

**Morphologische und molekulare Analysen  
zur Deskription pathologischer Prinzipien der Fibrose-Entwicklung  
am Beispiel 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

Diplom-Biologin Michaela Muth

geboren am 03.05.1984 in Peine

**2011**

Referent: Prof. Dr. med. O. Bock

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. A. Ngezahayo

Tag der Promotion: 10.02.2011

## **Kurzzusammenfassung**

Biologisch ist der Heilungsprozess von Gewebe durch Regeneration oder bindegewebigem Ersatz fundamental und überlebenswichtig. Unkontrollierte Vermehrungen der kollagenen Fasern und anderer Komponenten der Extrazellulären Matrix (ECM) in einem Gewebeareal bzw. in einem Organ lassen sich morphologisch oder chemisch quantitativ erfassen und werden als Fibrose bezeichnet. Eine gestörte Balance zwischen Synthese und Degradation von Kollagenen und ECM führt zu einer erhöhten (Myo-)Fibroblastenaktivität und einer übermäßiger Akkumulation von ECM. Die genauen Mechanismen, die zur Entstehung einer Fibrose führen, sind zurzeit unbekannt. Die Fibrose steht dabei für ein pathologisches Merkmal, welches keinem Gewebe oder Organ spezifisch zugeordnet werden kann.

Die Primäre Myelofibrose (PMF) gehört zu der Gruppe der Myeloproliferativen Neoplasien (MPN) und ist unter anderem durch die autonome Proliferation der Granulopoese und Megakaryopoese im Knochenmark charakterisiert. Der Reichtum der Megakaryozyten an pro-fibrotischen Zytokinen und die reaktive Proliferation bzw. Aktivierung von Fibroblasten machen die PMF zu einer außergewöhnlich interessanten Modellerkrankung für die Fibrose, so dass die PMF und das Knochenmark die Grundlage für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit bildet.

Durchgeführte Genexpressionsanalysen resultierten in der Identifizierung mehrere signifikant überexprimierter Gene, die in die Fibrose-Entwicklung involviert sind. Immunhistochemische Untersuchungen und die Etablierung der Fluoreszenz-Doppel-Färbung am Knochenmark bestätigten die Überexpression und lokalisierten die Proteine. Mittels Fokussierung in die z-Ebene konnte das feinmaschige Netz der Proplättchenformationen im Knochenmark visualisiert, analysiert und mit MPNs ohne Fibrose verglichen werden. Die Untersuchung der PMF auf molekularer und morphologischer Ebene deckte ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren, die in die Entstehung einer Fibrose involviert sind, auf.

**Schlagwörter:** Fibrose, Primäre Myelofibrose, Megakaryozyten

## **Abstract**

Biologically the healing process of apoptotic or necrotic tissue is fundamental and of vital importance. Unregulated progeny of collagen fibres and other components of the extracellular matrix (ECM) in tissue areas respectively in organs can be seen morphologically or detected chemically and is referred to as fibrosis. An imbalance of synthesis and degradation of collagen and ECM can be the leading causes for an increased activity of (myo-)fibroblasts and immoderate accumulation of ECM. The exact mechanisms underlying fibrosis are currently not fully understood. Fibrosis is a pathological characteristic that can be assigned to no tissue or organ specifically.

Primary myelofibrosis (PMF) is a kind of myeloproliferative neoplasms and hallmarked by autonomous proliferation of granulopoiesis and megakaryopoiesis in the bone marrow. Due to the affluence of the megacaryocytes in pro-fibrotic cytokines and the respective reactive proliferation the activation of fibroblasts, PMF is an extraordinarily model disease for fibrosis and are the basis for this study.

Gene expression analyses resulted in several significantly overexpressed genes involved in the development of fibrosis. Immunohistochemistry and the establishment of double-immunofluorescence staining at bone marrow samples confirmed the overexpression and located the proteins. Due to focusing into the z-dimension the dendritic processes of the proplatelet formation could be visualized in the bone marrow, analyzed and differed from non-fibrosing MPNs. The examination of PMF on molecular and morphological basis resulted in an interaction of multiple factors, which are involved in the origin of fibrosis.

**Keywords:** fibrosis, primary myelofibrosis, megakaryocytes

## Inhaltsverzeichnis

Kurzzusammenfassung .....	3
Abstract .....	4
Inhaltsverzeichnis .....	5
Abbildungsverzeichnis .....	7
Abkürzungsverzeichnis .....	8
1. Einleitung .....	10
1.1. Fibrose .....	10
1.1.1. Extrazelluläre Matrix (ECM) .....	10
1.1.2. Definition der Fibrose .....	10
1.1.3. Pathogenese der Fibrose .....	11
1.1.4. Erkrankungen und Fibrose .....	14
1.1.4.1. Leberzirrhose .....	14
1.1.4.2. Interstitielle Lungenfibrose .....	15
1.1.4.3. Niereninsuffizienz .....	15
1.1.4.4. Kardiomyopathie .....	15
1.1.4.5. Transplantatnephropathie .....	16
1.1.5. Therapie .....	16
1.2. Primäre Myelofibrose .....	17
1.2.1. Neoplasien .....	17
1.2.2. Myeloproliferative Neoplasien .....	18
1.2.3. Primäre Myelofibrose .....	20
1.2.4. Pathomechanismen in der Fibrosebildung .....	21
1.3. Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit .....	23
2. Ergebnisse .....	24
2.1. Bock, O., Muth, M. <i>et al.</i> .....	24
2.2. Muth, M. <i>et al.</i> .....	25
2.3. Muth, M. <i>et al.</i> .....	26
3. Diskussion .....	27
3.1. Transforming growth factor beta Typ II Rezeptor (TGFBRII) .....	28
3.2. Focal adhesion kinase (FAK) .....	30
3.3. Motility-Related Protein-1 (CD9) .....	32
3.4. Proplättchenformation .....	33

3.5. Thrombospondin (TSP) .....	35
4. Zusammenfassung .....	38
5. Schlussfolgerungen .....	40
6. Anhang: Manuskripte.....	41
7. Literaturverzeichnis .....	96
Danksagung .....	111
Lebenslauf .....	112
Publikationsliste .....	113
Erklärung .....	114

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Wundheilung: Regeneration oder Fibrose (verändert nach [4]).....	14
Abbildung 2: TGF- $\beta$ - bzw. BMP-Smad-Signalkaskade (verändert nach [120]).....	29

**Abkürzungsverzeichnis**

ALK	Aktivin-ähnliche Kinase
AML	Akute Myeloische Leukämie
Arg132	Punktmutation im IDH 1-Gen
Arg172	Punktmutation im IDH 2-Gen
BCR-ABL	Fusionsprotein breakpoint cluster region - c-abl oncogene 1
BMP	bone morphogenetic protein
CD9	motility-related protein-1
CD34	Nachweis von Gefäßen
CD42b	Glycoprotein Ib, alpha polypeptide
CD47	Integrin assoziiertes Protein
CD68	Nachweis von Makrophagen
CD105	Endoglin
CLSM	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
CMML	Chronische myelomonozytäre Leukämie
DMS	demarcation membrane system
ECM	Extrazelluläre Matrix
EPO	Erythropoietin
ET	Essentielle Thrombozythämie
FAK	Focal Adhesion Kinase
FFPE	Formalin-fixiert und Paraffin-eingebettet
FGF	Fibroblast growth factor
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor
GM-CSF	granulocyte-macrophage-colony stimulating factor
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
IDH	Isocitratdehydrogenase
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IPF	Idiopathische Interstitielle Pneumonie
JAK	Janus Kinase
LDA	Low-Density-Array
mf	Myelofibrosegrad



MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MPL	Myeloproliferative leukemia virus oncogene
MPN	Myeloproliferative Neoplasie
n	Chromosomensätze
PDGF	platelet derived growth factor
Ph <sup>-</sup>	Philadelphia-Chromosom-negativ
Ph <sup>+</sup>	Philadelphia-Chromosom-positiv
PMF	Primäre Myelofibrose
PTK2	Protein Tyrosine Kinase 2 (entspricht FAK)
PV	Polycythaemia Vera
RGD-Sequenz	Aminosäureabfolge Arginin-Glycin-Aspartat
Smad	Signalmediatoren
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TF	Transkriptionsfaktoren
TGF- $\alpha$	transforming growth factor alpha
TGF- $\beta$	transforming growth factor beta
TGFBRII	transforming growth factor beta Typ II Rezeptor
TIMP	tissue inhibitor of matrix metalloproteinase
TPO	Thrombopoietin
TSP	Thrombospondin
V617F	Aminosäuretausch Valin gegen Phenylalanin an Position 617
VEGF	vascular endothelial growth factor
W515L/K	Aminosäuretausch Tryptophan gegen Leucin/Lysin an Position 515
WHO	world health organisation

## **1. Einleitung**

### **1.1. Fibrose**

#### **1.1.1. Extrazelluläre Matrix (ECM)**

Ein Drittel des gesamten Eiweißes des menschlichen Körpers besteht aus Bindegewebe. Aufgebaut ist die ECM als ein komplexes Netzwerk aus Kollagenen und elastischen Fasern, die einander in einer Grundsubstanz durchflechten [1]. Die ECM dient Knorpeln, Knochen und Sehnen als Anheftungsstruktur; sie ist außerdem an dem Aufbau aller parenchymatösen Organe beteiligt. Zwischen Blutgefäßen und Organen eingelagert, spielt das Bindegewebe eine wesentliche Rolle beim Stofftransport zwischen Zellen und dem extrazellulären Raum. Die ECM ist nicht statisch, sondern wird als Fließgleichgewicht begriffen. Dabei handelt es sich um ein offenes System, bei dem die Gleichgewichtskonzentrationen der einzelnen Stoffe durch Transportvorgänge bestimmt werden. Zusätzlich wird durch die Bindung an die Komponenten der ECM mittels Zellrezeptoren die Expression von Genen in ansässigen Zellen reguliert und infolgedessen unter anderem die Zellmigration oder die Zellproliferation beeinflusst. Eine pathologische Veränderung der ECM entsteht durch verschiedene schädliche Einwirkungen auf das interstitielle Bindegewebe [2, 3].

#### **1.1.2. Definition der Fibrose**

Als Fibrose wird die atypische Vermehrung der kollagenen Fasern und anderer Komponenten der ECM in einem Gewebeareal oder in einem Organ bezeichnet. Erfassen lassen sich die fibrogenen pathologischen Veränderungen morphologisch mittels konventioneller Mikroskopie oder chemisch quantitativ durch die Bestimmung der Aminosäuren Hydroxyprolin und Hydroxylysin. Diese kommen nahezu ausschließlich im Kollagen vor, so dass deren Menge ein Maßstab für den Kollagengehalt ist. Fibrose ist kein eigenständiges Krankheitsbild, sondern ein pathologischer Prozess, bei dem der Anteil von Bindegewebe pro Organ beziehungsweise Gewebeareal steigt. Eine Neubildung von Kollagen erfolgt unter anderem bei inflammatorischen Prozessen, die den Untergang bei nekrotischen Gewebeuntergängen immer begleiten. Die Fasern bleiben als Narbe zurück und ersetzen zum Beispiel untergegangene Myokardzellen nach Infarkt des Herzens. Diese narbigen Veränderungen können im fortgeschrittenen Stadium zur

Einschränkung der jeweiligen Organfunktionen führen. Die Fibrose ist irreversibel und stellt das Endstadium eines Regenerationsprozesses dar [3, 4].

Im Allgemeinen wird zwischen primärer und sekundärer Fibrose unterschieden. Die Ursache der Veränderung liegt dieser Einteilung zugrunde. Eine primäre Fibrose entsteht in dem jeweiligen Gewebe ohne erkennbare äußere Schädigung. Eine sekundäre Fibrose bildet sich durch eine exogene oder endogene Noxe. Innerhalb des geschädigten Gewebeverbandes werden Fibroblasten aktiviert, die vermehrt interstitielles Bindegewebe bilden. Im interstitiellen Bindegewebe verlaufen Blutgefäße, Lymphgefäße und Nerven eines Organs, so dass durch die Fibrose die Funktionalität stark beeinträchtigt oder zerstört sein kann [5, 6]. So schränkt nicht allein ein Narbenareal die Funktion eines Organes ein, sondern auch interstitiell abgelagerte ECM-Komponenten.

### **1.1.3. Pathogenese der Fibrose**

Der Fibrose liegt eine Dysfunktion der Wundheilung zugrunde. Biologisch ist der Heilungsprozess von zerstörtem oder nekrotischem Gewebe fundamental und überlebenswichtig. Eine Wunde ist definiert als ein Defekt der normalen anatomischen Struktur und Funktion [7]. Sie wird in drei bis fünf ineinander übergreifende Phasen eingeteilt, wobei die erste und die zweite, sowie die vierte und fünfte Phase häufig zusammengefasst werden. Unterteilt wird dabei in die Latenzphase, die Exsudationsphase, die Proliferationsphase, die Regenerationsphase und die Maturation [8-10]. Abbildung 1 zeigt den Prozess der Wundheilung mit den wesentlichen Dysfunktionen, die zur Entwicklung einer Fibrose führen. Beginnend mit der Verletzung setzen eine Koagulation und eine Hämostase ein, um zum Beispiel ein zerstörtes Blutgefäß zu verschließen. Ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Endothelzellen, Thrombozyten, der Koagulation und der Fibrinolyse reguliert die Hämostase [9, 11]. Durch den Kontakt des Blutes mit Kollagenen und anderen Bestandteilen der ECM werden Gerinnungsfaktoren sezerniert und die Ausbildung des Thrombus, bestehend aus unter anderem Fibronectin, Fibrin, Vitronectin und Thrombospondin, ausgelöst [12]. Das Zytoplasma der Thrombozyten enthält viele Wachstumsfaktoren (platelet derived growth factor, PDGF; transforming growth factor, TGF- $\beta$ ) und Zytokine, die in der weiteren Kaskade neutrophile Granulozyten, Makrophagen, Endothelzellen und Fibroblasten aktivieren [9, 13].

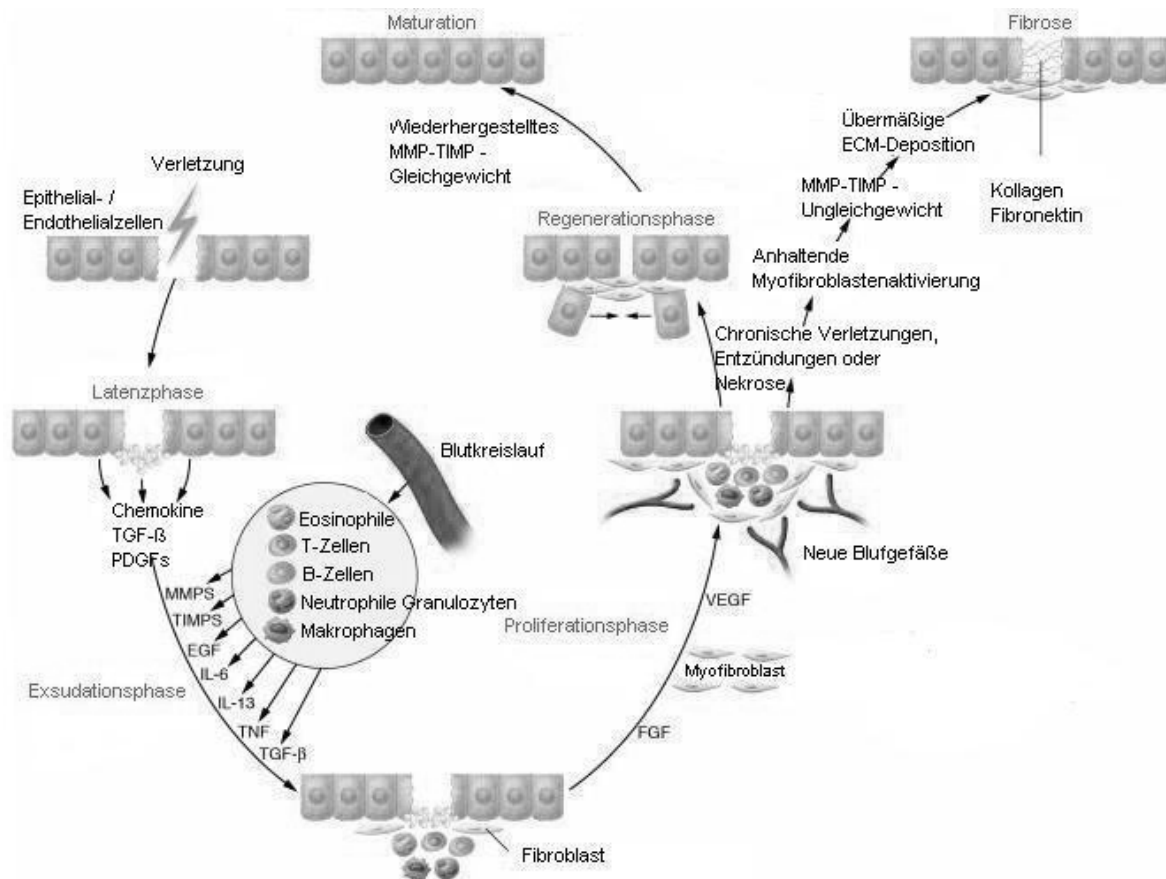
Die Exsudations- oder auch Inflammationsphase unterteilt sich in eine frühe und in eine späte Phase. Hauptfunktion ist die Infiltration der Wunde durch neutrophile Granulozyten, um eine Infektion zu verhindern [8]. Die phagozytäre Aktivität ist entscheidend für die Wundheilung, da Wunden mit bakterieller Verunreinigung nicht bzw. schlecht heilen. Innerhalb von 24-36 Stunden nach der Verletzung kommt es zu einer Infiltration der neutrophilen Granulozyten durch die TGF- $\beta$ -Stimulation mittels Zytokinen [14, 15]. 48-72 Stunden nach der Verletzung infiltrieren Makrophagen die Wunde und phagozytierten die apoptotischen neutrophilen Granulozyten. Zusätzlich werden abgestorbene Wundränder und Fibringerinnsel phagozytiert [14, 16, 17]. Die Infiltration durch Makrophagen aktiviert Fibroblasten, Endothelzellen und Kreatinozyten [18-21]. Durch die Aktivierung von Interleukinen (IL) infiltrieren Lymphozyten nach 72 Stunden die Wunde. IL spielen eine wesentliche Rolle in der späteren Kollagenaseregulation zum Aufbau von Kollagen und ECM [14, 16, 17].

