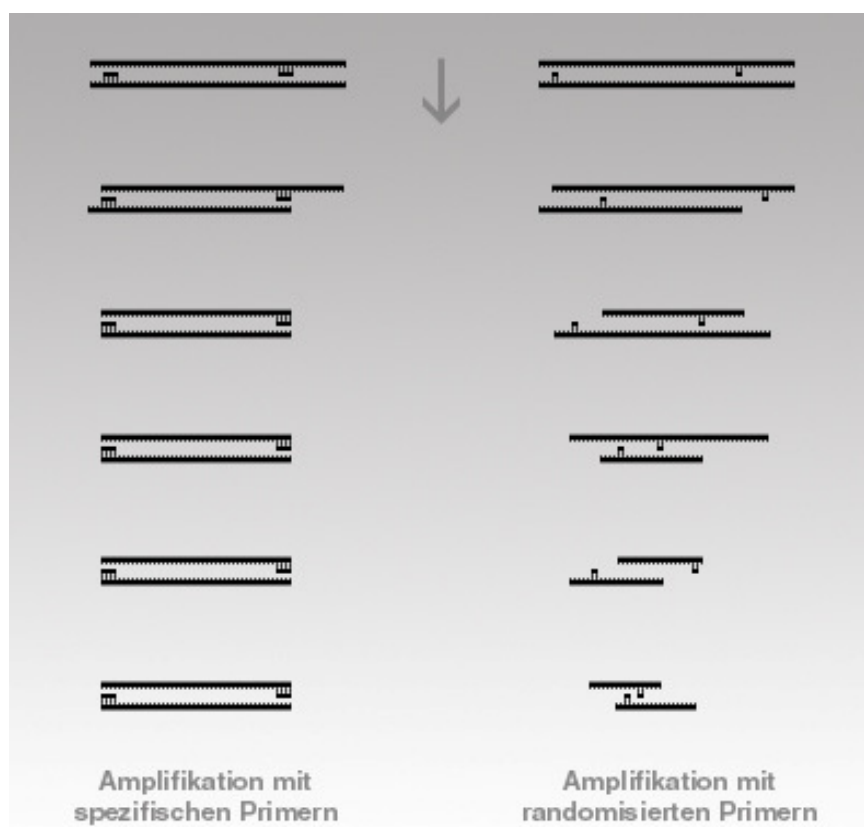


Abbildung 5-1: Schematische Darstellung der fortschreitenden Amplikonverkürzung während der PCR-basierten Amplifikation mit randomisierten Primern im Gegensatz zur konstanten Amplikonlänge durch spezifische Primer.

Auch in anderen FFPE Geweben, deren Prozessierung sich teilweise vom Knochenmark unterscheidet, konnte die spezifische Präamplifikation erfolgreich getestet werden (Tabelle 4-4). Insofern wurde mit den methodischen Untersuchungen dieser Arbeit die Basis für eine valide und reproduzierbare Methode geschaffen, die erstmals eine RT-qPCR auf Zelltyp-spezifischer Ebene in FFPE Gewebe und somit die Durchführung von mehreren Studien des Instituts für Pathologie ermöglicht hat.

## 5.2 Expression Apoptose-assoziiierter Gene in Megakaryozyten und Knochenmark der PMF

Nachdem sich einzig die Amplifikation mit spezifischen Primern als effektive Methode für die Amplifikation der Megakaryozyten-RNA erwiesen hatte, beschränkte sich die nachfolgende Genexpressionsanalyse auf die qPCR, da gängige Microarrays nicht mit der spezifischen cDNA kompatibel sind. Die Wahl fiel dabei auf sogenannte „Low Density Arrays“ (LDA) (Abbildung 1-2), die eine hohe Reliabilität durch automatische Zusammenführung der Reaktionskomponenten und eine schnelle sowie kostengünstige Durchführung durch die parallele Messung von 384 1-2 µl-Reaktionen bieten. Das Layout des LDA wurde auf 8 x 48 Gene festgelegt, wobei nur Primer ausgewählt wurden, die Amplikons unter 100 bp generieren und somit geeignet für FFPE Gewebe sind.

Von den vier Referenzgenen des LDA (GAPDH und 18S vom Hersteller vorgegeben, POLR2A und GUSB selbst ausgewählt) erwies sich einzig POLR2A als geeignet für die Berechnung von relativen Faktoren nach der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode [82], da GAPDH, GUSB sowie 18S in mehreren Fällen der mikrodisszierten Megakaryozyten nicht detektierbar waren, was zu einem Ausschluss dieser Fälle aus der Analyse hätte führen müssen. Darüber hinaus konnte POLR2A in einer Studie von Radonic et al. an 16 Gewebetypen aus insgesamt 13 potentiellen Referenzgenen als die am besten geeignete endogene Kontrolle identifiziert werden [88]. Auch theoretisch macht der Einsatz von POLR2A, also der RNA-Polymerase II, als

Referenzgen Sinn, da sich eventuelle Expressionsänderungen theoretisch auch in einer entsprechenden Änderung der mRNA-Synthese und damit der mRNA-Expression anderer Gene niederschlagen würden, was einen geringeren Einfluss auf die berechneten relativen Faktoren zur Folge hätte.

Im Zuge der Analyse mit POLR2A als Referenzgen zeigte sich jedoch in den Megakaryozyten ein allgemeiner Trend zur Herabregulierung und im Gesamtknochenmark eine Tendenz zur Überexpression (Tabelle 4-5). Dies kann theoretisch auf eine ungewünschte Veränderung des zellulären Gehaltes an POLR2A-mRNA hindeuten. Genauso lassen sich aber eine allgemein herabregulierte und somit verlangsamte Proliferations- und Apoptose-Maschinerie in den Megakaryozyten und ein aktivierter Apparat im restlichen Knochenmark als Ursachen angeben. Hiermit übereinstimmend werden Megakaryozyten der PMF oft Reifungsstörungen zugeschrieben [51], während der erhöhte Anteil an Granulozyten und die damit verbundene Erhöhung von Proliferation und Apoptose im Knochenmark für die Expressionsaktivierung vieler Gene verantwortlich sein könnte.

Dennoch wurde in einer zweiten Analyse der Daten statt des  $C_T$ -Wertes des Referenzgens das Mittel aller 48  $C_T$ -Werte des jeweiligen Falls als endogene Kontrolle eingesetzt (Tabelle 4-6). Dieses Vorgehen ist insbesondere dann gerechtfertigt, wenn eine große Anzahl von Genen untersucht wird und wenn davon ausgegangen werden kann, dass eine Zelle ihren Gesamtgehalt an mRNA konstant hält. Da Ersteres hier eindeutig nicht zutrifft, werden in der folgenden Diskussion hauptsächlich, aber nicht ausschließlich, die Daten aus der Analyse mit POLR2A als Referenzgen zu Grunde gelegt.

In Ergänzung zu den Untersuchungen per LDA wurden auch mehrere Messungen als einzelne qPCRs durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine sehr gute Korrelation zwischen den beiden Methoden, die eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse rechtfertigt (Abbildung 4-4 B).

Im Folgenden sollen nun die auffälligsten Expressionswerte verschiedener Gene genauer diskutiert werden.

Das relativ stark exprimierte PECAM1 (Rang 3) weist in seinen Expressionswerten insofern eine Besonderheit auf, als es abhängig vom Fibrosegrad differentiell exprimiert wird. So zeigte sich in der Gruppe der PMF mf 2/3 eine

signifikant höhere Expression als in der PMF-Gruppe mit einem Fibrosegrad von 0 oder 1 (Tabelle 4-5). Als integralem Membranprotein von Megakaryozyten und Plättchen wird PECAM1 (oder CD31) unter Anderem eine Rolle in Adhäsions- und Migrationsvorgängen zugeschrieben. So konnte bei Plättchen aus PECAM1-Knockout-Mäusen *in vitro* eine stärkere durch Kollagen induzierte Aggregation als bei wt-Plättchen festgestellt werden [89]; und auch im Knochenmark der Knockout-Mäuse scheint die megakaryozytäre Migration zu den Sinusoiden aufgrund einer stärkeren Adhäsion der immaturren Megakaryozyten an das Fibronectin der extrazellulären Matrix gestört zu sein [90]. Derartige Beobachtungen erinnern an die megakaryozytäre Topographie der myeloproliferativen Neoplasien, wo aberrante Gruppierungen und insbesondere in der PMF auch Ansammlungen an der Grenze zum Knochen (peritrabekulär) die Regel sind [51]. Die erhöhte mRNA-Expression von PECAM1 in der PMF ist in diesem Zusammenhang nicht zwangsläufig widersprüchlich zu sehen, da zum Beispiel ein funktional gestörtes PECAM1-Protein über einen gestörten negativen Rückkopplungsmechanismus mit einer erhöhten Expression auf mRNA-Ebene einhergehen könnte. Darüber hinaus fungiert PECAM1 als Rezeptor innerhalb anti-apoptotischer Signaltransduktionen, wobei insbesondere das Mitochondrien zerstörende BAX und damit der intrinsische Weg gehemmt werden [91].

Bei TUBB1 zeigte sich im Knochenmark der Primären Myelofibrose durchgehend eine Überexpression um mehr als den Faktor 2 (Abbildung 4-3 D, Tabelle 4-5, Tabelle 4-6). In den Megakaryozyten konnten dagegen mit keiner der beiden Auswertungsmethoden signifikante Unterschiede nachgewiesen werden (Abbildung 4-3 C, Tabelle 4-5, Tabelle 4-6). TUBB1 ist Bestandteil des Cytoskeletts, wobei diese spezielle Isoform ausschließlich in Megakaryozyten und Plättchen zu finden ist [92, 93]. Insofern kann dieser Fall als sehr gutes Beispiel für die bereits umrissene Problematik der Verwendung von makroskopischen Gewebestücken mit unterschiedlichen Zellarten dienen, da es außer Zweifel steht, dass sich aufgrund der für die PMF typischen neoplastischen Akkumulation von Megakaryozyten der relative Anteil der Megakaryozyten an der Zellgesamtheit des Knochenmarks erhöht. Somit wurde in diesem Fall wahrscheinlich nur die erhöhte Anzahl an Megakaryozyten detektiert und keine Deregulation von TUBB1.



Man könnte nun fragen, warum überhaupt gesamtes Knochenmark für den LDA verwendet wurde, da im Prinzip alle Ergebnisse in dieser Weise angezweifelt werden können. Der Grund dafür lag vor allem in der Unsicherheit, ob die Qualität und Streuung der ermittelten Daten aus den mikrodisezierten Megakaryozyten eine Auswertung und darüberhinaus eine Ermittlung von signifikanten Unterschieden zulassen würden. Da beim Knochenmark in dieser Hinsicht schon Erfahrung durch mehrere Expressionsstudien vorhanden war [80, 94], bot es sich an, die jeweils korrespondierenden Fälle als „Absicherung“ ebenfalls zu untersuchen. Darüberhinaus stellt diese Kombination an mikrodisezierten Zellen und komplettem Umgebungsgewebe natürlich eine hervorragende Diskussionsgrundlage dar.

PRKCB1 zeigte zwar nur im Knochenmark eine signifikante Überexpression, in den Megakaryozyten der PMF war es aber mit konstanten Faktoren von ca. 1,5 das in seiner mRNA-Expression am stärksten heraufregulierte Gen (Tabelle 4-5). Dies zeigte sich auch in der Analyse mit dem mittleren  $C_T$ -Wert als endogene Kontrolle, wo signifikante Faktoren von etwa 3 erreicht wurden. PRKCB1 wird unter oxidativen Bedingungen aktiviert und ist Teil einer mitochondrialen Signalkaskade, die eine Apoptose induzieren kann [95]. Die zellulären Funktionen von PRKCB1 scheinen aber noch weitaus komplexer zu sein, da es in zahlreichen Tumoren überexprimiert wird und als primäres Target des sich zur Zeit in mehreren klinischen Studien als vielversprechend erweisenden Enzastaurin gilt [96].

CASP14, nach gängiger Meinung nur in Epithelzellen exprimiert [97], laut Raslova et al. aber auch in *in vitro* differenzierten Megakaryozyten [98], konnte in den vorliegenden Untersuchungen weder in Megakaryozyten noch im gesamten Knochenmark detektiert werden. Auch TERT scheint, wenn überhaupt, unterhalb der Detektionsgrenze exprimiert zu werden (Tabelle 4-5).

Im Fall der mikrodisezierten Megakaryozyten erwies sich ein Gen als besonders auffällig aberrant exprimiert: BNIP3 zeigte in allen PMF-Gruppierungen eine signifikant reduzierte Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 4-3 A, Tabelle 4-5). Und auch im Knochenmark konnte eine geringere Expression nachgewiesen werden (Abbildung 4-3 B). Darüber hinaus bestätigten weitere Untersuchungen an mikrodisezierten Megakaryozyten der ET (Abbildung 4-4 A), die von Tenedini et al. im Rahmen einer Array-Analyse

beobachtete Herabregulierung von BNIP3 in Megakaryozyten, die *in vitro* aus hämatopoetischen Vorläuferzellen der ET differenziert worden waren [99].

BNIP3 gehört zur BCL2-Familie, deren Mitglieder die mitochondriale Freisetzung von Cytochrom c, Endonucleasen sowie weiterer pro-apoptotischer Proteine und somit die Initiierung des intrinsischen Weges der Apoptose regulieren [100]. Funktional entscheidend scheinen dabei vor allem  $\alpha$ -helikale BCL2-Homologie (BH)-Domänen zu sein, nach deren Anzahl eine Unterteilung in i) anti-apoptotische Multidomänen-Proteine, ii) pro-apoptotische Multidomänen-Proteine und iii) grundsätzlich pro-apoptotische „BH3-only“-Proteine, zu denen auch BNIP3 gezählt wird, vorgenommen wird. Zentrale Effektoren der BCL2-Familie sind dabei die pro-apoptotischen Multidomänen-Proteine BAX und BAK, die, nach Aktivierung durch „BH3-only“-Proteine, als Bestandteile spezieller mitochondrialer Kanäle fungieren und somit den Ausfluss von Cytochrom c ermöglichen. Dagegen wirken BCL2 und BCL2L1 anti-apoptotisch, indem sie kompetitiv an die aktivatorischen „BH3-only“-Mitglieder binden, während sie selbst wiederum von anderen „BH3-only“-Proteinen gehemmt werden [100].

Abseits dieser recht einfachen Modellvorstellung gibt es allerdings zahlreiche Hinweise auf ein weitaus komplexeres Netzwerk [101]. So besitzt zum Beispiel BNIP3 zwar ebenfalls eine BH3-Domäne, scheint aber nicht mit dieser, sondern stattdessen mit seiner Transmembrandomäne an BCL2 und BCL2L1 zu binden und auf diese Weise inhibiert zu werden. Außerdem wurde gezeigt, dass eine Deletion der Transmembrandomäne, nicht aber der BH3-Domäne die Apoptose-Induktion durch BNIP3 inhibieren kann [102], was darauf zurückgeführt werden konnte, dass sich BNIP3 nicht wie viele andere „BH3-only“-Proteine lediglich in die Membran integriert, sondern darüberhinaus einen Ionenkanal ausbildet [103]. Weiterhin gibt es Hinweise, dass durch BNIP3 nicht nur eine Apoptose, sondern, abhängig vom Zelltyp, auch eine Nekrose oder Autophagie induziert werden kann [102]. Die Expression von BNIP3 in Tumoren spricht allerdings zum Teil gegen eine Rolle als Zelltodinitiator, da in zahlreichen Tumoren wie Mamma- oder Zervixkarzinomen eine mit fortschreitendem Tumorstadium ansteigende Expression beobachtet wurde [104]. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass BNIP3 auf Proteinebene blockiert wird (z.B. durch das in vielen Neoplasien ebenfalls verstärkt exprimierte BCL2) und die Zelle durch erhöhte Expression gegen diese Inhibierung ansteuert. Daneben wäre

aber auch denkbar, dass BNIP3 in bestimmten Situationen eine primär anti-apoptotische Funktion einnimmt. So zeigten Burton et al. kürzlich, dass im Zellkern lokalisiertes BNIP3 in die transkriptionelle Inhibierung des pro-apoptotischen AIF involviert ist und damit anti-apoptotisch wirkt. Dies würde auch erklären, warum viele der Tumore, die BNIP3 überexprimieren, eine primäre Lokalisation von BNIP3 im Zellkern aufweisen [105].

Dagegen gibt es auch Neoplasien, wie zum Beispiel Pankreas- oder Kolonkarzinome, in denen BNIP3 geringer exprimiert wird als im entsprechenden Normalgewebe. Ishida et al. zeigten in diesem Zusammenhang, dass die BNIP3-Proteine dabei vor allem diffus cytoplasmatisch oder punktuell perinukleär lokalisiert sind [106]. Ähnliches konnte auch in unseren immunhistochemischen Untersuchungen des Knochenmarks festgestellt werden: die Megakaryozyten zeigten dabei allgemein das von Ishida et al. beobachtete cytoplasmatische Muster, zusätzlich allerdings eine starke (peri)nukleäre Färbung in den Kontrollen, die in der PMF mit zunehmendem Fibrosegrad deutlich abnimmt (Abbildung 4-6).

Als Ursache für die herabregulierte Expression in verschiedenen Neoplasien konnte in vielen Fällen eine Hypermethylierung des BNIP3-Promotors ausgemacht werden [104]. Auch einige hämatopoetische Tumore und hämatopoetische Zelllinien weisen diese aberrante Methylierung in Verbindung mit einem nicht mehr detektierbaren BNIP3-Protein auf [81]. Dagegen zeigte die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte COBRA [107] in keinem der untersuchten PMF-Fälle eine Methylierung der entsprechenden Promotorsequenz (Abbildung 4-5). Dass im Rahmen des verwendeten gesamten Knochenmarks der Anteil an neoplastischen Zellen zu gering für eine Detektion war, ist dabei unwahrscheinlich, da auf vergleichbare Weise auch die JAK2(V617F)-Mutation nachgewiesen werden kann [108]. Es scheinen in der PMF also andere Mechanismen als eine Hypermethylierung für die reduzierte BNIP3-Expression verantwortlich zu sein.

Über Datenbankabgleiche wurde vor 10 Jahren das zu 63% seiner Proteinsequenz mit BNIP3 identische BNIP3L identifiziert [109], das sich auch funktional grundsätzlich als Homolog erweist [102]. Dementsprechend zeigten die Nachmessungen von BNIP3L im Knochenmark der PMF zumindest bei einem Fibrosegrad von 2 oder 3 eine signifikant verminderte Expression (Abbildung 4-4 D).

Auch bei BNIP3 scheint der Fibrosegrad negativ mit der BNIP3-Expression korreliert zu sein. So wies nicht nur die Gruppe der PMF mf 2/3 einen, wenn auch nicht signifikant, geringeren medianen Expressionswert auf (Tabelle 4-5), auch die nachträglich untersuchten Verlaufsbiopsien ließen eine Tendenz in diese Richtung erkennen (Abbildung 4-4 C).

In dieser Hinsicht ist interessant, dass BNIP3 und BNIP3L zu den Zielgenen des durch Sauerstoffmangel aktivierten HIF1A gehören [110] und man somit argumentieren könnte, dass die mit zunehmender Fibrose einhergehende gesteigerte Angiogenese [111], also die Bildung neuer Blutgefäße, zu einer verbesserten Sauerstoffversorgung und somit zu einer geringeren Expression von BNIP3 führt. Andererseits kann man davon ausgehen, dass die charakteristische Fibrosierung um enge Megakaryozytengruppen herum die Sauerstoffzufuhr dieser Zellen deutlich vermindert. Außerdem könnte auf diese Weise nicht die verminderte BNIP3-Expression in der ET erklärt werden, da diese Entität weder eine verstärkte Angiogenese [112] noch eine Fibrose entwickelt. Es ist also durchaus wahrscheinlich, dass BNIP3 kausal in die Neoplasie von Megakaryozyten und anderen Zellreihen des Knochenmarks involviert ist.