Die Proliferationsphase beginnt am dritten Tag nach der Verletzung und dauert ca. 2 Wochen an. Charakterisiert ist diese Phase durch die Fibroblastenmigration und die Synthese neuer ECM-Komponenten anstelle des Netzes aus Fibrin und Fibronectin [16, 19]. Innerhalb der ersten 3 Tage proliferieren die Fibroblasten und Myofibroblasten im angrenzenden Gewebe und wandern am dritten Tag durch chemotaktische Stimulation von TGF- $\beta$  und PDGF in die Wunde ein [21]. Dort proliferieren sie und produzieren Hyaluron, Fibronectin, Proteoglykan und die Prokollagen-Typen I und III [22]. Am Ende der ersten Woche verändern sich die Fibroblasten zu Myofibroblasten und heften sich durch Pseudopodien an das Fibronectin und das Kollagen der ECM an. Mittels Kontraktion werden die Wundränder zusammengeführt [22, 23]. Anschließend gehen die Fibroblasten durch Apoptose zugrunde [24]. Die Fibroblasten synthetisieren Kollagene, die besonders in der Proliferations- und der späteren Regenerationsphase von Bedeutung sind. Sie dienen der intrazellulären Matrix als Grundlage [25, 26]. Bei einer Hautwunde besteht die Dermis aus bis zu 80% aus Kollagen-Typ I und bis zu 25% aus Kollagen-Typ III, wohingegen Granulationsgewebe 40% des Kollagen-Typs III beinhaltet [7]. Die Ansiedelung neuer Blutgefäße ist ein kritischer Punkt und findet während allen Phasen der Wundheilung statt. In der Exsudationsphase kommt es nicht nur zur Infiltration von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, sondern zahlreiche angiogene Faktoren stimulieren die Angiogenese [27]. Fibroblast growth factor (FGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor alpha

(TGF- $\alpha$ ) und TGF- $\beta$  stehen in einer Balance mit inhibierenden Faktoren wie Angiostatin und Steroiden. Unter Hypoxie, wie sie auch im verletzten Gewebe auftritt, werden Wachstumsfaktoren sezerniert, so dass die Proliferation und das Wachstum der Endothelien stimuliert werden [28, 29]. Innerhalb einiger Tage wandern KapillargefäÙe aus dem umgebenden Gewebe in die Wunde ein und es entsteht ein mikrovaskuläres Netz aus neuen Kapillaren [7]. Zelluläre Motilität erfolgt durch Vorwölbung, Adhäsion des Zytoskeletts am Untergrund mittels Integrinen und Traktion des Zytoplasmas. Der Körper beginnt im Bereich der Wunde neue Zellen, BlutgefäÙe und Bindegewebe zu bilden [30].

Während der Regenerationsphase formt der Körper neues Epithel und Narbengewebe. Die Synthese von ECM erfolgt parallel mit der Entwicklung des Granulationsgewebes. Die Phase der Wundheilung kann insgesamt 1 bis 2 Jahre dauern [21, 22]. Eine feine Balance zwischen Abbau und Synthese erlaubt einen normalen Heilungsprozess [20, 25]. Die neu produzierten Kollagenfasern reifen aus; die Wunde wird reiÙfest und es entsteht eine Narbe. Die Kollagenfasern können bis zu 80% der ursprünglichen Stärke im Vergleich mit unverletztem Gewebe erreichen [20, 25, 26]. Neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Fibroblasten produzieren unter anderem Matrix-Metalloproteinasen (MMP), die für den Abbau von Kollagenen in der Wunde verantwortlich sind. Inhibierende Faktoren (tissue inhibitor of matrix metalloproteinasen (TIMPs)) setzen die Aktivität der MMPs herab, so dass es zu einer Akkumulation neuer ECM kommt [26, 31, 32]. Vom Rand her verschließt sich dann die Wunde infolge einer Interaktion der Fibroblasten mit der ECM. Dieser Prozess wird durch PDGF, TGF- $\beta$  und FGF reguliert [26, 33]. Während der Heilung verringert sich die Dichte der Fibroblasten und der Makrophagen durch Apoptose [24, 34]. Im Laufe der Zeit stoppt das Wachstum von Kapillaren, wodurch die Durchblutung und der metabolische Umsatz sinken. Das Resultat ist eine reife Narbe mit einer verringerten Zahl von Zellen und BlutgefäÙen [14, 35].

Pathologisch relevant wird die Wundheilung, wenn die Synthese von Kollagen über die Zeit unkontrolliert fortschreitet und kein Abbau bzw. eine suffiziente Balance zwischen Synthese und Degradation erfolgt. In diesem Fall spricht man von einer Fibrose [4]. Diese Verschiebung innerhalb der oben genannten Mechanismen führt zum Beispiel bei chronischen Verletzungen, Entzündungen oder überschieÙender Wundheilung zu einer erhöhten (Myo-)Fibroblastenaktivität und übermäßiger Akkumulation von ECM [36].



**Abbildung 1:** Wundheilung: Regeneration oder Fibrose (verändert nach [4])

#### 1.1.4. Erkrankungen und Fibrose

Wie oben beschrieben, umfasst die Fibrose ein weites Spektrum an klinischen Entitäten und entsteht entweder spontan oder als eine Folge verschiedenster pathologischer Erkrankungen. Organspezifische Fibrosen zeigen sich in der Leber, der Lunge, den Nieren oder am Herzen, sowie aus Vorerkrankungen wie Gewebeschädigungen, Entzündungsprozessen, nach Transplantation oder im Rahmen eines Tumorleidens [37, 38].

##### 1.1.4.1. Leberzirrhose

Die Ätiologie der Leberzirrhose in der westlichen Welt ist hauptsächlich der Alkoholkonsum. Diese exogene Schädigung basiert auf dem wiederholten und lang andauernden Konsum von Alkohol. In den Entwicklungsländern ist dagegen die Virushepatitis die vorherrschende Ursache für eine Leberzirrhose. Unabhängig vom Auslöser führt die Schädigung der Leber trotz des großen Regenerationspotenzials zu einer Fibrose, die das Leberparenchym zerstört und somit den weiteren Abbau von Schadstoffen be- bzw. verhindert [39, 40]. Dieser irreversible Endzustand ist

charakterisiert durch eine Kombination aus Parenchymnekrose/-apoptose, Regeneration und Bindegewebevermehrung. Bei der Regeneration kommt es zu der Ausbildung von sogenannten Pseudolobuli (Regenerationsknoten). Der sich daraus ergebene fein-, grob- oder gemischtknotige noduläre fibrotische Parenchymbau führt zu einer Zerstörung der eigentlichen azinären Struktur [5, 6].

#### **1.1.4.2. Interstitielle Lungenfibrose**

Die Bezeichnung ‚Interstitielle Lungenfibrose‘ umfasst Lungenerkrankungen, die aus einer, sich im Lungeninterstitium abspielenden, Entzündung hervorgehen. Formalpathologisch entstehen die interstitiellen Lungenfibrosen aus einer chronisch verlaufenden interstitiellen Pneumonie. Ist die Genese der Pneumonie unbekannt, wird sie als idiopathische interstitielle Pneumonie (IPF) bezeichnet. Sie stellt eine Sonderform der chronisch fibrosierenden interstitiellen Pneumonie dar, weil keine anderweitigen Organmanifestationen zu beobachten sind. Die Fibrosierung besteht aus einer Kollagenfaseranreicherung und nur selten sind mikroskopisch größere Fibroseherde zu erkennen. Diese Entzündung ist ein chronisch fortschreitender Prozess, der letztlich, zum Beispiel durch respiratorische Insuffizienz, zum Tode führt [41-44].

#### **1.1.4.3. Niereninsuffizienz**

Eine chronische Niereninsuffizienz ist definiert als eine irreversible Erkrankung der glomerulären, tubulären und endokrinen Funktionen beider Nieren. Sie tritt bei einem zunehmenden Verlust des funktionstüchtigen Nierenparenchyms auf. Diabetische Nephropathie, chronische Glomerulonephritiden, vaskuläre Nierenschäden und Glomerulosklerose sind die häufigsten Grunderkrankungen. Im Verlauf der Erkrankung kommt es als Folge der gestörten exkretorischen und inkretorischen renalen Funktion zu der Ausbildung einer Urämie. Diese Ansammlung von harnpflichtigen Substanzen in Blutbahn und Gewebe beeinträchtigt nahezu alle Organe des Körpers [45, 46]. Durch die Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren wird eine vermehrte Synthese von Matrixkomponenten induziert, so dass eine Fibrose als Reparationsprozess induziert wird [5, 6].

#### **1.1.4.4. Kardiomyopathie**

Erkrankungen des Herzmuskels, die mit einer Funktionsstörung einhergehen, werden unter dem Synonym Kardiomyopathie zusammengefasst. Die dilatative

Kardiomyopathie ist eine Erkrankung, bei der die Herzkammern und die Herzvorhöfe vergrößert sind. Gleichzeitig ist die Pumpfunktion des Herzens eingeschränkt. Die den Herzmuskel versorgenden Gefäße sind massiv verengt, wodurch der Herzmuskel nur ungenügend mit Sauerstoff versorgt werden kann. Durch die Unterversorgung kann es zu einem Herzinfarkt kommen, bei dem Teile des Herzmuskels absterben und das dabei zugrunde gegangene Gewebe durch Narbengewebe ersetzt wird. Dieser Fibrosierungsprozess des myokardialen Interstitiums hat eine Reduktion der Herzschlagkraft zur Folge. Die Myokarddurchblutung verschlechtert sich, so dass es zu einer zusätzlichen Fibrosierung des Interstitiums kommt, wodurch die Ventrikelwand dem Innendruck nicht mehr standhält und sich eine Ventrikeldilatation ausbildet [3, 5, 6].

#### **1.1.4.5. Transplantatnephropathie**

Eine chronische Transplantatnephropathie tritt im Langzeitverlauf nach einer Nierentransplantation auf und erstreckt sich über Monate bis Jahre. Histopathologisch zeigt die chronische Abstoßung eine interstitielle Fibrose, Infiltration von Entzündungszellen, tubuläre Atrophie, Glomerulosklerose und Intimafibrose mit konsekutiver Obliteration kleiner Gefäße. Durch die daraus resultierende Minderperfusion kommt es zu einem schleichenden Parenchymverlust mit progressiver interstitieller Fibrose und Tubulusatrophie [47, 48]. Mittels der Banff-Klassifikation von 2007 wird die chronische Abstoßungsreaktion nach histopathologischen Kriterien auf Grund des Ausmaßes der interstitiellen Fibrose und der Tubulusatrophie in 6 Stadien eingeteilt [49].

#### **1.1.5. Therapie**

Die im Rahmen der Fibrose bereits stattgefundenen Umbauprozesse des Gewebes sind nicht reversibel, so dass sich die Therapie nach der Grunderkrankung richtet. Ziel ist es, das weitere Fortschreiten der Fibrose zu verhindern oder ihren Verlauf zu verzögern. Medikamente wie zum Beispiel Kortikosteroide oder Immunsuppressiva hemmen das Immunsystem und die Aktivität der Bindegewebszellen [50, 51]. Bei einem Funktionsverlust des Organes besteht grundsätzlich die Möglichkeit, im Rahmen einer Transplantation das betroffene Organ durch ein Spenderorgan zu ersetzen [52].



## 1.2. Primäre Myelofibrose

### 1.2.1. Neoplasien

Als Neoplasie wird eine autonom proliferierende, vom Normalgewebe abgrenzbare Gewebemasse definiert, die von den physiologischen Regulationsmechanismen des Organismus abgekoppelt ist. Das Aussehen und die Funktion des Ursprungsgewebes können in unterschiedlichem Ausmaß „nachgeahmt“ werden. Unterschieden werden benigne und maligne Neoplasien. Benigne Tumoren sind gut differenziert, wachsen langsam, expansiv und metastasieren äußerst selten. Makroskopisch zeichnen sie sich meist durch eine Pseudokapsel aus, mikroskopisch sind keine oder nur geringe Veränderungen des zellulären Phänotyps zu erkennen.

Maligne Tumoren weisen hingegen einen niedrigen Differenzierungsgrad auf, haben ein invasiv-infiltratives Wachstum mit dem hohen Risiko der Metastastierung sowie der Neigung zu Rezidiven nach Operationen. Makroskopisch weisen maligne Neoplasien oft regressive Veränderungen auf. Mikroskopisch sind zelluläre Atypien zu sehen. Häufig ist eine Verschiebung der Kern-Plasma-Relation zugunsten der Zellkerne zu erkennen, zusätzlich sind die Zellkerne und Zellen polymorph. Polyploidie und prominente Nukleolen sind zusätzliche Malignitätskriterien [53].

Hämatologische Neoplasien leiten sich aus den Blut- oder den Blutstammzellen ab und werden in myeloische oder lymphatische Neoplasien unterteilt. Bei einer myeloischen Neoplasie sind die Megakaryozyten, Monozyten, Erythrozyten oder Granulozyten betroffen. Bei einer lymphatischen Neoplasie die T- oder B-Lymphozyten. Zudem wird zwischen einer akuten (zum Beispiel AML) bzw. chronischen (zum Beispiel CML) Form unterschieden. Eine AML ist charakterisiert durch eine hohe Proliferation und die schnelle Ausbreitung der neoplastischen Vorläuferzellen (Blasten). Bei einer chronischen Leukämie differenzieren die neoplastischen Zellen meist aus, führen aber durch erhöhte Zahl oder Dysfunktion zu Störungen der Homöostase [54, 55].

Das definitive Prinzip der Tumorentstehung ist - nach aktuellem Wissenstand - noch unklar. Gesichert ist, dass eine einzige Zelle den Ursprung der Neoplasie (Klon) darstellt. Die genetischen Veränderungen innerhalb dieser Zelle sind dabei für die maligne Transformation verantwortlich. Durch Mutationen bzw. andere Abberationen erreicht die Zelle das Potential zur unbegrenzten Proliferation. Diese Veränderungen können viele Jahre vor der klinischen Manifestation der Neoplasie auftreten und werden durch Chemikalien, Viren oder ultraviolette bzw. ionisierende Strahlung

hervorgerufen. Familiäre Dispositionen können der Entstehung genauso zugrunde liegen, wie das Lebensalter und die Ernährung. Die Tumorgenese wird durch (Proto-) Onkogene, Tumorsuppressorgene und Apoptose-regulierende Gene reguliert. Eine Dysregulation führt zu einer gesteigerten Proliferation mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit zusätzlicher Mutationen im Gewebe. Durch die Proliferation bilden sich immer aggressivere Tumorzellklone, so dass von einer klonalen Evolution gesprochen wird [53].

### **1.2.2. Myeloproliferative Neoplasien**

Unter dem Begriff Myeloproliferative Neoplasien (MPN) werden nach der WHO-Klassifikation 2008 die Knochenmarkerkrankungen Polycythaemia Vera (PV), Essentielle Thrombozythämie (ET), Primäre Myelofibrose (PMF) und Chronisch Myeloische Leukämie (CML) zusammengefasst [56]. MPNs gelten als Untergruppe der myeloischen Neoplasien, da sie auf einer gesteigerten Proliferation von blutbildenden Zellen der myeloischen Reihe beruhen. Die Abgrenzung der Entitäten voneinander ist nicht ganz trivial, da die klinischen Symptome häufig ineinander übergehen [56].

Im Jahre 1960 beschrieb Peter Nowell eine konstant auftretende Chromosomentranslokation zwischen Chromosom 9 und Chromosom 22 bei CML-Patienten. Bei dieser spezifischen Translokation brechen beide Chromosomen auf dem q-Arm und das Fusionsonkogen BCR-ABL wird exprimiert. Zytogenetische Untersuchungen zeigen ein verkürztes Chromosom 22. Die Expression dieses Philadelphia-Chromosoms führt zu einer Daueraktivierung einer Tyrosinkinase (ABL) und somit zu einer unkontrollierten Proliferation der Zelle. Ein Ansatzpunkt der pharmakologischen Forschung ist die Inhibition dieses Fusionsonkogens. Durch die Entwicklung von Imatinib in den 80er Jahren ist es möglich, die CML bis hin zu molekularen Remissionen zu therapieren [57-59].

Die Philadelphia-Chromosom-negativen (Ph<sup>-</sup>) MPN umfassen die PV, die ET und die PMF. Diesen Entitäten liegt kein bekannter einheitlicher genetischer Defekt zugrunde. Der Ursprung wird aber in der hämatopoetischen Stammzelle (HSC) vermutet. Bei der PV ist vorrangig die Erythropoese gesteigert, bei der PMF proliferieren die Megakaryozyten und Granulozyten verstärkt und die ET zeigt vornehmlich die Betonung einer aberranten Megakaryopoese [60]. 2005 wurden fast gleichzeitig fünf Publikationen veröffentlicht, die die Mutation V617F im JAK2-Gen beschreiben [61-65]. JAK2 ist in die Signalwege der hämatopoetischen Rezeptoren

Erythropoietin (EPO), GM-CSF (granulocyte-macrophage-colony stimulating factor), G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) und Thrombopoietin (TPO) involviert, da diese Rezeptoren selbst keine zytoplasmatischen Tyrosinkinase-Aktivität besitzen und den JAK-STAT Signalweg nutzen [60, 66]. Durch eine Mutation im Nukleotid 1849 in Exon 14 wird ein G mit T substituiert, so dass auf Codon 617 Valin anstelle von Phenylalanin translatiert wird [61-65]. Die JAK2-Mutation führt zu einer kontinuierlichen Autoaktivierung des Proteins, welche mit einer Zytokin-unabhängigen Proliferation und Differenzierung der Zelle einhergeht [60, 67]. 2009 publizierten Campbell *et al.* eine genetische Prädisposition für diese Mutation, die eine somatische Mutation ist, deren Erwerb aber eben offensichtlich auf dem Boden nachweisbarer Polymorphismen wahrscheinlicher wird [68]. JAK2 (V617F) tritt bei 95% der PV- und bei 50% der ET- und PMF-Patienten auf [60]. 70% der Patienten sind heterozygot mutiert, 30% homozygot [63, 64].

2006 publizierten Pikman *et al.* eine somatische Mutation, die die Transmembranregion des TPO-Rezeptors verändert. Diese MPL(W515L/K)-Mutation ist in einer Reihe von JAK2(V617F) negativen Fällen der ET und PMF nachweisbar. Auch diese Mutation führt zu einer Zytokin-unabhängigen Proliferation und Differenzierung der Zelle [69]. 5% der PMF- und 1% der ET-Patienten sind MPL(W515L/K) mutiert [70].

Trotz der Entdeckung der JAK2- bzw. der MPL-Mutation in der Mehrheit der Ph<sup>-</sup> MPN zeigte sich, dass die Mutationen weder die initialen Defekte darstellen noch definitiv den möglichen Progress verantworten [71, 72]. 2008 wurde eine weitere somatische Punktmutation im Isocitratdehydrogenase (IDH)-Gen von Glioblastomen nachgewiesen [73, 74]. Bei 70% der primären astrozytären, oligodendrogialen und oligoastrozytären Tumore sowie sekundären Glioblastome treten Mutationen im IDH 1-Gen (Arg132) und seltener im IDH 2-Gen (Arg172) auf [74]. Untersuchungen in der AML zeigten eine Mutationsrate von 8% [75]. Studien zu IDH-Mutationen in MPN zeigten diese selten in der chronischen Phase mit einer Beschränkung auf PMF-Patienten (4%). Demgegenüber finden sich bei 20% der MPN-Patienten in der Blastenkrise IDH-Mutationen. Die Mehrzahl der IDH positiven Patienten zeigen keine gleichzeitige JAK2(V617F) Mutation, so dass davon ausgegangen wird, dass IDH-Mutationen unabhängig von JAK2(V617F) auftreten. In der Literatur wird diskutiert, ob IDH-Mutationen in MPN frühe genetische Ereignisse darstellen, die das

Voranschreiten der Erkrankung beschleunigen, wie es bei den sekundären Glioblastomen beschrieben ist und somit eine negative Prognose darstellen [76, 77].

### 1.2.3. Primäre Myelofibrose

Die PMF ist durch die autonome Proliferation der hämatopoetischen Linie im Knochenmark charakterisiert und wird in zwei Phasen geteilt. Die prä-fibrotische hyperzelluläre Phase zeichnet sich durch eine verstärkte Granulopoese und Megakaryopoese aus, während für die zweite Phase die manifeste Knochenmarkfibrose repräsentativ ist [78]. Eine erhöhte Gefäßdichte ist mit verantwortlich für die gesteigerte Migration unreifer Blutzellen in die Peripherie, so dass eine extramedulläre Hämatopoese in der Milz und in der Leber stattfindet [79, 80]. In enger räumlicher Beziehung zu atypischen Megakaryozyten beginnt die Myelofibrose. Die Megakaryozyten sind stark vergrößert und weisen hyperchromatische, hypolobulierte Zellkerne (sogenannte „Wolkenkerne“) auf. Im Knochenmark liegen sie in Clustern [56, 81]. Durch die gestörte Megakaryopoese werden offensichtlich pro-fibrotische Wachstumsfaktoren aktiv oder passiv freigesetzt, so dass Fibroblasten aktiviert werden und es zu einer Ablagerung von Retikulin- und Kollagenfasern kommt [82, 83]. Zur Diagnostik einer PMF bedienen sich die Pathologen einer Einteilung in vier Myelofibrosegrade (mf). Mf 0 beschreibt lineare Retikulinfasern wie im gesunden Knochenmark; mf 1 zeichnet sich durch netzartig überlagerte Retikulinfasern aus; mf 2 ist charakterisiert durch einen deutlichen Anstieg an Retikulinfasern und lokalen Kollagenbündeln und mf 3 weist einen deutlichen Anstieg an Retikulinfasern und ausgeprägte Kollagenbündel auf [78]. Mit zunehmender Fibrose weist das Knochenmark zudem eine verringerte Zellularität und erweiterte Sinusoide mit intrasinusoidaler Hämatopoese auf. Die voranschreitende Verödung des blutbildenden Knochenmarkes führt zu einer extramedullären Blutbildung in der Milz und in der Leber. Vorstufen der Blutzellen werden in das Blut ausgeschwemmt [84]. Zusätzlich bildet sich im fortgeschritten Stadium der PMF eine Osteosklerose aus. Diese ist charakterisiert durch vermehrte und defekte Knochenbälkchen mit wenigen oder fehlenden Osteoklasten [85]. Das Risiko eines Überganges von der prä-fibrotischen in die fibrotische Phase wird in der Literatur mit 50-70% beschrieben, die progressive Myelofibrose korreliert dabei mit einem schlechteren Überleben [86]. In ca. 10% der Fälle entwickeln die Patienten eine sekundäre akute myeloische Leukämie [84, 87]. Von einer PMF sind überwiegend ältere Patienten, mit einer maximalen Häufigkeit im sechsten

Lebensjahrzehnt, betroffen [88-90]. Ein Zehntel sind jünger als 40 Jahre und bereits bei Kindern wurde die PMF schon diagnostiziert [91]. Epidemiologische Studien ermittelten eine jährliche, geschlechterunabhängige Inzidenz von 0,21 pro 100.000 Personen [89].

Die ersten klinischen Symptome sind meist unspezifisch, so dass die Erkrankung unbemerkt und schleichend beginnt. Gewichtsverlust und Müdigkeit gehen Splenomegalie-bedingten Oberbauchbeschwerden und veränderten Blutwerten voraus [92]. Für die Diagnosesicherung der PMF nach den WHO-Kriterien ist eine morphologische Untersuchung des Knochenmarkes mittels Beckenkammpunktion unverzichtbar. Zusätzlich sollten JAK2(V617F)-, MPL(W515L/K)-, IDH(Arg132)- bzw. IDH(Arg172)-Mutationstests durchgeführt werden [56].

Der Krankheitsverlauf ist von Fall zu Fall unterschiedlich, führt aber im Allgemeinen zu einem zunehmenden Versagen des Knochenmarkes mit transfusionsabhängiger Anämie und zunehmender Organomegalie auf Grund der extramedullären Blutbildung. Eine PMF wird palliativ therapiert, da die allogene Stammzelltransplantation als kurative Behandlung wegen des meist erhöhten Alters, fehlender Spender oder des Krankheitsstadiums limitiert ist. Kröger *et al.* konnten 2008 zeigen, dass eine allogene Stammzelltransplantation nach dosisreduzierter Konditionierung eine potentielle Therapie darstellt. Bei dem neuen Transplantationsverfahren wird die Dosis der vorausgegangenen Chemotherapie so reduziert, dass nicht mehr das gesamte körpereigene Knochenmark zerstört wird, sondern nur noch so viel, dass die Stammzellen des Spenders anwachsen können. Ein Jahr nach der Transplantation ging die Knochenmarkfibrose bei 100% der Patienten auf einen Fibrosegrad von mf 0/1 zurück [93]. Die Todesursachen von PMF-Patienten sind häufig Myokard- bzw. Hirninfarkte durch thrombembolische Komplikationen oder Blutungsneigung, Infektionen oder die Transformation in die akuten myeloischen Leukämie [91]. Das mediane Überleben nach Diagnosestellung beschränkt sich auf 4-5,5 Jahre, obwohl auch Langzeitüberlebende bis 20 Jahre beschrieben worden sind [94].

#### **1.2.4. Pathomechanismen in der Fibrosebildung**

Die molekularen Mechanismen der PMF sind noch weitestgehend unbekannt, jedoch scheinen fibrogene Zytokine wie PDGF, TGFB und FGF in die Ausbildung der Fibrose involviert zu sein [83]. Die pro-fibrotischen Wachstumsfaktoren werden entweder aktiv von Megakaryozyten sezerniert oder durch Zerfall passiv freigegeben.

Ortsständige Fibroblasten werden durch die Akkumulation dieser Faktoren stimuliert, so dass es sowohl zu einer Ablagerung von Kollagen-Typ III (Retikulin) als auch später von Kollagen-Typ I kommt und sich damit letztendlich eine Fibrose ausbildet [82]. Hauptfunktion der Megakaryozyten ist die Bildung von Thrombozyten. Durch die Ausbildung von bis zu 500µm langen Pseudopodien, auch Proplättchen genannt, erfolgt die Abschnürung maturer Plättchen und die Abgabe an einen Sinus [95, 96]. Obwohl die Knochenmarkfibrose in enger räumlicher Beziehung zu den Megakaryozyten beginnt, ist wenig über die Proplättchenformation, ausgehend von den atypischen Megakaryozyten, in der PMF bekannt. Bei einer konventionellen Knochenmarkhistologie sind die Proplättchen auf Grund der Schnittdicke von 2-3µm mittels Immunhistochemie selten detektierbar [97].

Ein weiterer möglicher Ursprung der Fibrose ist eine Dysbalance in der Produktion und dem Abbau der ECM durch MMPs und deren Inhibitoren TIMPs [98]. Eine direkte Inhibierung der MMPs erfolgt über TIMPs, die direkt an die katalytische Zentren der MMPs binden und damit ihre Aktivität hemmen [99]. Bislang sind über 20 MMPs identifiziert, die Komponenten der ECM um- und abbauen. Je nach Substratspezifität bzw. molekularem Aufbau gliedern sie sich in sechs Subgruppen: Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, Matrilysine, membrangebundene MMPs und andere MMPs. Kollagenolytisch am stärksten wirken MMP-1, -8, -13 und -14, die die Tripelhelix des Kollagens spalten, so dass sich die Kette entwindet und weitere degradierende Prozesse durch andere MMPs beginnen können [99]. Obwohl auch MMP-2 kollagenolytisch agiert, wird eine Interaktion mit MMP-9 und eine Beteiligung am Prozess der Angiogenese beschrieben [100, 101]. Molekulare Analysen der Knochenmarkbiopsien von PMF-Patienten zeigen, entgegen der Erwartungen, eine erhöhte MMP-13- und MMP-14-Expression in der fibrotischen PMF, sowie ein erhöhtes MMP-8-Level in der prä-fibrotischen PMF [98]. Immer mehr Studien weisen jedoch auf eine essentielle Rolle von MMP-14 in der Angiogenese und speziell bei der Bildung von Blutgefäßen hin [85, 102, 103]. In der PMF zeigt sich unter anderem eine erhöhte Gefäßdichte, so dass ein Zusammenhang zwischen der erhöhten MMP-14-Expression und der gesteigerten Angiogenese in der PMF vermutet wird [79, 98]. Die Familie der bone morphogenetic proteins (BMP) besteht aus mehr als 20 Proteinen, von denen BMP1 bis BMP7 am weitesten untersucht sind [104]. Im Gegensatz zu den restlichen BMPs gehört BMP1 funktionell nicht zu den TGF-β-ähnlichen Proteinen, sondern zu den MMPs und ist in den Aufbau der ECM

involviert, indem es Vorläuferstufen zu funktionsfähigen Proteinen prozessiert. Unter anderem werden frühe Formen von Kollagen-Typ I und III gespalten, und dadurch ausgereifte Kollagenfibrillen produziert. BMP1 aktiviert eine latente Form von TGF- $\beta$ -1, so dass die Expression der Kollagene und anderer ECM- Komponenten induziert wird [104, 105]. Auch eine Inhibition der Apoptose der Fibroblasten über Prozessierung von Proteoglykanen wird BMP1 zugeschrieben [106]. Die Ausschüttung und Akkumulation von BMP's aus Megakaryozyten, Osteoblasten, Osteoklasten und Stromazellen fördert die Entstehung von Fibrosen in der PMF [107]. BMP6 ist der effektivste Induktor für eine osteogene Differenzierung und wurde in experimentellen subkutanen Tumoren in der Maus als hauptsächlicher Vermittler der Fibrose identifiziert [108, 109].

### **1.3. Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit**

Die Pathomechanismen, die zur Bildung einer Fibrose führen, sind zurzeit noch weitestgehend unverstanden und nur in Ansätzen charakterisiert. Die Knochenmarkfibrose beginnt gewöhnlich in enger räumlicher Beziehung zu Ansammlungen atypischer Megakaryozyten. Die Ablagerung von Kollagen-Typ III und später von Kollagen-Typ I ist wesentlich der Aktivierung von ortsständigen Fibroblasten zuzuschreiben, die durch die Sekretion oder den Zerfall von Megakaryozyten mittels pro-fibrotischer Wachstumsfaktoren stimuliert werden. Der Reichtum der Megakaryozyten an essentiellen pro-fibrotischen Zytokinen, die zur Untersuchung der Fibrose-Entwicklung unerlässlich sind, sowie die reaktive Proliferation und Aktivierung von Fibroblasten machen die PMF zu einer außergewöhnlich interessanten Modellerkrankung für die Fibrose, so dass die Analysen für die vorliegende Arbeit am Knochenmark durchgeführt wurden.

Im Rahmen der Untersuchungen sollten Expressionsanalysen verschiedener MPNs mittels Genexpressions-Arrays potentielle Kandidatengene für die molekularen Mechanismen der Fibrose-Entwicklung charakterisieren. Durch die Untersuchung der PMF auf morphologischer Ebene sollte versucht werden, Prinzipien der Fibrose-Entwicklung im Vergleich zu MPNs ohne Fibrose zu verstehen. Die Markierung von Megakaryozyten mittels Fluoreszenz-Einfach- und -Doppel-Färbungen diente der Analyse des Aufbaues und der Interaktionen verschiedener Zelltypen mit den Megakaryozyten. Besonderes Interesse lag auf der Proplättchenformation und einem möglicherweise frühzeitigem Zerfall der Megakaryozyten.

## 2. Ergebnisse

### 2.1. Bock, O., Muth, M. *et al.*

Identification of new target molecules PTK2, TGFBR2 and CD9 overexpressed during advanced bone marrow remodelling in primary myelofibrosis.

Br J Haematol, 2009. 146(5): p. 510-20.

Mittels Genexpressions-Arrays wurden 45 Gene, die in den Umbau der ECM und in die zelluläre Adhäsion und Motilität involviert sein sollen, bei PMF-Patienten mit verschiedenen fibrotischen Phasen analysiert. 11 dieser Gene zeigten eine signifikante Überexpression in der manifesten Phase der PMF im Vergleich mit der altersentsprechenden Hämatopoese. Der Transforming growth factor beta Typ II Rezeptor (TGFBR2), die Focal Adhesion Kinase (FAK) und das Motility-Related Protein-1 (CD9) wurden in der weiteren Studie in einem größeren Kollektiv re-evaluiert und wiesen dieselbe signifikante Überexpression auf. Immunhistochemische Untersuchungen detektierten die drei Proteine in den Endothelien des vermehrten Gefäßnetzes der PMF. CD9 konnte zudem in aktivierten Fibroblasten der fibrotischen Phase der PMF lokalisiert werden. Folglich stellen TGFBR2, FAK und CD9 interessante Gene bei der Knochenmarkumgestaltung von PMF und für einen therapeutischen Ansatz dar.