Alle Daten des Arrays zusammenfassend, kann eindeutig keine Tendenz in eine pro- oder anti-apoptotische Richtung ausgemacht werden. Eine derartige Erwartung würde allerdings auch eine zu stark vereinfachte Sichtweise zu Grunde legen. Denn abgesehen von der Tatsache, dass die meisten Apoptosefaktoren bisher nicht ausreichend genau charakterisiert sind, muss davon ausgegangen werden, dass bedingt durch hoch verzweigte Regulierungsnetzwerke stets Gegenreaktionen ausgelöst werden, die aber nichts über die letztendlich funktional entscheidenden Tendenzen aussagen.

Nichtsdestotrotz konnte durch mehrere aberrant exprimierte Gene gezeigt werden, dass die Apoptose in Megakaryozyten der PMF zumindest teilweise dereguliert ist. Besonders betont werden muss in diesem Zusammenhang noch einmal, dass es sich hierbei erstmals um *in situ*-Daten handelt, die auch Einflüsse des „Microenvironment“ wie die Sauerstoffkonzentration oder verschiedene Cytokine nicht unberücksichtigt lassen.

### 5.3 Hypoxie und Apoptose in der megakaryozytären Zellkultur

Aufgrund der bekannten Involvierung von BNIP3 in sauerstoffabhängige Signalwege, die auch in der Megakaryopoese eine Rolle spielen, und verschiedener Studien, die sowohl pro- als auch anti-apoptotische Funktionen von BNIP3 und teils eine Überexpression, teils eine reduzierte Expression in unterschiedlichen Neoplasien beschreiben, sollten diese Zusammenhänge in der Zellkultur näher untersucht werden.

Dabei war von großem Vorteil, dass im Jahr 2000 die Etablierung einer megakaryozytären Zelllinie aus einer ursprünglichen ET publiziert wurde [113]. Wahrscheinlich handelte es sich sogar um eine PMF, da die Patientin neben einer gesteigerten Anzahl an Megakaryozyten auch vermehrte Granulozytenzahlen aufwies und eine Knochenmarkaspiration im Endstadium erfolglos blieb, was auf eine Fibrose hindeutet. Die als „SET-2“ bezeichneten Zellen sind heterozygot JAK2(V617F)-mutiert [114] und zeichnen sich durch eine spontane Reifung zu Megakaryozyten sowie durch eine Bildung von Proplättchen aus [113].

Als zweite megakaryozytäre Zelllinie wurde CMK ausgewählt, die aus einer Akuten Megakaryoblastenleukämie etabliert wurde und sich nur durch Zugabe von Thrombopoetin in reife Megakaryozyten differenzieren lässt [115]. Ebenfalls zum Einsatz kamen HeLa (Adenokarzinom der Zervix) sowie SD-1 (B-Lymphoblasten aus einer Akuten Lymphoblastenleukämie) als weitere Kontrollzelllinien.

Die hypoxischen Zellkulturbedingungen wurden mit speziellen Kunststoffboxen generiert, in denen mittels Natriumascorbat und weiterer Substanzen innerhalb von 1 h eine annähernd komplette Anoxie (0% O<sub>2</sub>) erzeugt wird, der Kohlenstoffdioxidgehalt aber konstant bei 5% bleibt [116].

Die Sauerstoffkonzentration bzw. der Sauerstoffpartialdruck ist eine der wichtigsten Determinanten des „Microenvironment“ verschiedener Gewebe und hat Auswirkungen auf die gesamte Homöostase der Zelle [117]. Der Begriff „Hypoxie“ ist dabei definiert als Sauerstoffgehalt unterhalb des atmosphärischen Wertes von ca. 20% [118]. Da aber im Menschen selbst in der Lunge nur Werte von 14% erreicht werden [119], muss grundsätzlich von einer physiologischen Hypoxie ausgegangen

werden [118]. Die zelluläre Anpassung an eine Änderung der Sauerstoffkonzentration, ob physiologisch durch Zellmigration oder pathologisch wie in der Tumorigenese, wird vor allem durch den Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktor HIF1A reguliert, der auf Proteinebene sauerstoffabhängig degradiert wird [120]. Durch HIF1A und weitere HIF können unter Hypoxie unter anderem der Energiestoffwechsel auf die Glykolyse verlagert, eine verstärkte Bildung von Blutgefäßen angeregt, die Differenzierung beeinflusst oder eine Apoptose eingeleitet werden [121].

Bei der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Anoxiebox sollte zunächst verifiziert werden, dass die durchgeführte Inkubation eine reguläre Aktivierung des HIF-Apparates hervorruft. Neben HIF1A mussten dabei auch HIF2A und HIF3A beachtet werden, da grundsätzlich nur HIF3A auf mRNA-Ebene reguliert wird [122], während HIF1A und HIF2A ausschließlich post-transkriptional durch einen spezifischen Abbau unter Normoxie bzw. eine Stabilisierung unter Hypoxie reguliert werden [121]. Genau dieses Aktivierungsmuster konnte auch in den SET-2- und CMK-Zellen nach Inkubation in der Anoxiebox festgestellt werden: allein HIF3A wurde auf mRNA-Ebene überexprimiert, während HIF1A eine deutliche Zunahme auf Proteinebene zeigte (Abbildung 4-8 A, Abbildung 4-7). Insgesamt kann die HIF-Sauerstoffsensitivität in beiden megakaryozytären Zelllinien also als regelhaft bezeichnet werden.

Als endogene Kontrolle der RT-qPCR-Analysen im Rahmen der Zellkultur wurde erneut POLR2A eingesetzt, da sich dessen  $C_T$ -Werte durch die anoxischen Bedingungen nicht änderten (Daten nicht gezeigt) und somit eine konstante Expression nachgewiesen werden konnte.

Bezüglich BNIP3 wurde zunächst die Expressionsstärke in Bezug auf POLR2A berechnet. Interessanterweise wies SET-2 hierbei im Vergleich zu CMK eine fast um den Faktor 4 geringere Menge an BNIP3-mRNA auf (Abbildung 4-8 B). Dies könnte prinzipiell eine aberrante Reduktion von BNIP3 in der ET (oder der PMF), wie sie zuvor auch in den mikrodisssezierten Megakaryozyten *in situ* nachgewiesen worden war, widerspiegeln, die in den Megakaryoblasten der AML nicht oder zumindest nicht in diesem Maße auftritt.

Der Vergleich von normoxischer und anoxischer Expression zeigt dagegen, dass die BNIP3-Expression in SET-2 deutlich stärker induziert wurde als in CMK

(Abbildung 4-8 C). Bestätigt wurde dieser Unterschied auch durch eine Inkubation unter 1 mM Cobaltchlorid (Abbildung 4-8 C), einem oft als Hypoxie-Analogen eingesetzten HIF1A-Induktor [123], der durch kompetitive Bindung eine Degradation verhindert [124]. Mit dieser stärkeren Induktion von BNIP3 unter Anoxie glich sich der normoxische Expressionsunterschied wieder aus, so dass die BNIP3-Level von SET-2 und CMK unter Anoxie auf einem Niveau waren.

Um die Überexpression der BNIP3-mRNA in SET-2 in Relation zu anderen HIF1A-Zielgenen setzen zu können, wurde zusätzlich die mRNA-Expression des „klassischen“ HIF1A-Zielgens VEGFA gemessen (Abbildung 4-8 D). Hierbei zeigte sich, dass ein Faktor von 30 oder 40 wie im Fall von BNIP3 keinesfalls die Regel ist. Man kann also davon ausgehen, dass die in der PMF beobachtete verminderte Expression von BNIP3 nicht durch eine in irgendeiner Form gestörte HIF1A-Induktion verursacht wird, da sich BNIP3 in SET-2 als stark induzierbar erwies und unter den extremen Bedingungen der Anoxie sogar die ursprünglich verminderte Expression wieder ausgeglichen werden konnte.

Den Beweis, dass BNIP3 dabei auch tatsächlich durch HIF1A induziert wurde, lieferten Experimente mit HIF1A-spezifischer siRNA. Hierbei musste zunächst festgestellt werden, dass sich die Suspensionskulturen SET-2 und CMK nicht liposomal transfizieren ließen. Obwohl der Hersteller des Transfektionsreagenzes ausdrücklich eine Eignung für Suspensionszellen bescheinigt [125], zeigten sich praktisch keine Unterschiede zwischen mit HIF1A-siRNA und der Negativkontroll-siRNA behandelten SET-2- oder CMK-Zellen, während in adhärennten HeLa-Zellen eine sehr hohe Transfektionseffizienz beobachtet werden konnte (Abbildung 4-9 A). Auch in der Literatur scheint die Meinung vorzuherrschen, dass eine Elektroporation für Suspensionszellen geeigneter ist [126]. Dementsprechend war es nach mehreren Optimierungsschritten per Elektroporation möglich, auch in SET-2 und CMK-Zellen eine zwar nicht sonderlich hohe, aber doch deutliche Reduktion der HIF1A-mRNA zu erreichen (Abbildung 4-9 C). Wie erwartet wurde der Gehalt an BNIP3-mRNA dadurch unter Normoxie nicht (oder nur sehr gering) beeinflusst (Abbildung 4-9 D), da das HIF1A-Protein unter diesen Bedingungen sehr schnell abgebaut werden soll und somit keinen (oder nur einen sehr geringen) Einfluss auf die Synthese von BNIP3-mRNA hat. Dagegen konnten unter Anoxie sowohl in SET-2 als auch in CMK Reduktionen der BNIP3-mRNA

festgestellt werden, die annähernd der jeweiligen Reduktion der HIF1A-mRNA entsprachen und nicht geringer als in HeLa ausfielen (Abbildung 4-9 E). Somit konnte also festgestellt werden, dass die Induktion der BNIP3-Transkription durch HIF1A in den megakaryozytären Zelllinien regelhaft verläuft.