Beitrag zur Publikation:

Verfassen des Manuskripts

Laborarbeiten (Immunhistochemie (IHC))

Auswertung der Daten



## **2.2. Muth, M. et al.**

Aberrant proplatelet formation in chronic myeloproliferative neoplasms.

Leuk Res, 2010. 34(11): p. 1424-9.

Mit Hilfe der Proplättchen geben Megakaryozyten die Thrombozyten in die Sinusoide ab. Durch die konventionelle IHC und die Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) konnten diese Strukturen im Interstitium des Knochenmarkes sichtbar gemacht werden. Im Vergleich zu der altersentsprechenden Hämatopoese zeigte sich in der ET, der prä-fibrotischen PMF und der fibrotischen PMF ein Anstieg der Proplättchendichte. Mit der Manifestation einer Fibrose ergab sich ein signifikant erhöhtes Dichte- und Volumenverhältnis der Proplättchen im Vergleich mit der prä-fibrotischen PMF und der ET. Die prä-fibrotische PMF und die ET wiesen keine signifikanten Unterschiede, jedoch eine Tendenz zur höheren Dichte in der PMF, auf. Folglich könnte eine aberrante Proplättchenbildung in der PMF an der Entstehung der Myelofibrose beteiligt sein.

Diese Publikation wurde in der Ausgabe von Leukemia Research mit einem ausführlichen Editorial gewürdigt:

Wilkins, B.S., Proplatelet production and stromal fibrosis in myeloproliferative neoplasms. Leuk Res. 34(11): p. 1417-9.

Leuk Res. 2010 Nov;34(11):1417-9.

Beitrag zur Publikation:

Verfassen des Manuskripts

Laborarbeiten (IHC, CLSM, point-sampling-Methode, Fluoreszenzintensitätsbestimmung)

Auswertung der Daten

**2.3. Muth, M. et al.**

Thrombospondin-1 (TSP-1) in primary myelofibrosis (PMF) - a megakaryocyte-derived biomarker which largely discriminates PMF from essential thrombocythemia. Ann Hematol, 2010.

Expressionsanalysen von Thrombospondin-1 und -2 (TSP-1/TSP-2) in den verschiedenen Stadien der PMF wurden mittels real-time-PCR, Immunhistochemie und Konfokaler Laser Scanning Mikroskopie durchgeführt. Im Vergleich mit der ET und der altersentsprechenden Hämatopoese war TSP-1 in allen Stadien der PMF überexprimiert. Analysen von Verlaufsbiopsien ergaben einen Einfluss von TSP-1 während der progressiven Myelofibrose. TSP-2 war kaum nachweisbar, jedoch zeigten 40% der PMF-Patienten mit Myelofibrose eine Überexpression. Detektiert wurde das Protein in den Megakaryozyten und in den Proplättchenformationen im Interstitium des Knochenmarkes. Endothelien und Fibroblasten wiesen keine Co-Lokalisation von TSP-1 und CD105 in der CLSM auf. Auf Grund der ambivalenten Rolle von TSP bei der Regulation der Angiogenese stellt dieses einen interessanten Marker für die Pathogenese der Fibrose dar.

Beitrag zur Publikation:

Verfassen des Manuskripts

Laborarbeiten (IHC, CLSM)

Auswertung der Daten

### 3. Diskussion

Biologisch ist die Reparatur von geschädigtem Gewebe fundamental und überlebenswichtig. Übersteigt hierbei im Rahmen der Reparation die Synthese von Kollagen durch (Myo-)Fibroblasten die zerstörten bzw. zu ersetzenden Kollagene und nimmt die Kollagenmenge mit der Zeit unkontrolliert zu, spricht man von einer Dysfunktion der Wundheilung, die mit der Entwicklung einer Fibrose einhergeht [4]. Die genauen Pathomechanismen, die zur Ausbildung einer Fibrose führen, sind zurzeit noch weitestgehend unverstanden und nur in Ansätzen charakterisiert, so dass im Rahmen dieser Arbeit die molekularen und morphologischen Ursachen weiter analysiert und somit verstanden werden sollten. Zur Untersuchung der Fibrose-Entwicklung sind Studien der Megakaryozyten, die reich an essentiellen profibrotischen Zytokinen sind, unerlässlich. Zusätzlich erfolgten Studien der reaktiven Proliferation und Aktivierung von Fibroblasten. Auf Grund des Reichtums an Megakaryozyten stellt die PMF eine außergewöhnlich interessante Modellerkrankung für die Fibrose dar und dient in der vorliegenden Arbeit als Basis zur Klärung der Fibrose-Entstehung. Mittels Veränderungen des Gen-Expressionsmusters verschiedener myeloproliferativer Neoplasien sollten im Verlauf der Untersuchungen potentielle Kandidatengene für die molekularen Mechanismen der Fibrose-Entwicklung charakterisiert und beschrieben werden. Morphologische Untersuchungen der PMF sollten zudem Aufschluss über die Prinzipien der Fibrose-Entwicklung im Vergleich zu myeloproliferativen Neoplasien ohne Fibrose-Entwicklung geben. Vor allem die Analyse des Aufbaues der Megakaryozyten und ein möglicher frühzeitiger Zerfall lagen im Fokus der vorliegenden Arbeit.

In den folgenden Abschnitten werden die mittels Genexpressions-Profil evaluierten Gene beschrieben und in einen Zusammenhang mit der aktuellen Literatur gesetzt. Ein Schwerpunkt liegt dabei auf der TGF- $\beta$ - bzw. BMP-Smad-Signalkaskade mit den Typ I (ALK) und Typ II Rezeptoren (TGFBRII). Des Weiteren wird FAK diskutiert, das in Bereichen der Zell-Matrix-Interaktion lokalisiert, Signale über Integrine weiterleitet und in die TGF- $\beta$ -Signalkaskade involviert ist. CD9 fördert nicht nur die Zellbewegung und die Migration, sowie die Zellproliferation und -Differenzierung, sondern ist auch in die verstärkte Ausschwemmung der Vorläuferzellen in das Blut involviert. Durch die Glycoprotein Ib, alpha polypeptide (CD42b)-Fluoreszenz-Färbungen und -IHC konnten aberrante Proplättchenformationen im Knochenmark der PMF dargestellt und analysiert werden. Zudem ist TSP sowohl in die Adhäsion,

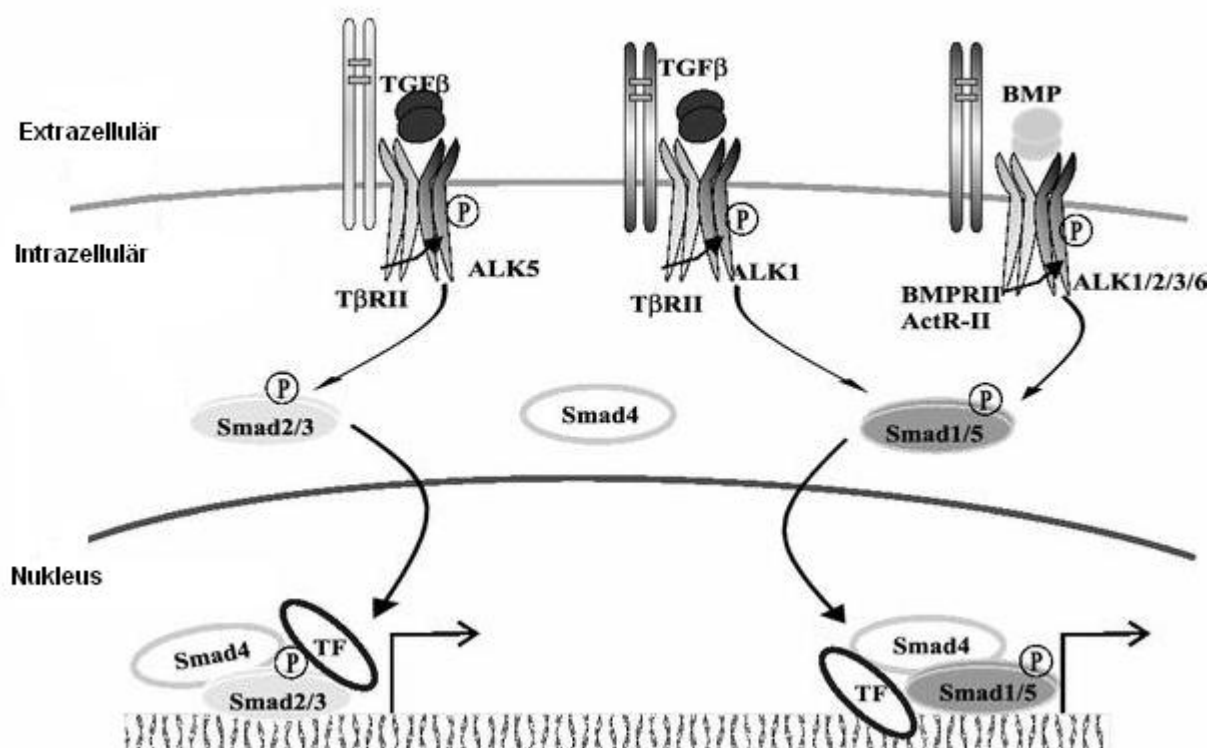
die Motilität und die Proliferation über Integrine und in die TGF- $\beta$ -Signalkaskade involviert, als auch morphologisch in die Entwicklung der Megakaryozyten und in die Ausbildung der Proplättchenformationen.

Der zur Fibrose führende Umbauprozess des Knochenmarkstromas wird durch Wachstumsfaktoren sowie pro-fibrotische Zytokine induziert und beeinflusst sowohl die Gefäßdichte als auch die Komponenten der ECM [82]. Daher wurde in der hier vorgestellten Arbeit unter Berücksichtigung der aktuellen Literatur [80, 82, 90, 110] ein mit Fibrose-assoziierten Genen bestückter Low-Density-Array (LDA) [111] verwendet, um das Expressionsmuster der PMF in der prä-fibrotischen Phase und mit manifester Fibrose im Vergleich zur ET und zur altersentsprechenden Hämatopoese zu analysieren [112]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigten Bock, Muth *et al.* 2009 an einem Patientenkollektiv eine signifikante Überexpression von 11 Genen in der fibrotischen PMF im Vergleich mit der altersentsprechenden Hämatopoese. Unter diesen Genen waren Kandidaten, für die ein wesentlicher Einfluss auf den Umbau (MMPs und BMPs) und den Aufbau (TGF- $\beta$ -1, TSP1) der ECM beschrieben wurde, sowie Gene, die für die Anordnung der Kollagene verantwortlich sind.

### **3.1. Transforming growth factor beta Typ II Rezeptor (TGFBRII)**

Die Überexpression von TGFBRII lässt sich durch die bereits publizierte Überexpression seines Liganden TGF- $\beta$ -1 in der PMF erklären [82, 90]. Abbildung 2-1 zeigt die TGF- $\beta$ - bzw. BMP-Smad-Signalkaskade, wobei TGF- $\beta$ - bzw. BMP-Isoformen binden und den heterooligomeren Komplex aus Typ I und Typ II Rezeptoren stabilisieren. Der Typ II Rezeptor ist dem Typ I Rezeptor vorgeschaltet und aktiviert diesen mittels Phosphorylierung, der seinerseits das Signal in das Zellinnere, ebenfalls durch Phosphorylierung, an intrazelluläre Signalmediatoren, die Smad-Proteine, weiterleitet [113, 114]. Im Falle von TGF- $\beta$  an Smad2 und 3, bei BMP an Smad1 und 5. Die aktivierten Smads bilden mit dem Kofaktor Co-Smad4 einen heterotrimeren Komplex und werden in den Kern transportiert, wo sie in Kombination mit spezifischen Transkriptionsfaktoren (TF) an die Promotoren von Zielgenen binden [115]. Die Typ I Rezeptoren bestimmen dabei die Ligandenspezifität [116]. In den meisten Zellen verläuft die TGF- $\beta$  Signalkaskade über den Typ I Rezeptor Aktivin-ähnliche Kinase 5 (ALK), wobei in Endothelzellen zusätzlich ALK1 fungieren kann [117]. TGF- $\beta$  induziert über TGFBRII entweder eine Proliferation der Endothelien (ALK1) oder inhibiert diese (ALK5) [118]. Das Verhältnis

zwischen ALK1 und ALK5 in den Endothelzellen legt fest, ob TGF- $\beta$  einen pro- oder anti-angiogenen Effekt hat [117]. ALK1 und damit eine Proliferation der Endothelien wird zudem durch die Bindung von BMPs an den BMP-Rezeptor-Komplex aktiviert [115]. Akzessorische Typ III Rezeptoren können einen modulierenden Einfluss auf den Signalweg ausüben, so dass die Ligandenbindungsaffinität verändert wird. Endoglin (CD105) bindet TGF- $\beta$ -1 und TGF- $\beta$ -3, Aktivin A, BMP-2 und BMP-7 und wirkt pro-angiogen mittels TGFBRII und dem BMP-Rezeptoren-Komplex [115, 119].



**Abbildung 2:** TGF- $\beta$ - bzw. BMP-Smad-Signalkaskade (verändert nach [115])

Im Rahmen der Fragestellung nach Faktoren zur Entstehung einer Fibrose konnten Bock, Muth *et al.* 2009 neben der Überexpression von TGFBRII in der PMF eine Beteiligung der TGF- $\beta$ -Signalkaskaden bei der Angiogenese der PMF mittels positiver immunhistochemischer TGFBRII-Färbungen der Endothelien darstellen. Zwar zeigte die altersentsprechende Hämatopoese ebenfalls positive Signale für TGFBRII, jedoch waren diese geringer und lassen sich durch die physiologische Rolle der TGF- $\beta$ -Signalkaskade in den Blutgefäßen erklären [112]. Auch eine Überexpression von Endoglin und BMPs, sowie die Lokalisation der BMPs in Endothelien konnte bereits unter anderem von Bock *et al.* in der PMF gezeigt werden [111, 120]. Der bereits publizierte Zusammenhang zwischen einer gesteigerten

Menge an Wachstumsfaktoren wie VEGF und FGF und einer gesteigerten Angiogenese in der PMF [79, 82, 121] lässt sich auf die Überexpression von TGFBRII übertragen. Eine gesteigerte Angiogenese führt zu einer gesteigerten Proliferation der Endothelien durch die Aktivierung der TGF- $\beta$ -Signalkaskade über TGFBRII und ALK1, so dass Bock, Muth *et al.* vermehrt TGFBRII positive Endothelien in der immunhistochemischen Färbung zeigen konnten. Auch die Überexpression der BMPs und die vermehrte Lokalisation in den Endothelien kann durch die Beteiligung der BMP-Signalkaskade bei der Angiogenese in der PMF erklärt werden. BMPs wirken pro-angiogen und aktivieren über ALK1 die Proliferation der Endothelien. Folglich konnte die gesteigerte Expression von BMPs in der PMF in den Endothelien mittels immunhistochemischer Färbung dargestellt werden. Interessanterweise publizierten Rooke *et al.* eine reduzierte TGFBRII Expression in der CML, der ET und der PV [122]. Da diese Entitäten keine Fibrose ausbilden, wurde mit der Überexpression von TGFBRII in der Angiogenese der PMF ein interessanter Kandidat für weiterführende Untersuchungen bezüglich der Entstehung einer Fibrose auf molekularpathologischer Ebene gefunden. Zudem könnte das Inhibieren des Rezeptors einen therapeutischen Ansatzpunkt darstellen, um das Voranschreiten einer Fibrose zu unterbinden.

### **3.2. Focal adhesion kinase (FAK)**

FAK ist ein weiteres interessantes Gen, das in der Studie von Bock, Muth *et al.* eine Überexpression in der PMF im Vergleich zur altersentsprechenden Hämatopoese und zur ET zeigte [112]. FAK ist in Bereichen der Zell-Matrix-Interaktion lokalisiert und leitet nach der Bindung von Proteinen der ECM an Integrine Signale weiter [123]. Integrine sind Transmembranmoleküle, die als Adhäsionsproteine zwischen Komponenten der ECM und der Umgebung agieren und somit das Einwandern von Zellen regulieren [30, 124]. Zusätzlich sind sie in die Signaltransduktion zwischen dem Zellinneren und der ECM involviert. „Inside-Out-Signaling“ steht dabei für Signale aus dem Inneren der Zelle und reguliert die Bindungsaktivität der Integrine auf der Außenseite. Die Bindung eines Proteins aus der ECM an Integrine erfolgt über eine Aminosäureabfolge mit der Sequenz Arginin-Glycin-Aspartat (RGD-Sequenz) und führt zu einer Signalübertragung in das Innere der Zelle („Outside-In-Signaling“) [125, 126]. Durch die Bindung eines Proteins aus der ECM an Integrin wird die intrazytoplasmatische Domäne des Integrins mit dem Zytoskelett verknüpft, was unter anderem für die Zellmigration, die Proliferation, die Genexpression und die

Differenzierung von Bedeutung ist. Des Weiteren kommt es zu einem sogenannten Clustering der Integrine, was als Focal Adhesion bezeichnet wird. Aktin-Mikrofilamente (Stress Fibers) werden in parallelen Strängen innerhalb des Zytoplasmas gebündelt und enden an den Focal Adhesions [127]. In diesen Focal Adhesions liegt FAK in einer besonders hohen Konzentration vor. Nach der Bindung von Endothelien an die ECM kommt es zu einer Autophosphorylierung der FAK, wodurch sie eine verstärkte Kinaseaktivität aufweist [128]. In der Literatur ist eine Beteiligung der FAK an der Zellmigration beschrieben. Eine Integrin-vermittelte Adhäsion von Endothelzellen auf ECM-Proteinen zeigt eine gesteigerte Kinaseaktivität der FAK. Zudem zeigen *in vitro* kultivierte Zellen im Monolayer, deren Konfluenz unterbrochen wurden, eine höhere Konzentration an phosphorylierten Proteinen und eine gesteigerte FAK-Kinase-Aktivität im Vergleich mit ruhenden Monolayern. Die Aktinfilamente des Zytoskeletts werden phosphoryliert und verändern daraufhin ihre Form, bevor es zu einer Migration der Zellen und zu der Verschließung der Lücke kommt [129]. Außerdem zeigen FAK-Knock-Out-Mäuse schwere Störungen in der embryonalen Angiogenese bei der die Zellmigration von entscheidender Bedeutung ist [130, 131]. In der Proliferationsphase der Wundheilung induzieren Integrine durch die Bindung von Fibronektin die Zellmigration. Romer *et al.* zeigten in Zellkulturexperimenten einen Umbau der Endothelien vor der Migration. Gleiches ist nach der Bindung an die ECM während der Wundheilung zu beobachten. Auch diese Umwandlung ist durch Integrin induziert [30, 124]. Bei der Wundheilung wandern Endothelien direkt nach der Verletzung bzw. Schädigung in das Wundgebiet ein. Im Verlauf des Heilungsprozesses wird die Migrationsrate kontinuierlich langsamer [132, 133]. Die Ergebnisse der FAK-Knock-Out-Maus-Experimente mit einer gestörten Angiogenese lassen vermuten, dass jeder Eingriff in die Interaktion zwischen FAK und Endothelien einen Einfluss auf die Angiogenese hat. Im Verlauf der vorliegenden Arbeit zeigten Bock, Muth *et al.* eine Überexpression von FAK in der PMF im Vergleich zur altersentsprechenden Hämatopoese und zur ET. Die Überexpression von FAK liegt unter anderem in der TGF- $\beta$  Signalkaskade begründet. Hayashida *et al.* zeigten eine Abhängigkeit der Kollagen-Typ I Synthese von FAK in einem TGF- $\beta$ -1 stimulierten Nierenfibrose-Modell [134]. Des Weiteren ist FAK für die Anordnung der Endothelien wichtig [135]. Somit wäre es denkbar, dass die zuvor beschriebene TGFBRII Überexpression durch TGF- $\beta$  zu einer Überexpression von FAK und folglich auch zu einer

Veränderung der Endothelienarchitektur führt. Histopathologisch weist das Knochenmark der PMF eine erhöhte Gefäßdichte mit abnormaler Struktur auf [136], so dass die erhöhte Expression von FAK eine Beteiligung an der gesteigerten Angiogenese vermuten lässt. Dadurch wäre eine verstärkte Proliferation und Migration der Endothelien und somit die erhöhte Gefäßdichte in der Fibrose zu erklären.

### 3.3. Motility-Related Protein-1 (CD9)

Ein weiteres interessantes Gen stellt CD9 dar. Bock *et al.* beschrieben im Rahmen dieser Arbeit eine signifikante Überexpression in der manifesten Phase der PMF im Vergleich mit der prä-fibrotischen Phase der PMF und mit der altersentsprechenden Hämatopoese. CD9 fördert die Zellbewegung, Migration, die Zellproliferation und -Differenzierung [137]. Zudem wird es auf der Oberfläche von Thrombozyten exprimiert und zählt zu den wichtigsten Membranproteinen [138, 139]. 2006 publizierten Ko *et al.*, dass Thrombozyten die Proliferation von Endothelien stimulieren und dass CD9 an dem Zell-Zell-Kontakt beteiligt ist [140]. Bock *et al.* beschrieben eine signifikante Überexpression von CD9 in den Megakaryozyten und wiesen das Protein immunhistochemisch in den Endothelien nach [112]. Hauptfunktion der Megakaryozyten im Organismus ist die Bildung von Plättchen. Die Stimulation der Endothelien zur Proliferation durch die Plättchen weist auf einen übergeordneten Zusammenhang zwischen den CD9 angereicherten Megakaryozyten und der gesteigerten Angiogenese in der PMF hin. Neben der gesteigerten Angiogenese ist die PMF durch das Ausschwemmen von Vorstufen der Blutzellen in das Blut charakterisiert [84, 141]. Gesteuert wird dieses unter anderem durch Oberflächenproteine wie CD9 [142, 143]. Mit Hilfe eines Genexpressions-Profilings in CD34-positiven Zellen aus dem peripheren Blut von PMF-Patienten konnten Guglielmelli *et al.* eine Überexpression von CD9 in CD34-positiven Zellen demonstrieren [144]. Expressionsanalysen und immunhistochemische Untersuchungen der extramedullären Blutbildung in der Milz zeigten ebenfalls eine Überexpression von CD9 im Vergleich mit einer gesunden Milz [112]. Somit lässt sich vermuten, dass die Überexpression von CD9 in die verstärkte Ausschwemmung der Vorläuferzellen in das Blut involviert ist. Diese wird durch die erhöhte Gefäßdichte, die vermutlich auch durch CD9 induziert wird, erleichtert. Folglich stellt CD9 einen interessanten Kandidaten dar, um die Angiogenese und die



Ausschwemmung von Vorläuferzellen in das Blut zu inhibieren und die Entstehung einer Fibrose zu unterbinden.

### 3.4. Proplättchenformation

Morphologisch zeichnet sich die PMF unter anderem durch atypische Megakaryozyten aus [56, 81]. Mit bis zu 100µm Durchmesser sind sie die größten hämatopoetischen Zellen des Knochenmarkes und für die Bildung der Plättchen verantwortlich [145]. Das Volumen wird durch eine spezifische Endomitose (Mitose ohne vollständige Cytokinese) erreicht, so dass der Kern über einen Chromosomensatz von bis zu 128n verfügt [146]. Durch die Pseudopodienabschnürungen (Proplättchenformationen) erfolgt die eigentliche Plättchenbildung und die spätere Abgabe der Plättchen an Sinusoide. Dabei erreichen die Pseudopodien eine Länge von bis zu 500µm. Als Membranreservoir für die Ausbildung gilt das innere ‚demarcation membrane system‘ (DMS). Bei einer konventionellen Knochenmarkhistologie sind diese Formationen auf Grund der Schnittdicke nur sehr selten sichtbar [95, 96], so dass noch keine Untersuchungen der Proplättchenformation, ausgehend von den Megakaryozyten, bei MPNs durchgeführt wurden. Bis zum heutigen Tag konnten Proplättchen nur durch Elektronenmikroskopie *in situ* dargestellt werden [147]. Durch die Erschließung des Knochenmarkes für die Fluoreszenz-Einfach- und -Doppel-Färbung war es im Rahmen dieser Arbeit (Muth *et al.* 2010) möglich, die Proplättchenformationen im Knochenmark zu visualisieren [148]. Mit Hilfe der CLSM lassen sich klar definierte Schnitte durch die Knochenmarkstanzen, sowohl in der xy-Ebene (senkrecht zur optischen Achse), als auch vertikal in der xz- bzw. yz-Ebene (parallel zur optischen Achse des Mikroskops) anfertigen, um zum Beispiel ein Tiefenprofil von Zellen in einem Präparat darzustellen [149, 150]. In der konventionellen IHC sind die Proplättchen im gesunden Knochenmark als kleine punktförmige oder längliche Strukturen (1-2µm) zu erkennen. Sie sind in der Regel nicht gleichmäßig verteilt sondern liegen vereinzelt im Knochenmark bzw. „geclustert“ an den Megakaryozyten und vermitteln den Eindruck von interstitiellen Depots einzelner Plättchen. Mittels CLSM konnten CD42b-positive Pseudopodien als nicht homolog-ausgedehnte Strukturen dargestellt werden. Es wechseln sich filigrane, fadenähnliche mit breiteren Ausläufern ab. Bei der Analyse der prä-fibrotischen PMF wurden im Vergleich zur altersentsprechenden Hämatopoese deutlich mehr Pseudopodien sichtbar. Mit der Manifestation einer Fibrose konnte eine weitere Zunahme der Pseudopodien in

größeren Arealen des Knochenmarkes detektiert werden. Dieses dichte Netzwerk der Proplättchen ist in einer räumlichen Beziehung zu den atypischen Megakaryozyten zu finden. Um die Entstehung einer Fibrose zu untersuchen, wurden auch Patienten mit ET analysiert. Im Vergleich zur altersentsprechenden Hämatopoese konnte eine Zunahme der Proplättchen beobachtet werden, jedoch zeigten sich im Vergleich mit der fibrotischen PMF deutlich weniger Ausläufer [148]. Zur genauen Lokalisation der CD42b positiven Proplättchenformationen wurde im Rahmen dieser Arbeit die etablierte (Muth *et al.* 2010) CD42b/CD34 Fluoreszenz-Doppel-Färbung am Knochenmark durchgeführt. Die überwiegende Mehrheit der Proplättchen liegt außerhalb der Blutgefäße, wohingegen reife Megakaryozyten auch in Assoziation zu Blutgefäßen dargestellt werden konnten. Um auszuschließen, dass die CD42b positiven interstitiellen Strukturen durch einen frühzeitigen Zerfall von Megakaryozyten ins Interstitium gelangen und es sich nur um zellulären Debris handelt, wurde eine Fluoreszenz-Doppel-Färbung mit CD42b/CD68 durchgeführt. Die Auswertung ergab keine Co-Lokalisation, so dass CD42b-reaktive (Pro-) Plättchen in Makrophagen ausgeschlossen werden konnte und davon auszugehen ist, dass es sich um Pseudopodien vitaler Megakaryocyten handelt [148]. Im Verlauf der Arbeit wurden die mikroskopischen Ergebnisse mittels der „Point-sampling-Methode“ [151] und der Fluoreszenzintensitätsbestimmung bestätigt. Eine Analyse der Proplättchendichte ergab eine signifikant erhöhte Anzahl in der fibrotischen PMF im Vergleich zur prä-fibrotischen PMF, zur ET und zur altersentsprechenden Hämatopoese. Dieses Ergebnis zeigte sich auch bei der Fluoreszenzintensitätsbestimmung. Die Proplättchen der ET sind im Vergleich zu der altersentsprechenden Hämatopoese auch signifikant erhöht. Zudem ergab sich eine Tendenz für eine höhere numerische Dichte der Proplättchen in der prä-fibrotischen PMF im Vergleich mit der ET. Dieser Unterscheid war jedoch nicht signifikant [148]. Zur Klärung der Frage nach der Entstehung einer Fibrose konnte das Knochenmark im Rahmen dieser Arbeit für die Fluoreszenz-Färbung erschlossen werden und die Auswertung mittels CLSM stellte die Proplättchen als lange pseudopodienartige Zytoplasmafortsätze der Megakaryozyten dar, die von den Thrombozyten abgrenzbar sind. Unter den MPNs weist die PMF mit manifester Myelofibrose die höchste Proplättchendichte auf, die prä-fibrotische PMF und die ET weisen keine signifikanten Unterschiede, jedoch eine Tendenz dazu, auf. Eine aberrante Proplättchenbildung könnte an der Entstehung der Myelofibrose beteiligt sein.

Obwohl keine phagozytäre Aktivität festgestellt werden konnte, kann nicht ausgeschlossen werden, dass extravaskuläre Plättchen im Knochenmark existieren und diese nur auf Grund einer vorzeitigen Zerstörung des CD42b-Antigens nach der phagozytären Aufnahme nicht nachweisbar waren. Es wäre denkbar, dass die Makrophagenaktivität, die durch die erhöhte Phagozytose der vorzeitig abgegebenen Plättchen ausgelöst wird, eine Verbindung zur Fibroblastenstimulation hat. Eine gesteigerte Proplättchengeneration in der PMF könnte somit das Risiko der vorzeitigen Plättchenfreigabe innerhalb des Knochenmarkinterstitiums erhöhen und damit die Fibroblasten durch Zytokine aktivieren, sowie an der Entstehung einer Fibrose beteiligt sein.

### 3.5. Thrombospondin (TSP)

Durch den Einsatz der Genexpressions-Arrays, in Verbindung mit der Detektion des Proteins mittels IHC, ergab sich im Rahmen dieser vorliegenden Arbeit mit TSP-1 ein weiteres interessantes Kandidatengen, das an der Entstehung der Fibrose beteiligt sein könnte [152]. TSPs gehören zu den Proteinen der ECM und sind in die Adhäsion, die Motilität und die Proliferation über Integrine involviert [153, 154]. Bei der Regulation der Angiogenese wird TSP-1 eine ambivalente Rolle zugeschrieben. Good *et al.* identifizierten TSP-1 1990 als einen natürlich vorkommenden Angiogenese-Inhibitor [155]. Die Migration und die Proliferation der Endothelien wird direkt durch TSP-1 bzw. TSP-2 gehemmt und die Apoptose induziert. Durch die Bindung an den CD36-Rezeptor der Endothelzellen kommt es zur Hemmung der Proliferation, Einleitung der Apoptose und Inhibierung der Angiogenese [156]. Des Weiteren unterbindet TSP-1 bzw. TSP-2 durch das Hemmen des pro-angiogenen Faktors VEGF die Ausbildung neuer Blutgefäße [157]. TSP-1 inhibiert MMP-9, wodurch es zu einer Reduktion an VEGF kommt [156].

Neben den Publikationen zu dem anti-angiogenen Effekt der TSP-Familie gibt es Forschungsergebnisse, die von einem pro-angiogenen Effekt sprechen [158-160]. Mittels der Bindung an das Integrin assoziierte Protein (CD47) der Endothelien hat das TSP-1 einen zellstimulierenden, proliferativen und migratorischen Effekt [160]. Versuche an einer explantierten Rattenaorta zeigten eine indirekte angiogene Wirkung des TSP-1, indem es das Wachstum von Myofibroblasten fördert [161]. Interessanterweise aktiviert TSP-1 zudem TGF- $\beta$ -1, das als wichtigstes Protein der ECM für die Aktivierung der Fibroblasten und die Matrixsynthese in der PMF gilt

[162, 163]. *In vitro* Untersuchungen zeigten, dass TSP-1 mittels Aktivierung von MMP-9 in Endothelzellen einen pro-angiogenen Effekt hat [164].

Auf Grund der Aktivierung von TGF- $\beta$ -1 durch TSP-1 [165] und des Zusammenhangs zwischen TGF- $\beta$ -1 und der Matrixsynthese stellt TSP-1 ein interessantes Gen bei der Fibrose-Entwicklung dar. Zudem könnte die Fähigkeit von TSP-1, die MMPs zu regulieren, in einem indirekten Effekt auf die Proteolyse resultieren und damit einen Einfluss auf den Abbau der Kollagene und Komponenten der ECM ausüben, sowie für die Bildung neuer Gefäße verantwortlich sein. Morphologisch ist TSP-2 in die Entwicklung der Megakaryozyten, in die Ausbildung der Proplättchenformationen und in die Abgabe der Plättchen an die Sinusoide involviert [166], so dass TSPs auch das aberrante Bild der Knochenmarkhistologie mit induzieren könnten. Die feine Balance zwischen einem pro-angiogenen und einem anti-angiogenen Effekt des TSPs wird für die Bildung neuer Blutgefäße von Bedeutung sein, so dass eine Störung dieses Gleichgewichtes an der Entstehung einer Fibrose beteiligt sein könnte.