Die Untersuchung von weiteren Mitgliedern der BCL2-Familie zeigte unter Anoxie erstaunlicherweise eine Herabregulierung in allen Fällen (Abbildung 4-8 E). Nur BCL2 in SD-1-Zellen wurde tendenziell stärker exprimiert. Keiner der vier Faktoren ist als Zielgen von HIF1A bekannt, was natürlich eine Regulation durch zwischengeschaltete Signaltransduktoren nicht ausschließt. Nichtsdestotrotz ist eine derart gleichgerichtete Veränderung der mRNA-Expression auf den ersten Blick erstaunlich, da BCL2 und BCL2L1 anti-apoptotisch wirken, während BAX und BID pro-apoptotische Funktionen innerhalb des intrinsischen Apoptoseweges übernehmen. Man könnte spekulieren, dass BAX und BID herabreguliert werden, da sie aufgrund einer Apoptoseinduktion durch BNIP3 nicht mehr benötigt werden und dass sich die verminderte Expression von BCL2 sowie BCL2L1 durch eine für eine ausreichende BNIP3-Aktivität notwendige Reduktion der BNIP3-Hemmung durch BCL2 und BCL2L1 erklärt. Insbesondere letzterer Punkt scheint hierbei im Mittelpunkt zu stehen, da die mit Abstand deutlichsten Expressionsänderungen bei BCL2 zu finden sind, dessen Expressionswert nach 72 h Anoxie um mehr als das Zehnfache abgesunken ist. In Übereinstimmung hiermit konnte eine inverse Korrelation von BNIP3 und BCL2 (auf Proteinebene) auch in Lungenkarzinomen nachgewiesen werden [127].

Die in den einzelnen RT-qPCR-Analysen gemessenen Werte der BCL2-Familie konnten auch per LDA bestätigt werden. Hierbei handelte es sich nicht um das speziell angefertigte Layout des PMF-Screenings, sondern um einen vom Hersteller konzipierten Apoptose-LDA. Da POLR2A nicht auf diesem LDA vertreten ist, wurde 18S als endogene Kontrolle gewählt. Interessanterweise umfassten die nach 24 h Anoxie als verändert exprimiert identifizierten Gene dabei jeweils mehrere Mitglieder von drei Proteinfamilien (Abbildung 4-8 F). So zeigten die in der REL-Domäne homologen NFKB2, NFKBIZ, REL und RELB eine Anoxie-induzierte Expressionssteigerung. Eine eindeutige Rolle in der Apoptose ist für diese Familie allerdings noch nicht geklärt [128]. Dagegen werden BIRC1, -3 und -5 als anti-apoptotisch beschrieben [129]. Interessant ist in dieser Hinsicht, dass nur das



auch als Survivin bekannte BIRC5 eine Herabregulierung aufweist, während die anderen beiden Faktoren unter Anoxie deutlich überexprimiert werden. Das in zahlreichen Studien untersuchte Survivin gilt als eines der Tumor-spezifischsten Moleküle und dient als Ansatzpunkt mehrerer neuer Antitumorthérapien [129]. Darüber hinaus zeigten sich zwei weitere BCL2-Familienmitglieder, nämlich die pro-apoptotischen „BH3-only“ BIK und BBC3 als überexprimiert und stehen damit im Gegensatz zu den ebenfalls pro-apoptotischen BAX und BID. Insgesamt gesehen zeigt sich an den Ergebnissen dieser LDA-Analyse wie bereits bei den Daten des PMF-Screenings, dass keine eindeutige Tendenz bezüglich pro- und anti-apoptotischer Faktoren ausgemacht werden kann.

Auch eine mögliche Expressionsänderung von CLU, APAF1, FLI1, PRKCB1 und PECAM1, also weiterer Gene, die sich auf dem LDA als interessant erwiesen hatten, wurde untersucht. Dabei zeigten sich allerdings insbesondere in SET-2 keine nennenswerten Änderungen (Abbildung 4-8 G). Es ist also unwahrscheinlich, dass die aberrante Expression dieser Gene in der PMF auf veränderte Sauerstoffwerte zurückzuführen ist.

Aufgrund der von der Entfernung zum nächsten Sinusoid abhängigen Sauerstoffkonzentrationen im Knochenmark wird schon länger spekuliert, dass die mit der Megakaryopoese einhergehende Wanderung zum Sinusoid zumindest zum Teil von Sauerstoff-abhängigen Faktoren reguliert wird. Mostafa et al. verglichen in diesem Rahmen *in vitro* differenzierte Megakaryozyten gesunder Spender unter 5% und 20% O<sub>2</sub> und zeigten dabei unter Normoxie höhere Differenzierungs- und Apoptoseraten sowie eine verstärkte Ausbildung von Proplättchen [130]. In einer späteren Studie konnten darüber hinaus höhere Expressionslevel der megakaryopoetischen Differenzierungsmarker CD41 und MPL unter Normoxie nachgewiesen werden [131]. Bei unseren Untersuchungen von CD41, MPL und dem weiteren Differenzierungsmarker CD9 zeigte insbesondere die CMK-Zelllinie nach 72 h Anoxie deutlich niedrigere Expressionswerte von CD41 und MPL als unter Normoxie (Abbildung 4-8 H). Dagegen wies SET-2 eine sehr starke Hochregulierung von CD9 auf, während in CMK praktisch keine Unterschiede in der CD9-Expression festgestellt werden konnten. Insgesamt ergibt sich so ein Bild, das CMK mit einer eher geringeren Differenzierung unter Anoxie darstellt, während SET-2, zumindest CD9 betreffend, einer zunehmenden Differenzierung im Vergleich zur Normoxie

unterworfen zu sein scheint. Diese Sichtweise bestätigte sich prinzipiell auch in den Messungen der Apoptoseraten per ELISA: SET-2 zeigte eine signifikant erhöhte Apoptoserate nach 24 h Anoxie, während bei CMK aufgrund der interexperimentell insgesamt stark schwankenden Ergebnisse keine eindeutige Aussage getroffen werden konnte (Abbildung 4-10 A). Insofern könnte man argumentieren, dass ET- bzw. PMF-Megakaryozyten, also der Ursprung der SET-2-Zelllinie, im Gegensatz zu den Beobachtungen von Mostafa et al. bei reduziertem und nicht bei erhöhtem Sauerstoffgehalt einer verstärkten Differenzierung bis hin zur Thrombopoese unterliegen.

In dieser Weise können auch die Ergebnisse der FACS-Analyse interpretiert werden: die mittleren Zellgrößen sind mit großer Wahrscheinlichkeit Proplättchenartigen Abschnürungen zuzuschreiben, da dieser Bereich bei den CMK-Zellen, die nur unter Zugabe von Thrombopoetin Proplättchen abschnüren [115], fast überhaupt nicht vertreten ist (Abbildung 4-12). Bei den SET-2-Zellen erhöht sich der relative Anteil dieser Zellen unter Anoxie hingegen um fast 50%. Allerdings bleibt fraglich, wie die sehr kleinen Partikel, die auch bei den CMK-Zellen beobachtet werden konnten, und deren Abnahme unter Anoxie sowohl bei SET-2 als auch bei CMK gedeutet werden müssen.

Im Rahmen der ELISA-Analysen muss beachtet werden, dass jeweils die gleichen Volumina an Zellsuspensionen eingesetzt wurden, obwohl sich die Zellzahlen während der Anoxie-Inkubation verringerten. Der Grund dafür lag darin, dass es wegen der stark heterogenen Morphologie insbesondere der SET-2-Zellen nicht möglich war, per Zählkammer konsistente Werte zu ermitteln. Zudem ist nicht offensichtlich, ob apoptotische Zellen zwar im ELISA detektiert, aber aufgrund der stark veränderten Morphologie und der reduzierten Zellgröße in der Zählkammer übersehen werden. Der Hersteller des ELISA macht hierzu leider keine Angaben; in den beiliegenden Protokollen werden stets die gleichen Volumina eingesetzt (wobei die Apoptose-induzierende Inkubation allerdings auch nur für 4 h angesetzt wird) [132]. Insgesamt wurde es also als sinnvoller angesehen, die gleichen Volumina an Zellsuspensionen einzusetzen und eventuelle Einschränkungen im Nachhinein zu diskutieren. Denn durch die Annahme eines konstanten RNA-Gehaltes pro Zelle und einen Vergleich der während der RNA-Isolation gemessenen RNA-Konzentrationen konnte der Rückgang der Zellzahlen auf Werte zwischen 12%

(HeLa) und 35% (SET-2) bestimmt werden (Abbildung 4-10 B). Folglich wäre es möglich, dass die tatsächlichen Apoptoseraten unter Anoxie höher sind als die gemessenen, was aber das wichtigste Ergebnis, nämlich die deutliche Zunahme der Apoptose im Fall der SET-2-Zellen nur noch deutlicher werden ließe.

Ob BNIP3 aufgrund seiner starken mRNA-Induktion unter Anoxie bei dieser verstärkten Apoptose eine entscheidende Rolle spielt, sollte durch Transfektion mit BNIP3-siRNA untersucht werden. Dabei konnte in SET-2 allerdings keine signifikant veränderte Apoptoserate unter BNIP3-siRNA festgestellt werden (Abbildung 4-10 C), wogegen in HeLa-Zellen ein signifikanter Rückgang der Apoptose um 10% nachgewiesen wurde (Abbildung 4-10 D). Wahrscheinlich ist diese Tatsache hauptsächlich auf die geringere Reduktion der BNIP3-mRNA in den SET-2-Zellen zurückzuführen, die nicht ausreicht, um die durch die Anoxie bedingte Überexpression soweit zurückzudrängen, dass eine Apoptose verhindert werden kann. In HeLa war dieses dagegen durch die deutlich stärkere siRNA-induzierte Reduktion der BNIP3-mRNA anscheinend in 10% der Zellen möglich.

Darüber hinaus sollten die durch BNIP3-siRNA induzierten Änderungen auf mRNA-Ebene untersucht werden. Hierfür wurde auf mRNA aus HeLa-Zellen zurückgegriffen, da aufgrund der hohen Transfektionseffizienz davon ausgegangen werden konnte, dass Expressionsänderungen hier am ehesten messbar sein würden. In der Tat zeigten sich recht wenige Unterschiede zwischen BNIP3-siRNA und Negativkontroll-siRNA, darunter am deutlichsten BNIP3 selbst, zudem BCL2L1 mit einer Reduktion auf fast ein Drittel und RIPK2 mit einer Steigerung um fast das Dreifache (Abbildung 4-9 G). Da BCL2L1 anti-apoptotische und RIPK2 pro-apoptotische [133] Funktionen besitzt, könnte man diese Expressionsänderungen als Reaktion der Zelle auf den BNIP3-Rückgang interpretieren. Die interessante Korrelation zwischen BNIP3- und BCL2L1-Expression konnte allerdings in SET-2-Zellen nicht bestätigt werden.

Erst kürzlich wurde BNIP3 auch als inhibierender Transkriptionsfaktor beschrieben, der die Expression des pro-apoptotischen AIF hemmt [105]. Unsere Untersuchungen in SET-2 zeigten allerdings eindeutig keinen derartigen Zusammenhang (Abbildung 4-9 H), was mit der Tatsache in Zusammenhang stehen könnte, dass die nukleäre BNIP3-Lokalisation in der PMF deutlich schwächer ausgeprägt war als in den Kontrollen (Abbildung 4-6).

Insgesamt gesehen zeigen die vorliegenden Ergebnisse hauptsächlich die Komplexität der pathologischen Vorgänge innerhalb der PMF, decken aber keine für die Neoplasie ursächlichen Aberrationen auf. Allerdings konnte durch die LDA-Analyse *in situ* gezeigt werden, dass die Apoptose in Megakaryozyten der PMF an mehreren Punkten dereguliert ist. Hierdurch ließe sich die aberrante Morphologie der Megakaryozyten und auch ein passiver Efflux fibrogener Cytokine erklären. Die nähere Untersuchung von BNIP3 in Abhängigkeit der Sauerstoffkonzentration lieferte zudem Hinweise auf eine pro-apoptotische Wirkung dieses in der PMF so deutlich vermindert exprimierten Faktors, da zum Einen die Zunahme der Apoptoseraten unter Anoxie mit einem sehr deutlichen Anstieg der BNIP3-mRNA-Expression einherging und zum Anderen die für eine anti-apoptotische Funktion wichtige AIF-Induktion durch BNIP3 in SET-2-Zellen nicht vorlag. Darüber hinaus konnten eine Hypermethylierung des BNIP3-Promotors und eine aberrante Induktion durch HIF1A als mögliche Ursachen für die verminderte BNIP3-Expression in der PMF als unwahrscheinlich eingestuft werden.

# ABKÜRZUNGEN

18S	18S ribosomal RNA
28S	28S ribosomal RNA
AATF	apoptosis antagonizing transcription factor
AIF	apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated, 1
APAF1	apoptotic peptidase activating factor 1
BAD	BCL2-associated agonist of cell death
BAX	BCL2-associated X protein
BBC3	BCL2 binding component 3
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
BCL2L1	= BCLX; BCL2-like 1
BCL2L11	= BAM = BIM; BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)
BCL3	B-cell CLL/lymphoma 3
BCR-ABL	Fusionsprotein breakpoint cluster region - c-abl oncogene 1
BFGF	fibroblast growth factor 2 (basic)
BH3	BH3 interacting domain death agonist
BID	BH3 interacting domain death agonist
BIK	BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)
BIRC1	= NAIP; NLR family, apoptosis inhibitory protein
BIRC2	baculoviral IAP (inhibitor of apoptosis) repeat-containing 2
BIRC3	baculoviral IAP (inhibitor of apoptosis) repeat-containing 3
BIRC5	baculoviral IAP (inhibitor of apoptosis) repeat-containing 5
BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3
BNIP3L	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like
bp	Basenpaare
CARD6	caspase recruitment domain family member 6
CASP14	caspase (cysteinyll aspartate proteinase) 14
CASP3	caspase (cysteinyll aspartate proteinase) 3
CASP6	caspase (cysteinyll aspartate proteinase) 6

CASP9	caspase (cysteinyl aspartate proteinase) 9
CCD	charge coupled device
CD41	cluster of differentiation 41 = integrin alpha 2b (platelet glycoprotein IIb of IIb/IIIa complex)
CD9	cluster of differentiation 9
cDNA	copy DNA
CLU	clusterin
CMK	Zelllinie; DSMZ # ACC 392
CML	Chronische Myeloische Leukämie
COBRA	combined bisulfite restriction analysis
C <sub>T</sub>	threshold cycle
DAPK1	death-associated protein kinase 1
DEDD	death effector domain containing
DIABLO	diablo homolog (Drosophila)
DICER1	dicer 1, ribonuclease type III
DMS	demarcation membrane system
DNA	deoxyribonucleic acid
DNASE2	deoxyribonuclease II, lysosomal
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dT	Desoxyribose enthaltendes Thymin-Nukleotid
E2F1	E2F transcription factor 1
E2F2	E2F transcription factor 2
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ET	Essentielle Thrombozythämie
ETS1	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 (avian)
FACS	fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FAM	6-FAM-phosphoramidit (Fluoreszenzfarbstoff)
FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)
FFPE	Formalin-fixiert und Paraffin-eingebettet
FLI1	Friend leukemia virus integration 1
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GATA1	GATA binding protein 1 (globin transcription factor 1)
GUSB	glucuronidase beta
HeLa	Zelllinie; DSMZ # ACC 57
HIF1A	hypoxia inducible factor 1, alpha subunit
HIF2A	endothelial PAS domain protein 1
HIF3A	hypoxia inducible factor 3, alpha subunit
HRK	harakiri BCL2 interacting protein (contains only BH3 domain)
HRP	horseradish peroxidase
HSC	hämatopoetische Stammzelle
IL3	interleukin 3 (colony-stimulating factor, multiple)
JAK2	Janus-Kinase 2
KK	Kolonkarzinom
KM	Knochenmark
LDA	Low Density Array
LIF	leukemia inhibitory factor
LTA	lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)
MaK	Mammakarzinom
mf	Myelofibrosegred
MGB	minor groove binder
MK	Megakaryozyt
MPL	myeloproliferative leukemia virus oncogene
MPN	myeloproliferative Neoplasien
mRNA	messenger RNA
MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
N	Chromosomensätze
Neg.kontr.	Negativkontrolle
NFE2	nuclear factor (erythroid-derived 2)
NFKB1	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
NFKB2	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2
NFKBIZ	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor zeta
nt	Nukleotide
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)

PDGF	platelet derived growth factor
PECAM1	= CD31; platelet/endothelial cell adhesion molecule
PEN	Polyethylenphthalat
Ph <sup>-</sup>	Philadelphia-Chromosom-negativ
PLK1	polo-like kinase 1
PMF	Primäre Myelofibrose
POLR2A	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A
PRKCB1	protein kinase C, beta
PV	Polycythaemia vera
qPCR	quantitative „real-time“-PCR
REL	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog
RELB	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B
RIPK2	receptor-interacting serine-threonine kinase 2
RNA	ribonucleic acid
RP-PCR	PCR with random hexamers as primers
RT-qPCR	quantitative „real-time“-PCR nach reverser Transkription
SCIN	scinderin
SD-1	Zelllinie; DSMZ # ACC 366
SET-2	Zelllinie; DSMZ # ACC 608
siRNA	small interfering RNA
SIVA	SIVA1, apoptosis-inducing factor
SMAD3	SMAD family member 3
SNP	single nucleotide polymorphism
SOCS3	suppressor of cytokine signaling 3
STAT1	signal transducer and activator of transcription 1
T7	T7 Bakteriophage
TERT	telomerase reverse transcriptase
TGFB1	= TGFB; transforming growth factor beta 1
TLR4	toll-like receptor 4
TNF	tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)
TNFSF10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
TP53	tumor protein p53
TP73	tumor protein p73



TPO	Thrombopoetin
TRADD	TNFRSF1A-associated via death domain
TUBB1	tubulin beta 1
UV	ultraviolett
V617F	Aminosäuretausch Valin gegen Phenylalanin an Position 617
VEGFA	vascular endothelial growth factor A
W515L/K	Aminosäuretausch Tryptophan gegen Leucin/Lysin an Position 515
WHO	world health organization / Weltgesundheitsorganisation
wt	Wildtyp

# LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Vande Berg BC, Malghem J, Lecouvet FE, Maldague B. Magnetic resonance imaging of normal bone marrow. *Eur Radiol.* 1998;8:1327-34.
- [2] Travlos GS. Normal structure, function, and histology of the bone marrow. *Toxicol Pathol.* 2006;34:548-65.
- [3] Szalai G, LaRue AC, Watson DK. Molecular mechanisms of megakaryopoiesis. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63:2460-76.
- [4] Lordier L, Jalil A, Aurade F, Larbret F, Larghero J, Debili N, Vainchenker W, Chang Y. Megakaryocyte endomitosis is a failure of late cytokinesis related to defects in the contractile ring and Rho/Rock signaling. *Blood.* 2008;112:3164-74.
- [5] Schulze H, Shivdasani RA. Mechanisms of thrombopoiesis. *J Thromb Haemost.* 2005;3:1717-24.
- [6] Levin J. The Evolution of Mammalian Platelets. In *Platelets*. Michelson A D. 2002. 3-22.
- [7] Pang L, Weiss MJ, Poncz M. Megakaryocyte biology and related disorders. *J Clin Invest.* 2005;115:3332-8.
- [8] Savage DC. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol.* 1977;31:107-33.
- [9] Battinelli EM, Hartwig JH, Italiano JEJ. Delivering new insight into the biology of megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Curr Opin Hematol.* 2007;14:419-26.
- [10] Enver T, Heyworth CM, Dexter TM. Do stem cells play dice? *Blood.* 1998;92:348-51; discussion 352.
- [11] Adolfsson J, Månsson R, Buza-Vidas N, Hultquist A, Liuba K, Jensen CT, Bryder D, Yang L, Borge O, Thoren LAM et al. Identification of Flt3<sup>+</sup> lymphomyeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell.* 2005;121:295-306.
- [12] Kaushansky K. Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Blood.* 2008;111:981-6.