Die Expressionsanalysen, auf denen diese Arbeit basiert, ergaben eine signifikante Überexpression von TSP-1 in allen Phasen der PMF im Vergleich mit der altersentsprechenden Hämatopoese. In der Knochenmarkhistologie weisen die PMF und die ET eine vermehrte Anzahl an Megakaryozyten auf; jedoch unterscheidet sich das Expressionsmuster dieser beiden Erkrankungen für TSP-1 voneinander. Im Vergleich mit der ET zeigen die PMF-Patienten eine erhöhte Expression, die jedoch nicht signifikant ist. Um die TSP-1 Expression auch in anderen MPNs bzw. MPN-assoziierten Erkrankungen zu untersuchen, wurden im Verlauf dieser Arbeiten die Philadelphia-Chromosom-positive (Ph<sup>+</sup>) CML und die Chronische myelomonozytäre Leukämie (CMML) analysiert. Bis auf einige Abweichungen ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zu der PMF, der ET und der altersentsprechenden Hämatopoese [152]. Trotz des fehlenden signifikanten Unterschiedes zwischen der PMF und der ET könnte die ausschließlich morphologisch begründete Diagnose der PMF im Vergleich mit der ET durch Expressionsanalysen hinsichtlich TSP-1 gestützt werden. Eine Tendenz für eine gesteigerte Expression in der PMF im Vergleich mit der ET konnte im Rahmen dieser Arbeit bereits in einem kleinen Patientenkollektiv demonstriert werden.

Der Nachweis des Proteins mittels IHC ergab ein sehr ähnliches Bild wie die durchgeführte CD42b-IHC. Ausschließlich in den Megakaryozyten und den Proplättchenformationen innerhalb des Knochenmarkinterstitiums war das Protein

detektierbar. Auf Grund der fehlenden Assoziation zwischen der Proplättchenformation mit Sinusoiden ist eine Schlüsselrolle in der Fibrose-Entwicklung denkbar. Ein möglicher, vorzeitiger Zerfall der Megakaryozyten und somit eine Fragmentierung im Interstitium des Knochenmarkes könnte zu einer Ansammlung pro-fibrotischer Faktoren führen. Diese Akkumulation aktiviert TGF- $\beta$ -1 und inhibiert MMPs und induziert letztendlich eine Fibrose. Die fehlende Detektion des Proteins in den Endothelien mittels TSP-1/CD105 Fluoreszenz-Doppel-Färbung könnte dem potentiellen anti-angiogenesen Effekt widersprechen, da eine gesteigerte Angiogenese in jeder Phase der PMF nachweisbar ist und somit das Protein dort hätte detektiert werden müssen [152]. In der Literatur finden sich Publikationen, in denen TSP-1 in dem DMS von thrombinstimulierten Megakaryozyten nachgewiesen wurde [167]. Das innere DMS der Megakaryozyten gilt als Membranreservoir für die Ausbildung der Pseudopodien, über die, mittels Pseudopodienabschnürungen, die Plättchenbildung und die Abgabe der Plättchen an die Sinusoide erfolgt [168]. Somit könnte TSP-1 auf Grund der Expressionsanalysen und der Knochenmarkmorphologie ein Indikator für eine gesteigerte Angiogenese in der PMF und folglich für die Entstehung einer Fibrose mit verantwortlich sein.

Folglich wurde im Rahmen dieser Arbeit mit den auf molekularer Ebene evaluierten Genen interessante Kandidaten identifiziert, die durch die beschriebene Überexpression eine Dysbalance zwischen der Produktion und dem Abbau der Extrazellulären Matrix, sowie eine Steigerung der Angiogenese induzieren und somit in die Ausbildung einer Fibrose involviert sein können. Morphologisch interessant ist die Darstellung der aberranten Proplättchenformationen, die durch eine gesteigerte Proplättchengeneration das Risiko der vorzeitigen Plättchenfreigabe erhöhen und damit eine Myelofibrose induzieren können.

#### 4. Zusammenfassung

Die definitiven pathologischen Mechanismen, die zur Ausbildung einer Fibrose führen, sind noch weitestgehend unbekannt. Zur Klärung der Fragestellung nach den Entstehungsmechanismen einer Fibrose bzw. Surrogatmarkern wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Muserkrankung mit Fibrosebildung untersucht. Als Beispiel wurde die PMF, die als Neoplasie mit reaktiver Fibrosebildung charakterisiert ist, gewählt. Im Knochenmark sezernieren Megakaryozyten pro-fibrotische Zytokine entweder aktiv oder geben sie passiv bei Zerfallsprozessen frei, so dass Fibroblasten zur Proliferation stimuliert werden, Kollagen-Typ III und -Typ I akkumulieren und eine Fibrose entsteht. Mittels der Pseudopodien erfolgt die Abschnürung maturaer Plättchen von reifen Megakaryozyten in die Sinusoide. Obwohl die Knochenmarkfibrose in enger räumlicher Beziehung zu den Megakaryozyten beginnt, ist wenig über die Proplättchenformation in der PMF und eine mögliche kausale Einbindung in die Matrixbildung bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit war es möglich, die Fluoreszenz-Doppel-Färbung im Knochenmark zu etablieren und die Pseudopodien im Interstitium der PMF mittels CLSM zu detektieren. Reife Megakaryozyten konnten dabei in räumlicher Nähe zu Blutgefäßen lokalisiert werden. Die Analyse der Proplättchendichte ergab eine signifikant erhöhte Anzahl in der manifest fibrotischen PMF. Eine aberrante, gesteigerte Proplättchenbildung könnte somit das Risiko der vorzeitigen Plättchenfreigabe innerhalb des Knochenmarkinterstitiums erhöhen. Hierdurch werden Fibroblasten durch Zytokine aktiviert und die Entstehung einer Myelofibrose wird induziert.

Zur Klärung der Fragestellung nach der Entstehung einer Fibrose wurde eine Vielzahl von Genen ermittelt, die in die TGF- $\beta$ - bzw. BMP-Smad-Signalkaskade involviert sind und einen Einfluss auf die Zellbewegung, die Migration, die Zellproliferation und -Differenzierung haben. FAK ist in den Bereichen der Zell-Matrix-Interaktion lokalisiert und interagiert über Integrine mit der ECM. CD9 wird eine Beteiligung an der, für die PMF charakteristische, verstärkte Ausschwemmung der Vorläuferzellen in das Blut zugeschrieben. Obwohl TSP eine ambivalente Rolle in der Angiogenese beigemessen wird, deuten die hier ermittelten Daten nicht auf einen anti-angiogenen Effekt hin.

Die im Rahmen dieser Arbeit detektierten Gene weisen ein aberrantes Genexpressionsmuster im Vergleich mit der altersentsprechenden Hämatopoese auf

und beeinflussen über Integrine unter anderem die Umbauprozesse der ECM und steigern die Angiogenese. Somit wird eine Dysbalance zwischen der Produktion und dem Abbau der ECM durch viele Gene vermittelt und die Überexpression der ermittelten Gene hat einen Einfluss auf die Bildung neuer Blutgefäße und die Entstehung einer Fibrose.

Die PMF konnte im Rahmen dieser Arbeit als Grundlage methodischer Weiterentwicklungen und als Mustererkrankung für eine reaktive Fibrosebildung zur Erhebung neuer Marker dieses Prozesses analysiert werden.

## 5. Schlussfolgerungen

Für die Diagnosesicherung der PMF ist eine morphologische Untersuchung des Knochenmarkes mittels Beckenkammpunktion und zusätzliche JAK2(V617F)-, MPL(W515L/K)-, IDH(Arg132)- bzw. IDH(Arg172)-Mutationstests unverzichtbar. Jedoch ist die Abgrenzung der Entitäten voneinander nicht ganz trivial, da die klinischen Symptome häufig ineinander übergehen. Eine Verbindung von charakteristischen molekularen Expressionsmustern mit den morphologischen Strukturen zur verbesserten Festlegung der Diagnose könnte für die pathologischen Routineuntersuchungen und die mögliche zielgerichtete Therapie deutliche Vorteile haben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit TSP ein interessantes Gen identifiziert, das nicht nur in die Angiogenese involviert zu sein scheint, sondern auch in der Pathogenese der Fibrose eine bedeutende Rolle spielen könnte. TSP fungiert dabei als ein Indikator für die Entstehung einer Fibrose in der PMF und kann potentiell für therapeutische Ansätze genutzt werden. Über eine Modulation der Expression könnten die Veränderungen des Knochenmarkes von PMF-Patienten, d.h. gesteigerte Angiogenese und Fibrosedynamik, möglicherweise negativ beeinflusst werden und somit einen Therapieansatz durch Regulation darstellen. Eine Wiederherstellung der Balance in der Produktion und dem Abbau der ECM wäre damit möglicherweise zu erreichen. Die im Verlauf der Untersuchungen gewonnenen Ergebnisse bilden die Grundlage, um in weiterführenden Untersuchungen zu evaluieren, ob die Entstehung einer Fibrose durch Regulationsmechanismen unterbunden werden kann bzw. ob die Regenerierungsfähigkeit eines Gewebes erhalten bleibt.

Die erarbeiteten Ergebnisse zur Charakterisierung der Entstehungsmechanismen einer Fibrose deuten darauf hin, dass der Mechanismus nicht auf einem einzigen Ursprung beruht, sondern dass es sich um einen multimodalen Prozess handelt. Bei gesunden Menschen herrscht eine sehr feine Balance von Faktoren, die miteinander im Gleichgewicht stehen. Störungen resultieren in einer Dysbalance und in der Akkumulation von Matrixkomponenten, die zu einer Fibrose führen können.



## 6. Anhang: Manuskripte

Bock, O., Muth, M., Theophile, K., Winter, M., Hussein, K., Büsche, G., Kröger, N. and Kreipe, H., **Identification of new target molecules PTK2, TGFBR2 and CD9 overexpressed during advanced bone marrow remodelling in primary myelofibrosis.**

publiziert Br J Haematol, 2009. 146(5): p. 510-20. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2009.07808.x

### Summary

Primary myelofibrosis (PMF) is a myeloproliferative neoplasm characterized by remodelling of the bone marrow including progressive myelofibrosis and exaggerated angiogenesis. Advanced PMF frequently shows a full-blown fiber meshwork which avoids aspiration of cells and expression profiling of genes related to stroma pathology at this stage remains largely undetermined.

We investigated bone marrow core biopsies in PMF showing various degrees of myelofibrosis by custom made low density arrays (LDA) representing target genes with designated roles in synthesis of extracellular matrix, matrix remodelling, cellular adhesion and motility.

Among a set of 11 genes up-regulated in advanced stages of PMF ( $p \leq 0.01$ ) 3 candidates, the focal adhesion kinase (*FAK*), the transforming growth factor  $\beta$  type II receptor (*TGFBR2*) and the motility-related protein-1 (*CD9*), were investigated in more detail.

*FAK*, *TGFBR2* and *CD9* were significantly overexpressed in larger series of advanced PMF stages ( $p \leq 0.01$ , respectively). Endothelial cells of the increased microvessel network in PMF could be identified as a predominant source for *FAK*, *TGFBR2* and *CD9*. *CD9* also strongly labelled activated fibroblasts in advanced myelofibrosis.

We conclude that *FAK*, *TGFBR2* and *CD9* represent new target molecules involved in bone marrow remodelling of PMF which warrant further investigation for potential targeted therapy.

**Key words:** low density array, gene expression profiling, bone marrow remodelling, primary myelofibrosis

## Introduction

Primary myelofibrosis (PMF) is a Philadelphia-chromosome negative myeloproliferative neoplasm (Ph<sup>-</sup> MPN) evolving to progressive myelofibrosis, exaggerated angiogenesis, and aberrant synthesis of bone matrix [Tefferi, 2005a]. Molecular defects such as mutations in Janus kinase 2 (JAK2 - V617F) or myeloproliferative leukemia virus oncogene (MPL - W515L/K) are demonstrable in 50% - 60% of cases in haematopoietic cells but the expanding stroma cell compartment is thought to be reactive in nature [Tefferi, 2005; Spivak & Silver, 2008]. A number of cytokines and growth factors derived from megakaryocytes and monocytes are presumably involved in the proliferation of fibroblasts and endothelial cells in PMF [Lataillade *et al*, 2008]. It appears that cellular decay and passive efflux along with inducible secretion contributes to the bone marrow environment enriched by fibrogenic and angiogenic cytokines [Lataillade *et al*, 2008]. Recent data from our group showed no evidence for increased apoptosis of megakaryocytes in PMF as a potential cause for premature decay and cytokine release [Theophile *et al*, 2008a]. Indeed, relevant pro-apoptotic factors such as BNIP3 were down-regulated as shown by profiling of apoptosis-related genes. It therefore appears likely that other mechanisms such as the so-called “para-apoptosis” [Centurione *et al*, 2004; Thiele *et al*, 1997a] might be involved in increased megakaryocyte turnover because cellular remnants (“naked nuclei”) are frequently demonstrable in the bone marrow of PMF [Thiele *et al*, 1997a].

The switch from the hypercellular, pre-fibrotic phase to the stage of matrix accumulation in PMF has not yet been defined, neither by morphological nor by molecular markers. Due to the extended fibre meshwork the access to cellularity in advanced PMF is often hampered by “dry tap”. Therefore, core biopsies are the only source for investigation of the dynamics of myelofibrosis in comparison to the cellular stages. By taken advantage of the molecular techniques applicable on fixed and embedded tissues, we and others already described relevant factors involved in stroma remodelling of PMF [Bock *et al*, 2006a; Xu *et al*, 2005; Bock *et al*, 2008b; Bock *et al*, 2005c]. However, the investigation of single candidates potentially important for stroma pathology is time-consuming and screening approaches by gene expression arrays would be of merit. Unfortunately, the limited concentration of mRNA in a processed core biopsy prevents the application of large-scale array technology. To overcome these technical limitations we recently established a pre-

amplification strategy for cDNA followed by low density gene expression arrays (LDA) for investigation of total cellularity and isolated megakaryocytes in PMF [Theophile *et al*, 2008a, Theophile *et al*, 2008b]. The custom made LDA represent a number of target genes ranging from 12 up to 384 and is appropriate for a straightforward screening of designated candidate genes [Theophile *et al*, 2008b; Tothill *et al*, 2005; Hartmann *et al*, 2008].

In order to gain insights in stroma -related gene alterations in PMF bone marrow we currently established a LDA representing 45 genes involved in matrix synthesis, matrix remodelling, angiogenesis, adhesion and motility. We investigated a series of PMF showing different degrees of myelofibrosis and normal haematopoiesis. We also tested cases of essential thrombocythemia (ET) for potential differences compared to PMF. By LDA, we identified 11 genes which are overexpressed in advanced stages of PMF and 1 gene exclusively up-regulated in ET. From the aberrantly expressed gene set in advanced PMF we selected 3 hitherto unattended candidates for a more extended analysis: the focal adhesion kinase (*FAK*), the transforming growth factor  $\beta$  type II receptor (*TGFBR2*) and *CD9*.

## Material and Methods

### Study group

Formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) bone marrow trephines diagnosed according to the World Health Organization (WHO) criteria 2008 [Tefferi & Vardiman, 2008b] were retrieved from the bone marrow registry of the Institute of Pathology, Hannover Medical School. For LDA hypercellular, prefibrotic PMF (n = 8), advanced PMF (n = 4), ET (n = 4), and 8 control cases were selected. Patients' characteristics are summarized in Table 1.

For re-evaluation of candidate genes in an independent, larger series 2 PMF groups were established according to the presence and degree of myelofibrosis (mf) as determined by silver impregnation (Gomori) according standard procedures [Thiele *et al*, 2005b]. Accordingly, PMF cases were assigned to the group of hypercellular, prefibrotic PMF (n = 37) or to the group showing advanced myelofibrosis (n = 33). ET cases were likewise re-evaluated according to WHO 2008. Control cases displayed normal haematopoiesis in line with age and were indicated to exclude a haematological disorder in the presence of a clinically transient thrombocytopenia, a mild thrombocytosis or mild leukocytosis (n = 17), Table 2.

Archival spleen tissue was retrieved from a PMF patient who underwent splenectomy due to symptomatic splenomegaly and for whom extramedullary haematopoiesis (EMH) was demonstrable. Two representative areas (2 paraffin blocks) of EMH in this spleen were selected for further investigation. Control spleen tissue was retrieved from 2 patients following splenectomy due to traumatic injury or otherwise indicated surgical procedure. Splens in controls showed no histopathological evidence for a neoplastic or otherwise suspicious cellular infiltration.

Following Ficoll-density separation of peripheral blood in 3 PMF patients and the bone marrow aspirate of one healthy donor CD34<sup>+</sup> cells were purified by immunomagnetic selection according to MACS® (Magnetic cell separation, Miltenyi Biotech GmbH, 51429 Bergisch Gladbach, Germany).

Quantification of potential mutant allele burden of *JAK2* (V617F) and *MPL* (W515L/K) in PMF and ET bone marrow cells was performed using Pyrosequencing® assays as described [Bock *et al*, 2006a].

### **Low density arrays**

A set of 45 genes of interest and 2 reference genes (*RNA-polymerase 2*, *β-GUS*) was chosen for custom made TaqMan Low Density Arrays (LDA; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), Supplement 1. Another selection criterion for recruitment of target genes was an amplicon size smaller than 100 bp enabling reliable gene expression analysis by LDA in FFPE bone marrows as described [Theophile *et al*, 2008a, Theophile *et al*, 2008b]. The reference gene GAPDH was not selected by ourselves but declared to be mandatory on LDA according to the distributor. The gene set was spotted 8-fold (8 x 48) in a 384-well plate allowing concomitant investigation of 8 samples per run. To this end, total RNA was extracted from bone marrow core biopsies as described [Bock *et al*, 2006a]. The arrays were loaded with 20 µL complimentary DNA (cDNA) generated from 1µg total RNA by means of the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 30 µL HPLC-H<sub>2</sub>O (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA), and 50 µL Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The TaqMan low density arrays were performed as single runs on a 7900HT Fast Real-Time PCR system and recorded by the 7900HT SDS 2.3 software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

### Real-time RT-PCR

RNA from bone marrow core biopsies, spleen and CD34+ cells was transcribed into the complementary DNA by means of the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Real-time RT-PCR was performed on an ABI PRISM 7500 Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using the individual TaqMan Gene Expression Assays for *FAK* (alias *protein tyrosine kinase 2*; *PTK2*; hs00178587\_m1, 68 bp amplicon), *TGFBR2* (*transforming growth factor,  $\beta$  receptor II*; hs00559661\_m1, 74 bp amplicon) and the housekeeping genes  $\beta$ -*GUS* ( $\beta$ -*Glucuronidase*, *GUSB*, hs99999908\_m1, 81 bp amplicon) and *RNA polymerase 2A* (*POLR2A*: Hs00172187\_m1, 61 bp amplicon); all assays were purchased from Applied Biosystems, Foster City, CA, USA. Re-evaluation of *SMAD3* mRNA expression in PMF, ET, and controls was performed likewise by using the individual *SMAD3* TaqMan Gene Expression Assay (hs00706299\_s1, 64 bp amplicon, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

For re-evaluation of *CD9* mRNA expression, RNA (1  $\mu$ g), pretreated with RNase free (Rnase<sup>-</sup>) DNase (1U/ $\mu$ g RNA; RQ1, Promega, Madison, WI, USA), was transcribed into the cDNA using 500 ng random hexamer primer (Amersham Pharmacia, Picattaway, CA, USA) and 200 U of SuperScript II Rnase<sup>-</sup> Reverse Transcriptase (Invitrogen, Karlsruhe, Germany). Home-brewed primers and probe were then applied as follows: *CD9*-F 5'- ACGCTGAAAGCCATCCACTATG, *CD9*-R 5'- AAGGTTTCGAGTACGTCCTTCTTGG, *CD9* probe 5' - ttgaacTGCTGTGGTTTGGCTGGGG (NM 001769.2, 104 bp amplicon). A likewise home-brewed TaqMan assay was specifically applied for quantification of *CD9* relative to reference gene  $\beta$ -*GUS* in the identical cDNA preparation by using  $\beta$ -*GUS* forward 5'- CTCATTTGGAATTTTGCCGATT – 3',  $\beta$ -*GUS* reverse 5'- CCGAGTGAGATCCCCTTTTTA – 3', and  $\beta$ -*GUS* probe 5'- TGAACAGTCACCGACGAGAGTGCTGG – 3' (NM 000181, 81 bp amplicon).

Linearity of amplification for target and reference genes under investigation could be demonstrated over a broad concentration range in a cDNA dilution series enabling relative quantification in at least 2 independent runs using the  $\Delta\Delta$ CT – method as previously described [Livak & Schmittgen, 2001].

## Immunohistochemistry

Immunohistochemistry on bone marrow and spleen sections was performed using the ZytoChem-Plus HRP Polymer-Kit (Zytomed Systems GmbH, Berlin, Germany) and a DAB Substrate High Contrast kit (Zytomed Systems GmbH, Berlin, Germany). Sections (1 - 2  $\mu\text{m}$ ) were deparaffinised and treated with 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  for 10 min. Following pre-treatment in a pressure cooker for retrieval of antigens, sections were incubated for 1 hour with antibodies against FAK, TGFBR2, and CD9 by using a mouse monoclonal anti-human FAK antibody raised against amino acids 903 – 1052 of the mature protein (1:100 dilution, H-1, sc-1688, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA); TGFBR2 was stained with a mouse monoclonal anti-human TGFBR2 antibody raised against amino acids 1 – 567 of the mature protein (1:100 dilution, D-2, sc-17799, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA). CD9 was detected by a monoclonal mouse anti-human CD9 antibody (1:100 dilution, Clone 72F6, GTX75373, GeneTex®, Inc., San Antonio, Texas, USA). Positive control for FAK and TGFBR2 were cells from colon carcinoma metastasized to the liver. Megakaryocytes served as endogenous controls for CD9 immunoreactivity.

## Statistical analyses and graphics

In the bone marrow study group 1way analysis of variance (ANOVA) tests were performed followed by Dunnett's multiple comparison tests. For potential differences of gene expression in spleen tissues and CD34+ cells, unpaired t tests were applied. Probability values  $\leq 0.05$  were considered as statistically significant. Graphics were designed using GraphPadPrism, Version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## Results

### **A set of 11 genes was identified by LDA to be overexpressed in advanced PMF**

From 45 genes selected to determine stroma-related gene expression in PMF, we identified 11 genes which are significantly overexpressed in advanced PMF at least 2-fold or higher. This set comprised genes directly associated with matrix components (collagen types *COL3A1*, *COL4A2*) or collagen processing (*LOX*), induction of matrix synthesis (*TGFB1*, *TGFBR2*, *THBS1*) and matrix remodelling (*BMP2*, *MMP2*, *TIMP1*). We further identified the motility-related protein-1 (*CD9*) and the focal adhesion kinase (*FAK*) to be overexpressed in advanced PMF (Figure 1).

Other genes with designated or proven roles in matrix remodelling (i.e. *BMP4*, *BMP6*, *BMP7*, *MMP1*, *MMP13*, *MMP14*, *PLOD2*, *SERPINE1*, *PLAT*, *GREM1*) were overexpressed in advanced PMF as well but lacked statistical significance. An underlying mutation in *JAK2* (V617F) was not associated with a particular expression level of a target gene. For a comprehensive review of the results obtained by LDA expression profiling, see Figure 1 and Table 2.

### **Re-evaluation: FAK, TGFBR2 and CD9 are overexpressed in advanced stages of PMF**

Re-evaluation of *FAK*, *TGFBR2*, and *CD9* in a larger series of cases confirmed the significantly higher mRNA expression in the advanced stages of PMF. The most significant differences between the advanced cases and both the prefibrotic PMF stage and controls were demonstrable for *FAK* (median 4.1, range 0.6 – 10.9,  $p < 0.0001$ ) and *TGFBR2* (median 2.4, range 1.1 – 6.0,  $p < 0.0001$ ). *CD9* was higher expressed by up to 8-fold (median 1.7, range 0.2 – 8.0,  $p < 0.05$ ), Figure 2. An underlying *JAK2* (V617F) did not correlate with a particular aberrant level of *FAK*, *TGFBR2* and *CD9*, respectively ( $p > 0.05$ ).

### **Endothelial cells expressed FAK, TGFBR2 and CD9 in PMF and controls – CD9 labelled fibroblasts exclusively in advanced PMF**

*FAK* was expressed by endothelial cells in PMF and in normal haematopoiesis (Figure 3 A, B, B insert). Capillaries of smaller size and sinusoids showed only faint staining. Megakaryocytes were also stained for *FAK* (white arrow in A, black arrow in insert of B).

*TGFBR2* labelled the extended sinusoids and endothelial cells of small capillaries in PMF bone marrows (Figure 3 C, insert in C) and in controls (D). Megakaryocytes within bone marrow but also within sinusoids in PMF were stained for *TGFBR2* (insert in C, white arrow). Besides endothelial cells and megakaryocytes (Figure 3 E, black arrow in insert E.2), *CD9* additionally stained activated fibroblasts in areas of advanced fibrosis in PMF (Figure 3E, solid black arrow in insert E.1). In PMF occasionally osteoblasts lining the bone matrix also showed *CD9* staining (Figure 3 E, dotted black arrow in insert E.1). *CD9* strongly labelled normal megakaryocytes in control haematopoiesis (Figure 3 F).

**Expression of FAK, TGFBR2 and CD9 in CD34+ cells**

All 3 factors under investigation were heterogeneously expressed on the mRNA level in CD34+ cells of 3 PMF patients compared to the control. FAK mRNA was expressed in a range of 0.2 – 1.3 (median 0.7,  $p = 0.5751$ ), TGFBR2 showed a level between 0.6 – 1.1 (median 0.9,  $p = 0.0928$ ) and CD9 was overexpressed by up to 2.8-fold (median 1.0, range 0.7 – 2.8,  $p = 0.5368$ ), Figure 4 B, D, F, respectively.

**Expression of FAK, TGFBR2 and CD9 in PMF spleen showing extramedullary haematopoiesis**

FAK mRNA was overexpressed by up to 2.5-fold in the PMF spleen (mean 2.0, range 1.6 – 2.5) compared to controls (mean 1.0, range 0.6 – 1.4,  $p = 0.0553$ ), Figure 4 A. Endothelial cells and megakaryocytes were predominantly labelled for FAK protein, normal spleen showed FAK positive vessels (not shown).

TGFBR2 mRNA expression showed no difference between the PMF spleen (mean 1.0, range 0.8 – 1.3) and controls (mean 1.0, range 0.7 – 1.4), Figure 4 C. A positivity for endothelial TGFBR2 protein was demonstrable in PMF and normal spleen (not shown).

CD9 was significantly overexpressed by up to 4.4-fold (mean 3.9, range 3.4 – 4.4) compared to control spleens (mean 1.0, range 0.8 – 1.2,  $p < 0.001$ ), Figure 4 E. CD9 strongly marked megakaryocytes and endothelial cells in PMF spleen (Figure 5), normal spleen also showed labelling in endothelial cells (not shown).

**SMAD3 mRNA expression in ET and PMF**

*SMAD3* was a candidate gene potentially discriminating ET from PMF by LDA analysis with a mean of 8.8-fold higher expression compared to hypercellular PMF (mean 3.9) and advanced PMF (mean 5.1), (Figure 1). We re-evaluated *SMAD3* mRNA expression by real-time RT-PCR in a series of 10 hypercellular PMF (mf 0), 8 ET, and 10 controls. By average, a small tendency to higher *SMAD3* mRNA expression was demonstrable in ET (median 1.5, range 0.3 – 4.1) as compared to PMF (median 1.3, range 0.8 – 2.5) and controls (median 1.2, range 0.4 – 1.6) without being of statistical significance (Supplement 2).



## Discussion

Remodelling of the bone marrow stroma in progressive PMF affects vessel density, extracellular matrix components and bone. A large number of effector molecules such as growth factors, their receptors and subsequent downstream signalling pathways are involved in these changes of the histopathological phenotype [Lataillade *et al*, 2008]. However, in advanced PMF profiling of designated key remodelling factors has yet been hampered due to the dense fibre meshwork which avoids aspiration and thus access to bone marrow cells.

The gene repertoire on the LDA (“fibrosis chip”) was assembled according to the current knowledge on bone marrow stroma pathology including matrix synthesis (fibrosis), matrix remodelling, cellular adhesion and motility [Tefferi, 2005a; Lataillade *et al*, 2008; Xu *et al*, 2005; Kuter *et al*, 2007]. Previous findings of our own studies on PMF pathology additionally contributed to the selection of genes [Bock *et al*, 2006a, 2008b, 2005c].

Among 11 genes shown to be overexpressed in advanced PMF we found some important candidates with important roles in matrix remodelling (MMPs, BMPs), induction of matrix synthesis (*TGFB1*, *THBS1*) and genes involved in collagen assembly such as *LOX* or different collagen types themselves (Figure 1).

Overexpression of the TGF $\beta$  type II receptor, TGFBR2, was not entirely unexpected because one of its ligands, TGF $\beta$ -1, is known to be overexpressed in PMF as well [Tefferi, 2005a; Lataillade *et al*, 2008]. More surprising, however, was the fact that besides its proven role in induction of matrix synthesis, i.e. fibrosis, TGF $\beta$  signalling also might play a role in PMF angiogenesis. This, because endothelial cells were the most prominent cellular lineage labelled for TGFBR2 in PMF (Figure 3 C). Angiogenesis-related TGF $\beta$  signalling depends on the type of stimulated activin-like kinase (ALK), i.e. ALK5 keeps endothelial cells in a quiescent state whereas signalling via ALK1 induces endothelial cell proliferation [Goumans *et al*, 2009a]. TGF $\beta$ -1 predominantly activates ALK5 via TGFBR2 and therefore does not directly stimulate angiogenesis. However, it was shown that signalling by TGFBR2 is also important for sufficient ALK1 activation [Goumans *et al*, 2002b]. Moreover, direct activation of ALK1 following binding of BMPs to their BMP receptor complexes or activation of its co-receptor endoglin is likely to be involved in PMF angiogenesis. Endoglin (CD105) acts pro-angiogenic via TGFBR2 and BMP receptors [ten Dijke *et al*, 2008] and its overexpression was previously shown in PMF [Ponzoni *et al*, 2004].

In addition, also BMPs were recently shown to be also overexpressed in PMF where BMP expression could be located in endothelial cells [Bock *et al*, 2008b]. Thus, a positive feed-back loop appears to be active which comprises increased angiogenesis due to mitogenic stimuli of growth factors such as VEGF and bFGF [Lataillade *et al*, 2008; Steurer *et al*, 2007; Gianelli *et al*, 2007] which then leads to an increased overall TGFBR2 level by endothelial cells. Susceptibility of TGFBR2 for pro-angiogenic BMP and endoglin signalling then further stimulates endothelial cell sprouting [ten Dijke *et al*, 2008]. Because endothelial cells in control haematopoiesis also showed TGFBR2 staining this underlines the physiological role of the TGF $\beta$  family in normal vessel formation. Accordingly, proliferating endothelial cells in PMF do not presume clonality rather than a reaction to the pure overload of growth factors which effectively induce angiogenesis. Interestingly, TGFBR2 was previously shown to be reduced in other MPN subtypes than PMF, i.e. chronic myeloid leukemia, ET and polycythemia vera [Rooke *et al*, 1999]. Therefore, up-regulated TGFBR2 in PMF angiogenesis might be an interesting candidate for further investigations on TGFBR2 downstream signals and potential therapeutic targeting.

The cellular focal adhesion kinase FAK (alias protein tyrosine kinase 2, PTK2) concentrates in areas of cell-matrix-interaction and promotes signal transduction following cellular integrin binding to matrix components. It will also be activated by cytokine receptors such as CXCR4 after binding of stromal-derived factor 1 $\alpha$  [Glodek *et al*, 2007], an axis previously shown to be involved in aberrant progenitor trafficking in PMF [Migliaccio *et al*, 2008]. However, FAK overexpression in PMF can also be related to another aberration induced by TGF $\beta$  signalling. As previously shown in a model of TGF $\beta$ -1 stimulated kidney fibrosis the synthesis of collagen type I was dependent on FAK activation [Hayashida *et al*, 2007]. Endothelial cells are unlikely to be involved in notable matrix synthesis in PMF but nevertheless TGFBR2 activation by TGF $\beta$ -1 with subsequent recruitment of FAK can induce alterations in endothelial cell phenotypes. Indeed, sprouting and abnormal extension of vessel structures are typical histopathological features in PMF bone marrows [Lundberg *et al*, 2000] and FAK activation is essential for sufficient endothelial cell formation [Carmona *et al*, 2009]. FAK is probably another effector molecule acting in concert with other TGF $\beta$ -related signalling events in PMF.

CD9 (alias motility-related protein 1) is known to be expressed by various human tissues and its physiological role comprises promotion of cell motility and migration

but also cellular proliferation and differentiation [Nakamura *et al*, 2001]. In normal blood cells, expression of CD9 has been demonstrated in eosinophiles, basophiles, B and T cells but also platelets [Clay *et al*, 2001; Maecker *et al*, 1997]. Because a previous study showed that platelet-derived CD9 is involved in endothelial cell proliferation [Ko *et al*, 2006], expression by megakaryocytes and endothelial cells in PMF (Figure 2 C, Figure 3 E) suggests a concerted action. Interestingly, in a recent study on gene expression profiling in CD34-positive (CD34+) cells sorted from peripheral blood in PMF patients CD9 was shown to be overexpressed [Guglielmelli *et al*, 2007]. Based on abnormally high trafficking of CD34+ cells from bone marrow to peripheral blood in PMF [Barosi *et al*, 2001], CD9 could be involved in the increased mobilization. The indistinct CD9 mRNA level in CD34+ cells in PMF in our study is most likely due to the small number of patients and not contradictory to the results obtained by Guglielmelli *et al*. However, we found a strong CD9 mRNA increase in EMH of PMF spleen (Figure 4 E) which could be assigned predominantly to megakaryocytes but also some progenitors and endothelial cells (Figure 5). Overexpression of CD9 in PMF bone marrow is apparently reproducible in EMH of PMF and supplements existing data on PMF pathology in distant organs such as spleen (Barosi *et al.*, 2004b).

The role of CD9-positive fibroblasts remains a matter of future investigations. In a preliminary experiment, we cultured 2 primary fibroblast cell lines with TGF $\beta$ -1 and bFGF. Both factors similarly increased CD9 mRNA in these cells by 2-fold (data not shown). If this induction plays any role in matrix-remodelling this needs to be further explored.