- [13] Kaushansky K. Thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. *Blood*. 1995;86:419-31.
- [14] Kaushansky K. Lineage-specific hematopoietic growth factors. *N Engl J Med*. 2006;354:2034-45.
- [15] Wright J H. Die Entstehung der Blutplättchen. *Virchows Arch*. 1906;186:55-63.
- [16] Junt T, Schulze H, Chen Z, Massberg S, Goerge T, Krueger A, Wagner DD, Graf T, Italiano JEJ, Shivdasani RA et al. Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science*. 2007;317:1767-70.
- [17] Jin Z, El-Deiry WS. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther*. 2005;4:139-63.
- [18] Reed JC. Bcl-2-family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects. *Blood*. 2008;111:3322-30.
- [19] Kaluzhny Y, Ravid K. Role of apoptotic processes in platelet biogenesis. *Acta Haematol*. 2004;111:67-77.
- [20] De Botton S, Sabri S, Daugas E, Zermati Y, Guidotti JE, Hermine O, Kroemer G, Vainchenker W, Debili N. Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes. *Blood*. 2002;100:1310-7.
- [21] Clarke MCH, Savill J, Jones DB, Noble BS, Brown SB. Compartmentalized megakaryocyte death generates functional platelets committed to caspase-independent death. *J Cell Biol*. 2003;160:577-87.
- [22] Leeksma CH, Cohen JA. Determination of the life of human blood platelets using labelled diisopropylfluorophosphate. *Nature*. 1955;175:552-3.
- [23] Gordge MP. Megakaryocyte apoptosis: sorting out the signals. *Br J Pharmacol*. 2005;145:271-3.
- [24] Sanz C, Benet I, Richard C, Badia B, Andreu EJ, Prosper F, Fernández-Luna JL. Antiapoptotic protein Bcl-x(L) is up-regulated during megakaryocytic differentiation of CD34(+) progenitors but is absent from senescent megakaryocytes. *Exp Hematol*. 2001;29:728-35.
- [25] Kaluzhny Y, Yu G, Sun S, Toselli PA, Nieswandt B, Jackson CW, Ravid K. BclxL overexpression in megakaryocytes leads to impaired platelet fragmentation. *Blood*. 2002;100:1670-8.

- [26] Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN. Robbins Basic Pathology 8th edition. Saunders 2007.
- [27] Boveri TH. Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. G. Fischer 1914.
- [28] Ribbert H. Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. Die Naturwissenschaften. 1914;28:676-679.
- [29] Dalerba P, Cho RW, Clarke MF. Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med.* 2007;58:267-84.
- [30] Fábíán A, Barok M, Vereb G, Szöllosi J. Die hard: are cancer stem cells the Bruce Willises of tumor biology? *Cytometry A.* 2009;75:67-74.
- [31] Hansemann D. Ueber asymmetrische Zelltheilung in Epithelkrebsen und deren biologische Bedeutung *Virchows Archiv.* 1890;119:299-326.
- [32] Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition. World Health Orgn. 2008.
- [33] Nowell P C. A Minute Chromosome in Human Chronic Granulocytic Leukemia *Science.* 1960;132:1497.
- [34] Druker BJ. Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. *Blood.* 2008;112:4808-17.
- [35] Zhao R, Xing S, Li Z, Fu X, Li Q, Krantz SB, Zhao ZJ. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. *J Biol Chem.* 2005;280:22788-92.
- [36] Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJP, Boggon TJ, Wlodarska I, Clark JJ, Moore S et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell.* 2005;7:387-97.
- [37] Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo S, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med.* 2005;352:1779-90.
- [38] James C, Ugo V, Le Couédic J, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garçon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature.* 2005;434:1144-8.
- [39] Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet.* 2005;365:1054-61.

- [40] Steensma DP. JAK2 V617F in myeloid disorders: molecular diagnostic techniques and their clinical utility: a paper from the 2005 William Beaumont Hospital Symposium on Molecular Pathology. *J Mol Diagn.* 2006;8:397-411; quiz 526.
- [41] Scott LM, Campbell PJ, Baxter EJ, Todd T, Stephens P, Ekins S, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA, Green AR. The V617F JAK2 mutation is uncommon in cancers and in myeloid malignancies other than the classic myeloproliferative disorders. *Blood.* 2005;106:2920-1.
- [42] Levine RL, Loriaux M, Huntly BJP, Loh ML, Beran M, Stoffregen E, Berger R, Clark JJ, Willis SG, Nguyen KT et al. The JAK2V617F activating mutation occurs in chronic myelomonocytic leukemia and acute myeloid leukemia, but not in acute lymphoblastic leukemia or chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2005;106:3377-9.
- [43] Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Pardanani A, Tefferi A. Clinical correlates of JAK2V617F presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: a critical reappraisal. *Leukemia.* 2008;22:1299-307.
- [44] Lee T, Ma W, Zhang X, Giles F, Kantarjian H, Albitar M. Mechanisms of constitutive activation of Janus kinase 2-V617F revealed at the atomic level through molecular dynamics simulations. *Cancer.* 2009;115:1692-700.
- [45] Koppikar P, Levine RL. JAK2 and MPL mutations in myeloproliferative neoplasms. *Acta Haematol.* 2008;119:218-25.
- [46] Campbell PJ. Somatic and germline genetics at the JAK2 locus. *Nat Genet.* 2009;41:385-6.
- [47] Cervantes F, Passamonti F, Barosi G. Life expectancy and prognostic factors in the classic BCR/ABL-negative myeloproliferative disorders. *Leukemia.* 2008;22:905-14.
- [48] Thiele J, Kvasnicka HM, Facchetti F, Franco V, van der Walt J, Orazi A. European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. *Haematologica.* 2005;90:1128-32.
- [49] Thiele J, Kvasnicka HM. Grade of bone marrow fibrosis is associated with relevant hematological findings-a clinicopathological study on 865 patients with chronic idiopathic myelofibrosis. *Ann Hematol.* 2006;85:226-32.

- [50] Le Bousse-Kerdilès MC, Martyré MC. Involvement of the fibrogenic cytokines, TGF-beta and bFGF, in the pathogenesis of idiopathic myelofibrosis. *Pathol Biol (Paris)*. 2001;49:153-7.
- [51] Kvasnicka HM, Thiele J. Classification of Ph-negative chronic myeloproliferative disorders--morphology as the yardstick of classification. *Pathobiology*. 2007;74:63-71.
- [52] Rollison DE, Howlader N, Smith MT, Strom SS, Merritt WD, Ries LA, Edwards BK, List AF. Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States, 2001-2004, using data from the NAACCR and SEER programs. *Blood*. 2008;112:45-52.
- [53] Abdel-Wahab OI, Levine RL. Primary myelofibrosis: update on definition, pathogenesis, and treatment. *Annu Rev Med*. 2009;60:233-45.
- [54] Tefferi A, Gilliland DG. Oncogenes in myeloproliferative disorders. *Cell Cycle*. 2007;6:550-66.
- [55] Reilly JT. Cytogenetic and molecular genetic abnormalities in agnogenic myeloid metaplasia. *Semin Oncol*. 2005;32:359-64.
- [56] Fourouclas N, Li J, Gilby DC, Campbell PJ, Beer PA, Boyd EM, Goodeve AC, Bareford D, Harrison CN, Reilly JT et al. Methylation of the suppressor of cytokine signaling 3 gene (SOCS3) in myeloproliferative disorders. *Haematologica*. 2008;93:1635-44.
- [57] Kralovics R, Teo S, Buser AS, Brutsche M, Tiedt R, Tichelli A, Passamonti F, Pietra D, Cazzola M, Skoda RC. Altered gene expression in myeloproliferative disorders correlates with activation of signaling by the V617F mutation of Jak2. *Blood*. 2005;106:3374-6.
- [58] Jones LC, Tefferi A, Vuong PT, Desmond JC, Hofmann W, Koeffler HP. Detection of aberrant gene expression in CD34+ hematopoietic stem cells from patients with agnogenic myeloid metaplasia using oligonucleotide microarrays. *Stem Cells*. 2005;23:631-7.
- [59] Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell*. 2007;128:635-8.
- [60] Ioannidis JPA. Is molecular profiling ready for use in clinical decision making? *Oncologist*. 2007;12:301-11.

- [61] Liang P, Pardee AB. Analysing differential gene expression in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:869-76.
- [62] VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques*. 2008;44:619-26.
- [63] Bustin SA, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin Sci (Lond)*. 2005;109:365-79.
- [64] Morrison T, Hurley J, Garcia J, Yoder K, Katz A, Roberts D, Cho J, Kanigan T, Ilyin SE, Horowitz D et al. Nanoliter high throughput quantitative PCR. *Nucleic Acids Res*. 2006;34:e123.
- [65] Shchors K, Evan G. Tumor angiogenesis: cause or consequence of cancer? *Cancer Res*. 2007;67:7059-61.
- [66] Brady G. Expression profiling of single mammalian cells--small is beautiful. *Yeast*. 2000;17:211-7.
- [67] Leiva IM, Emmert-Buck MR, Gillespie JW. Handling of clinical tissue specimens for molecular profiling studies. *Curr Issues Mol Biol*. 2003;5:27-35.
- [68] Lehmann U, Kreipe H. Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies. *Methods*. 2001;25:409-18.
- [69] Lehmann U, Bock O, Glöckner S, Kreipe H. Quantitative molecular analysis of laser-microdissected paraffin-embedded human tissues. *Pathobiology*. 2000;68:202-8.
- [70] Taylor TB, Nambiar PR, Raja R, Cheung E, Rosenberg DW, Anderegg B. Microgenomics: Identification of new expression profiles via small and single-cell sample analyses. *Cytometry A*. 2004;59:254-61.
- [71] Fend F, Raffeld M. Laser capture microdissection in pathology. *J Clin Pathol*. 2000;53:666-72.
- [72] Roozmond RC. Ultramicrochemical determination of nucleic acids in individual cells using the Zeiss UMSP-I microspectrophotometer. Application to isolated rat hepatocytes of different ploidy classes. *Histochem J*. 1976;8:625-38.
- [73] Peccoud J, Jacob C. Theoretical uncertainty of measurements using quantitative polymerase chain reaction. *Biophys J*. 1996;71:101-8.
- [74] [www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)

- [75] Van Gelder RN, von Zastrow ME, Yool A, Dement WC, Barchas JD, Eberwine JH. Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:1663-7.
- [76] Livesey FJ. Strategies for microarray analysis of limiting amounts of RNA. *Brief Funct Genomic Proteomic*. 2003;2:31-6.
- [77] Nygaard V, Hovig E. Options available for profiling small samples: a review of sample amplification technology when combined with microarray profiling. *Nucleic Acids Res*. 2006;34:996-1014.
- [78] Gilbert I, Scantland S, Dufort I, Gordynska O, Labbe A, Sirard M, Robert C. Real-time monitoring of aRNA production during T7 amplification to prevent the loss of sample representation during microarray hybridization sample preparation. *Nucleic Acids Res*. 2009;37:e65.
- [79] Peng HZ, Isaacson PG, Diss TC, Pan LX. Multiple PCR analyses on trace amounts of DNA extracted from fresh and paraffin wax embedded tissues after random hexamer primer PCR amplification. *J Clin Pathol*. 1994;47:605-8.
- [80] Bock O, Neuse J, Hussein K, Brakensiek K, Buesche G, Buhr T, Wiese B, Kreipe H. Aberrant collagenase expression in chronic idiopathic myelofibrosis is related to the stage of disease but not to the JAK2 mutation status. *Am J Pathol*. 2006;169:471-81.
- [81] Murai M, Toyota M, Satoh A, Suzuki H, Akino K, Mita H, Sasaki Y, Ishida T, Shen L, Garcia-Manero G et al. Aberrant DNA methylation associated with silencing BNIP3 gene expression in haematopoietic tumours. *Br J Cancer*. 2005;92:1165-72.
- [82] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods*. 2001;25:402-8.
- [83] Olson BJSC, Markwell J. Assays for determination of protein concentration. *Curr Protoc Protein Sci*. 2007;Chapter 3:Unit 3.4.
- [84] [www.systembio.com](http://www.systembio.com)
- [85] [www.amp-tec.com](http://www.amp-tec.com)
- [86] Chong HC, Tan MJ, Philippe V, Tan SH, Tan CK, Ku CW, Goh YY, Wahli W, Michalik L, Tan NS. Regulation of epithelial-mesenchymal IL-1 signaling by PPARbeta/delta is essential for skin homeostasis and wound healing. *J Cell Biol*. 2009;184:817-31.



- [87] Steg A, Wang W, Blanquicett C, Grunda JM, Eltoum IA, Wang K, Buchsbaum DJ, Vickers SM, Russo S, Diasio RB et al. Multiple gene expression analyses in paraffin-embedded tissues by TaqMan low-density array: Application to hedgehog and Wnt pathway analysis in ovarian endometrioid adenocarcinoma. *J Mol Diagn.* 2006;8:76-83.
- [88] Radonić A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;313:856-62.
- [89] Jones KL, Hughan SC, Dopheide SM, Farndale RW, Jackson SP, Jackson DE. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 is a negative regulator of platelet-collagen interactions. *Blood.* 2001;98:1456-63.
- [90] Wu Y, Welte T, Michaud M, Madri JA. PECAM-1: a multifaceted regulator of megakaryocytopoiesis. *Blood.* 2007;110:851-9.
- [91] Gao C, Sun W, Christofidou-Solomidou M, Sawada M, Newman DK, Bergom C, Albelda SM, Matsuyama S, Newman PJ. PECAM-1 functions as a specific and potent inhibitor of mitochondrial-dependent apoptosis. *Blood.* 2003;102:169-79.
- [92] Schwer HD, Lecine P, Tiwari S, Italiano JEJ, Hartwig JH, Shivdasani RA. A lineage-restricted and divergent beta-tubulin isoform is essential for the biogenesis, structure and function of blood platelets. *Curr Biol.* 2001;11:579-86.
- [93] Lecine P, Italiano JEJ, Kim SW, Villeval JL, Shivdasani RA. Hematopoietic-specific beta 1 tubulin participates in a pathway of platelet biogenesis dependent on the transcription factor NF-E2. *Blood.* 2000;96:1366-73.
- [94] Bock O, Hussein K, Brakensiek K, Buhr T, Schlué J, Wiese B, Kreipe H. The suppressor of cytokine signalling-1 (SOCS-1) gene is overexpressed in Philadelphia chromosome negative chronic myeloproliferative disorders. *Leuk Res.* 2007;31:799-803.
- [95] Pinton P, Rimessi A, Marchi S, Orsini F, Migliaccio E, Giorgio M, Contursi C, Minucci S, Mantovani F, Wieckowski MR et al. Protein kinase C beta and prolyl isomerase 1 regulate mitochondrial effects of the life-span determinant p66Shc. *Science.* 2007;315:659-63.
- [96] Ma S, Rosen ST. Enzastaurin. *Curr Opin Oncol.* 2007;19:590-5.
- [97] Denecker G, Ovaere P, Vandenabeele P, Declercq W. Caspase-14 reveals its secrets. *J Cell Biol.* 2008;180:451-8.

- [98] Raslova H, Kauffmann A, Sekkai D, Ripoche H, Larbret F, Robert T, Le Roux DT, Kroemer G, Debili N, Dessen P et al. Interrelation between polyploidization and megakaryocyte differentiation: a gene profiling approach. *Blood*. 2007;109:3225-34.
- [99] Tenedini E, Fagioli ME, Vianelli N, Tazzari PL, Ricci F, Tagliafico E, Ricci P, Gugliotta L, Martinelli G, Tura S et al. Gene expression profiling of normal and malignant CD34-derived megakaryocytic cells. *Blood*. 2004;104:3126-35.
- [100] Letai AG. Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis. *Nat Rev Cancer*. 2008;8:121-32.
- [101] Hossini AM, Eberle J. Apoptosis induction by Bcl-2 proteins independent of the BH3 domain. *Biochem Pharmacol*. 2008;76:1612-9.
- [102] Burton TR, Gibson SB. The role of Bcl-2 family member BNIP3 in cell death and disease: NIPping at the heels of cell death. *Cell Death Differ*. 2009;16:515-23.
- [103] Bocharov EV, Pustovalova YE, Pavlov KV, Volynsky PE, Goncharuk MV, Ermolyuk YS, Karpunin DV, Schulga AA, Kirpichnikov MP, Efremov RG et al. Unique dimeric structure of BNIP3 transmembrane domain suggests membrane permeabilization as a cell death trigger. *J Biol Chem*. 2007;282:16256-66.
- [104] Mellor HR, Harris AL. The role of the hypoxia-inducible BH3-only proteins BNIP3 and BNIP3L in cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2007;26:553-66.
- [105] Burton TR, Eisenstat DD, Gibson SB. BNIP3 (Bcl-2 19 kDa interacting protein) acts as transcriptional repressor of apoptosis-inducing factor expression preventing cell death in human malignant gliomas. *J Neurosci*. 2009;29:4189-99.
- [106] Ishida M, Sunamura M, Furukawa T, Akada M, Fujimura H, Shibuya E, Egawa S, Unno M, Horii A. Elucidation of the relationship of BNIP3 expression to gemcitabine chemosensitivity and prognosis. *World J Gastroenterol*. 2007;13:4593-7.
- [107] Xiong Z, Laird PW. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res*. 1997;25:2532-4.
- [108] Bock O, Büsche G, Koop C, Schröter S, Buhr T, Kreipe H. Detection of the single hotspot mutation in the JH2 pseudokinase domain of Janus kinase 2 in bone marrow trephine biopsies derived from chronic myeloproliferative disorders. *J Mol Diagn*. 2006;8:170-7.

- [109] Yasuda M, Han JW, Dionne CA, Boyd JM, Chinnadurai G. BNIP3alpha: a human homolog of mitochondrial proapoptotic protein BNIP3. *Cancer Res.* 1999;59:533-7.
- [110] Rocha S. Gene regulation under low oxygen: holding your breath for transcription. *Trends Biochem Sci.* 2007;32:389-97.
- [111] Mesa RA, Hanson CA, Rajkumar SV, Schroeder G, Tefferi A. Evaluation and clinical correlations of bone marrow angiogenesis in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood.* 2000;96:3374-80.
- [112] Boveri E, Passamonti F, Rumi E, Pietra D, Elena C, Arcaini L, Pascutto C, Castello A, Cazzola M, Magrini U et al. Bone marrow microvessel density in chronic myeloproliferative disorders: a study of 115 patients with clinicopathological and molecular correlations. *Br J Haematol.* 2008;140:162-8.
- [113] Uozumi K, Otsuka M, Ohno N, Moriyama T, Suzuki S, Shimotakahara S, Matsumura I, Hanada S, Arima T. Establishment and characterization of a new human megakaryoblastic cell line (SET-2) that spontaneously matures to megakaryocytes and produces platelet-like particles. *Leukemia.* 2000;14:142-52.
- [114] Quentmeier H, MacLeod RAF, Zaborski M, Drexler HG. JAK2 V617F tyrosine kinase mutation in cell lines derived from myeloproliferative disorders. *Leukemia.* 2006;20:471-6.
- [115] Saito H. Megakaryocytic cell lines. *Baillieres Clin Haematol.* 1997;10:47-63.
- [116] Kamiya T, Kwon AH, Kanemaki T, Matsui Y, Uetsuji S, Okumura T, Kamiyama Y. A simplified model of hypoxic injury in primary cultured rat hepatocytes. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1998;34:131-7.
- [117] Semenza GL. HIF-1, O(2), and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell.* 2001;107:1-3.
- [118] Bosco MC, Puppo M, Blengio F, Fraone T, Cappello P, Giovarelli M, Varesio L. Monocytes and dendritic cells in a hypoxic environment: Spotlights on chemotaxis and migration. *Immunobiology.* 2008;213:733-49.
- [119] Bedogni B, Powell MB. Hypoxia, melanocytes and melanoma - survival and tumor development in the permissive microenvironment of the skin. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2009;22:166-74.
- [120] Rankin EB, Giaccia AJ. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death Differ.* 2008;15:678-85.

- [121] Löfstedt T, Fredlund E, Holmquist-Mengelbier L, Pietras A, Ovenberger M, Poellinger L, Pählman S. Hypoxia inducible factor-2alpha in cancer. *Cell Cycle*. 2007;6:919-26.
- [122] Heidbreder M, Fröhlich F, Jöhren O, Dendorfer A, Qadri F, Dominiak P. Hypoxia rapidly activates HIF-3alpha mRNA expression. *FASEB J*. 2003;17:1541-3.
- [123] Wang GL, Semenza GL. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:4304-8.
- [124] Yuan Y, Hilliard G, Ferguson T, Millhorn DE. Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor-alpha and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor-alpha. *J Biol Chem*. 2003;278:15911-6.
- [125] [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)
- [126] Tyner JW, Walters DK, Willis SG, Luttrupp M, Oost J, Loriaux M, Erickson H, Corbin AS, O'Hare T, Heinrich MC et al. RNAi screening of the tyrosine kinome identifies therapeutic targets in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008;111:2238-45.
- [127] Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sowter HM, Sivridis E, Gibson S, Gatter KC, Harris AL. BNIP3 expression is linked with hypoxia-regulated protein expression and with poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2004;10:5566-71.
- [128] Perkins ND. The Rel/NF-kappa B family: friend and foe. *Trends Biochem Sci*. 2000;25:434-40.
- [129] Altieri DC. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. *Nat Rev Cancer*. 2008;8:61-70.
- [130] Mostafa SS, Miller WM, Papoutsakis ET. Oxygen tension influences the differentiation, maturation and apoptosis of human megakaryocytes. *Br J Haematol*. 2000;111:879-89.
- [131] Mostafa SS, Papoutsakis ET, Miller WM. Oxygen tension modulates the expression of cytokine receptors, transcription factors, and lineage-specific markers in cultured human megakaryocytes. *Exp Hematol*. 2001;29:873-83.
- [132] [www.roche.com](http://www.roche.com)
- [133] McCarthy JV, Ni J, Dixit VM. RIP2 is a novel NF-kappaB-activating and cell death-inducing kinase. *J Biol Chem*. 1998;273:16968-75.

# DANKSAGUNG

Ich danke insbesondere Prof. Dr. med. Bock und Prof. Dr. med. Kreipe für die Überlassung der DFG-geförderten Arbeit, für die Bereitstellung weiterer Mittel und für die Gelegenheit, meine Ergebnisse zu publizieren.

Zudem danke ich Prof. Dr. rer. nat. Jacobsen und Prof. Dr. rer. nat. Ngezahayo für die Übernahme des Korreferats bzw. des Prüfungsvorsitzes.

Als nächstes möchte ich mich bei allen Labormitarbeitern für die Beantwortung vieler Fragen und die technische Unterstützung bedanken, ganz besonders auch bei Sabine, Anna-Lena und Henriette.

Daniel, Cord und Michaela, meinen Doktorandenkollegen, danke ich für die gemeinsame Aufrechterhaltung naturwissenschaftlicher Werte unter Medizinern.

Für die sehr gute und produktive Zusammenarbeit möchte ich mich außerdem ganz herzlich bei Kais bedanken.

Auch Julia, Dina, Friedrich und Marlene, den Medizindoktoranden, die ich in die Geheimnisse der Präamplifikation und/oder der Low Density Arrays einweihen durfte, danke ich für vorbildliches Zuhören.

Für die FACS-Analyse am heißesten Abend des Jahres und im heißesten Labor des Instituts möchte ich mich außerdem bei Till, Matthias und Elisa bedanken.

Zu besonderem Dank verpflichtet bin ich darüber hinaus auch den Instituten für Molekularpathologie und für Molekularbiologie der MHH für die Benutzung des Agilent Bioanalyzers, einer speziellen Zentrifuge und des Elektroporationsgerätes.

# LEBENS LAUF

## Promotion

12.2006 – 11.2009      Institut für Pathologie, Medizinische Hochschule Hannover

## Studium

seit 04.2007              wirtschaftswissenschaftlicher Zusatzstudiengang für  
Naturwissenschaftler und Ingenieure,  
Fern-Universität Hagen,  
Abschluss Diplom-Wirtschaftsbiologie voraussichtlich 2010

10.2004 – 11.2006      Master-Studiengang „Life Science“,  
Leibniz Universität Hannover,  
Abschluss Master of Science M.Sc. (Note: ausgezeichnet)

10.2001 – 09.2004      Bachelor-Studiengang „Molekulare Biotechnologie“,  
Universität zu Lübeck,  
Abschluss Bachelor of Science B.Sc. (Note: 1,5)

## Schule

08.1992 – 07.2001      Lauenburgische Gelehrtenschule, Ratzeburg,  
Abschluss Abitur (Note: 1,7)

# PUBLIKATIONEN

**Die in dieser Dissertation präsentierten Ergebnisse sind zum Teil ebenfalls veröffentlicht in:**

**Theophile K**, Jonigk D, Kreipe H, Bock O. Amplification of mRNA from laser-microdissected single or clustered cells in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues for application in quantitative real-time PCR. *Diagn Mol Pathol*. 2008;17:101-6.

**Theophile K**, Hussein K, Kreipe H, Bock O. Expression profiling of apoptosis-related genes in megakaryocytes: BNIP3 is downregulated in primary myelofibrosis. *Exp Hematol* 2008;36:1728-38.

## **Weitere Publikationen:**

Pätzold R, Keuntje M, **Theophile K**, Müller J, Mielcarek E, Ngezahayo A, Anders-von Ahlften A. In situ mapping of nitrifiers and anammox bacteria in microbial aggregates by means of confocal resonance Raman microscopy. *J Microbiol Methods*. 2008;72:241-8.

**Theophile K**, Buesche G, Kreipe H, Bock O. The expression levels of telomerase catalytic subunit hTERT and oncogenic MYC in essential thrombocythemia are affected by the molecular subtype. *Ann Hematol* 2008;87:263-8.

Bock O, Höftmann J, **Theophile K**, Hussein K, Wiese B, Schlué J, Kreipe H. Bone morphogenetic proteins are overexpressed in the bone marrow of primary myelofibrosis and are apparently induced by fibrogenic cytokines. *Am J Pathol* 2008;172:951-60.

Hussein K, Bock O, **Theophile K**, Seegers A, Arps H, Basten O, Grips KH, Franz-Werner J, Büsche G, Kreipe H. Chronic myeloproliferative diseases with concurrent BCR-ABL junction and JAK2V617F mutation. *Leukemia* 2008;22:1059-62.

Hussein K, Bock O, **Theophile K**, Schlue J, Ballmaier M, Kröger N, Göhring G, Büsche G, Kreipe H. Biclonal expansion and heterogeneous lineage involvement in a case of chronic myeloproliferative disease with concurrent MPLW515L/JAK2V617F mutation. *Blood*. 2009;113:1391-2.

Hussein K, Bock O, **Theophile K**, Schulz-Bischof K, Porwit A, Schlue J, Jonigk D, Kreipe H. MPLW515L mutation in acute megakaryoblastic leukaemia. *Leukemia*. 2009;23:852-5.

Hussein K, **Theophile K**, Buhr T, Beller A, Kreipe H, Bock O. Different lineage involvement in myelodysplastic/myeloproliferative disease with combined MPLW515L and JAK2V617F mutation. *Br J Haematol*. 2009;145:673-5.

Bock O, Muth M, **Theophile K**, Winter M, Hussein K, Büsche G, Kröger N, Kreipe H. Identification of new target molecules PTK2, TGFBR2 and CD9 overexpressed during advanced bone marrow remodelling in primary myelofibrosis. *Br J Haematol*. 2009;146:510-20.

#### **Poster (nur Erstautorin):**

**Theophile K**, Hussein K, Kreipe H, Bock O. Array-basierte Expressionsanalyse von Apoptose-assoziierten Genen in Megakaryozyten der Primären Myelofibrose. 92. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, Berlin 2008.

**Theophile K**, Muth M, Hussein K, Kreipe H, Bock O. Hypoxie und Apoptose in megakaryozytären Zelllinien. 93. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, Freiburg 2009.

#### **Vorträge (nur Erstautorin/Vortragende)**

**Theophile K**, Hussein K, Dralle W, Kreipe H, Bock O. Array-basierte Expressionsanalyse von microRNA in Megakaryozyten der Primären Myelofibrose, Essentiellen Thrombozythämie und normalen Hämatopoese. 92. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, Berlin 2008.



# ERKLÄRUNG

Hierdurch erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie gegebenenfalls die zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe.

Die Dissertation wurde nicht schon als Masterarbeit, Diplomarbeit oder andere Prüfungsarbeit verwendet.

Katharina Theophile