Because expression of TGFBR2, FAK and CD9 is apparently linked to at least 2 relevant features in PMF, i.e. angiogenesis which in turn facilitates progenitor cell trafficking (which involve reactive cell populations and the malignant clone himself), we believe that these aberrations justify further attention regarding a potential therapeutic targeting.

### **Acknowledgements**

The authors are grateful to Ms. Sabine Schröter and Ms. Anna-Lena Becker for excellent technical assistance.

## References

- Barosi G, Viarengo G, Pecci A, Rosti V, Piaggio G, Marchetti M, Frassoni F (2001a). Diagnostic and clinical relevance of the number of circulating CD34(+) cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* 98(12):3249-55.
- Barosi G, Rosti V, Massa M, Viarengo GL, Pecci A, Necchi V, Ramaioli I, Campanelli R, Marchetti M, Bazzan M, Magrini U. (2004b) Spleen neoangiogenesis in patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *British Journal of Haematology*.124(5):618-25.
- Bock O, Neuse J, Hussein K, Brakensiek K, Buesche G, Buhr T, Wiese B, Kreipe H (2006a) Aberrant collagenase expression in chronic idiopathic myelofibrosis is related to the stage of disease but not to the JAK2 mutation status. *American Journal of Pathology*. 169(2):471-81.
- Bock O, Höftmann J, Theophile K, Hussein K, Wiese B, Schlué J, Kreipe H (2008b) Bone morphogenetic proteins are overexpressed in the bone marrow of primary myelofibrosis and are apparently induced by fibrogenic cytokines. *American Journal of Pathology*. 172(4):951-60.
- Bock O., Loch G., Schade U., Büsche G., von Wasielewski R., Wiese B., Kreipe H (2005c) Osteosclerosis in advanced chronic Idiopathic myelofibrosis is associated with endothelial overexpression of Osteoprotegerin (OPG). *British Journal of Haematology*. 160(1): 76-82.
- Carmona G, Göttig S, Orlandi A, Scheele J, Bäuerle T, Jugold M, Kiessling F, Henschler R, Zeiher AM, Dimmeler S, Chavakis E (2009). Role of the small GTPase Rap1 for integrin activity regulation in endothelial cells and angiogenesis. *Blood*.113(2):488-97.
- Centurione L, Di Baldassarre A, Zingariello M, Bosco D, Gatta V, Rana RA, Langella V, Di Virgilio A, Vannucchi AM, Migliaccio AR (2004). Increased and pathologic emperipolesis of neutrophils within megakaryocytes associated with marrow fibrosis in GATA-1(low) mice. *Blood*.104(12):3573-80.
- Clay D, Rubinstein E, Mishal Z, Anjo A, Prenant M, Jasmin C, Boucheix C, Le Bousse-Kerdilès MC (2001). CD9 and megakaryocyte differentiation. *Blood* 97(7):1982-9.
- Gianelli U, Vener C, Raviele PR, Savi F, Somalvico F, Calori R, Iurlo A, Radaelli F, Fermo E, Bucciarelli P, Bori S, Coggi G, Delilieri GL (2007). VEGF expression

- correlates with microvessel density in Philadelphia chromosome-negative chronic myeloproliferative disorders. *American Journal of Clinical Pathology*. 128(6):966-73.
- Glodek AM, Le Y, Dykxhoorn DM, Park SY, Mostoslavsky G, Mulligan R, Lieberman J, Beggs HE, Honczarenko M, Silberstein LE (2007). Focal adhesion kinase is required for CXCL12-induced chemotactic and pro-adhesive responses in hematopoietic precursor cells. *Leukemia*. 21(8):1723-32.
- Goumans MJ, Liu Z, ten Dijke P (2009a). TGF-beta signaling in vascular biology and dysfunction. *Cell Research*. 19(1):116-27.
- Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, ten Dijke P (2002b). Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO Journal*. 21(7):1743-53.
- Guglielmelli P, Zini R, Bogani C, Salati S, Pancrazzi A, Bianchi E, Mannelli F, Ferrari S, Le Bousse-Kerdilès MC, Bosi A, Barosi G, Migliaccio AR, Manfredini R, Vannucchi AM (2007) Molecular profiling of CD34+ cells in idiopathic myelofibrosis identifies a set of disease-associated genes and reveals the clinical significance of Wilms' tumor gene 1 (WT1). *Stem Cells*. 25(1):165-73.
- Hartmann E, Fernández V, Moreno V, Valls J, Hernández L, Bosch F, Abrisqueta P, Klapper W, Dreyling M, Hoster E, Müller-Hermelink HK, Ott G, Rosenwald A, Campo E (2008). Five-gene model to predict survival in mantle-cell lymphoma using frozen or formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Journal of Clinical Oncology*. 26(30):4966-72.
- Hayashida T, Wu MH, Pierce A, Poncelet AC, Varga J, Schnaper HW (2007). MAP-kinase activity necessary for TGFbeta1-stimulated mesangial cell type I collagen expression requires adhesion-dependent phosphorylation of FAK tyrosine 397. *Journal of Cell Science*. 120(Pt 23):4230-40.
- Ko EM, Lee IY, Cheon IS, Kim J, Choi JS, Hwang JY, Cho JS, Lee DH, Kang D, Kim SH, Choe J (2006). Monoclonal antibody to CD9 inhibits platelet-induced human endothelial cell proliferation. *Molecular Cells*. 22(1):70-7.
- Kuter DJ, Bain B, Mufti G, Bagg A, Hasserjian RP (2007). Bone marrow fibrosis: pathophysiology and clinical significance of increased bone marrow stromal fibres. *British Journal of Haematology*. 139(3):351-62.
- Lataillade JJ, Pierre-Louis O, Hasselbalch HC, Uzan G, Jasmin C, Martyre MC, Le Bousse-Kerdiles MC (2008). Does primary myelofibrosis involve a defective stem cell niche? From concept to evidence. *Blood*. 112(8):3026-35.

- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* 25:402-8.
- Lundberg LG, Lerner R, Sundelin P, Rogers R, Folkman J, Palmblad J (2000). Bone marrow in polycythemia vera, chronic myelocytic leukemia, and myelofibrosis has an increased vascularity. *American Journal of Pathology*. 157(1):15-9.
- Maecker HT, Todd SC, Levy S (1997). The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB Journal*. 11(6):428-42.
- Migliaccio AR, Martelli F, Verrucci M, Migliaccio G, Vannucchi AM, Ni H, Xu M, Jiang Y, Nakamoto B, Papayannopoulou T, Hoffman R (2008). Altered SDF-1/CXCR4 axis in patients with primary myelofibrosis and in the Gata1 low mouse model of the disease. *Experimental Hematology*.36(2):158-71.
- Nakamura Y, Handa K, Iwamoto R, Tsukamoto T, Takahasi M, Mekada E (2001). Immunohistochemical distribution of CD9, heparin binding epidermal growth factor-like growth factor, and integrin alpha3beta1 in normal human tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*.; 49(4):439-44.
- Ponzoni M, Savage DG, Ferreri AJ, Pruneri G, Viale G, Servida P, Bertolini F, Orazi A (2004). Chronic idiopathic myelofibrosis: independent prognostic importance of bone marrow microvascular density evaluated by CD105 (endoglin) immunostaining. *Modern Pathology*.17(12):1513-20.
- Rooke HM, Vitas MR, Crosier PS, Crosier KE (1999). The TGF-beta type II receptor in chronic myeloid leukemia: analysis of microsatellite regions and gene expression. *Leukemia*.13(4):535-41.
- Spivak JL, Silver RT (2008) The revised World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocytosis, and primary myelofibrosis: an alternative proposal. *Blood*.112(2):231-9.
- Steurer M, Zoller H, Augustin F, Fong D, Heiss S, Strasser-Weippl K, Gastl G, Tzankov A (2007). Increased angiogenesis in chronic idiopathic myelofibrosis: vascular endothelial growth factor as a prominent angiogenic factor. *Human Pathology*.38(7):1057-64.
- Tefferi A (2005a). Pathogenesis of myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Journal of Clinical Oncology*. 23:8520-30.
- Tefferi A, Vardiman JW (2008b). Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia*. 22(1):14-22.

- ten Dijke P, Goumans MJ, Pardali E (2008) Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. *Angiogenesis*.;11(1):79-89.
- Theophile K, Hussein K, Kreipe H, Bock O (2008a). „Expression profiling of apoptosis-related genes in megakaryocytes: BNIP3 is down-regulated in primary myelofibrosis”, *Experimental Hematology*. 36(12):1728-38.
- Theophile K, Jonigk D, Kreipe H, Bock O (2008b). “Amplification of mRNA From Laser-microdissected Single or Clustered Cells in Formalin-fixed and Paraffin-embedded Tissues for Application in Quantitative Real-time PCR”, *Diagnostic Molecular Pathology*. 17(2):101-6.
- Thiele J, Lorenzen J, Manich B, Kvasnicka HM, Zirbes TK, Fischer R (1997a). Apoptosis (programmed cell death) in idiopathic (primary) osteo-/myelofibrosis: naked nuclei in megakaryopoiesis reveal features of para-apoptosis. *Acta haematologica* 97(3):137-43.
- Thiele J, Kvasnicka HM, Facchetti F, Franco V, van der Walt J, Orazi A (2005b). European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. *Haematologica*. 90(8):1128-32.
- Tothill RW, Kowalczyk A, Rischin D, Bousioutas A, Haviv I, van Laar RK, Waring PM, Zalcborg J, Ward R, Biankin AV, Sutherland RL, Henshall SM, Fong K, Pollack JR, Bowtell DD, Holloway AJ (2005). An expression-based site of origin diagnostic method designed for clinical application to cancer of unknown origin. *Cancer Research*.65(10):4031-40.
- Xu M, Bruno E, Chao J, Huang S, Finazzi G, Fruchtman SM, Popat U, Prchal JT, Barosi G, Hoffman R; MPD Research Consortium (2005). Constitutive mobilization of CD34+ cells into the peripheral blood in idiopathic myelofibrosis may be due to the action of a number of proteases. *Blood* 105(11):4508-15.

**Table 1**

	PMF mf 0 n = 8	PMF mf 3 n = 4	ET n = 4	Controls n = 8
Erythrocytes [10 <sup>6</sup> /μl]	4.6 (3.3 – 6.7)	3.4 (2.1 – 4.6)	4.8 (4.4 – 5.0)	4.9 (4.4 – 5.8)
Hemoglobin [g/dl]	13.4 (9.2 – 18.1)	9.8 (6.7 – 12.7)	14.6 (14.0 – 15.4)	13.3 (9.8 – 15.5)
Hematocrit [%]	41.0 (30.2 – 56.7)	30.0 (23 – 39.4)	43.0 (42.7 – 44.2)	40.2 (38.7 – 44.0)
Leukocytes [10 <sup>3</sup> /μl]	13.9 (6.9 – 18.4)	6.4 (3.0 – 21.6)	7.9 (6.7 – 9.5)	5.3 (4.8 – 8.2)
Platelets [10 <sup>3</sup> /μl]	800 (530 – 1340)	322 (41 – 1263)	739 (630 – 968)	250 (165 – 269)
Age [yrs.]	72 (54 – 88)	73 (66 – 79)	58 (37 – 74)	58 (19 – 71)
Sex [male/female]	3/5	3/1	2/2	5/3
Splenomegaly	1	4	1	not documented
JAK2 (V617F), n = Mutant allele burden	4 34% – 63%	2 30% - 33%	2 29% - 55%	none
MPL (W515L/K)	none	none	none	none

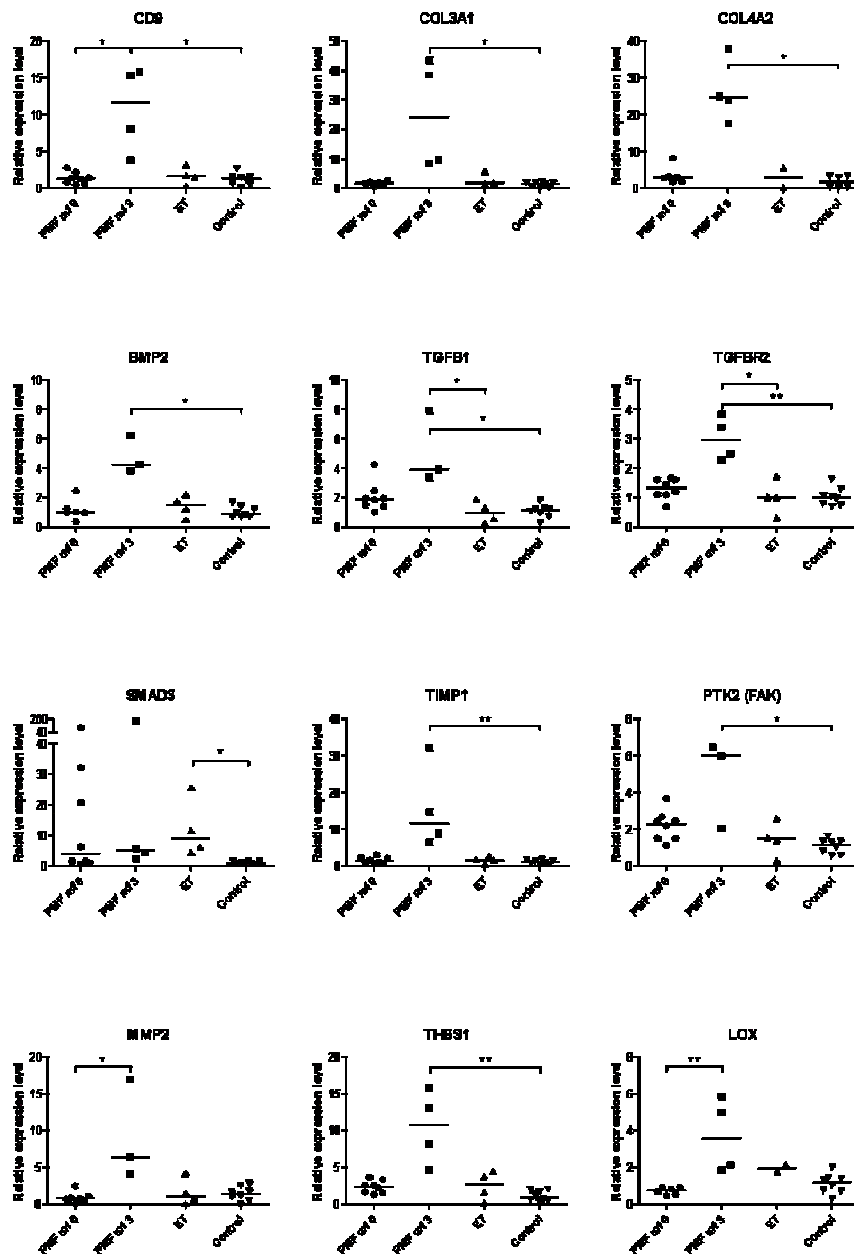
Patients clinical parameter. Each sample was investigated separately by LDA (no pooling).



Table 2

	Cellular PMF		Advanced PMF		Controls
	<i>JAK2</i> <sup>V617F</sup>	<i>JAK2</i> <sup>wt</sup>	<i>JAK2</i> <sup>V617F</sup>	<i>JAK2</i> <sup>wt</sup>	
Cases, n =	18	19	19	14	17
Mutant allele burden [%]	34 (5 – 61)		42 (17 – 92)		
Age	71 (34 - 83)	66 (46 - 85)	73 (49 - 89)	67 (40 - 82)	63 (20 - 84)
Gender [male / female]	m: 9 f: 9	m: 10 f: 9	m: 9 f: 10	m: 9 f: 5	m: 9 f: 8
Erythrocytes [10 <sup>6</sup> /μl]	4.6 (3.4 - 6.6)	3.9 (3.4 - 8.2)	3.9 (2.0 - 8.1)	3.5 (2.6 - 4.3)	4.8 (3.7 - 5.7)
Hemoglobin [g/dl]	14.1 (6.3 - 15.5)	11.0 (8.1 - 15.5)	10.9 (3.0 - 16.8)	9.7 (6.3 - 11.3)	13.5 (7.3 - 15.5)
Hematocrit [%]	41 (32 - 52)	34 (25 - 49)	35 (16 - 56)	27 (11 - 37)	42 (26 - 48)
Leukocytes [10 <sup>3</sup> /μl]	9.9 (2.9 - 40.0)	9.6 (3.0 - 31.8)	12.6 (3.8 - 48.1)	7.6 (3.9 - 87.5)	6.2 (3.2 - 13.9)
Platelets [10 <sup>9</sup> /l]	804 (167 - 1340)	753 (203 - 1919)	304 (66 - 1415)	437 (100 - 800)	198 (62 - 431)
Splenomegaly					
Yes	11	8	16	9	3
No	2	6	1	2	9
Unknown	5	5	2	3	5

Patients clinical parameter. Values/numbers represent the median and (range). No *MPL* mutation (*MPL*<sup>W515L/K</sup>) was detected in PMF cases under investigation. wt = wild-type.



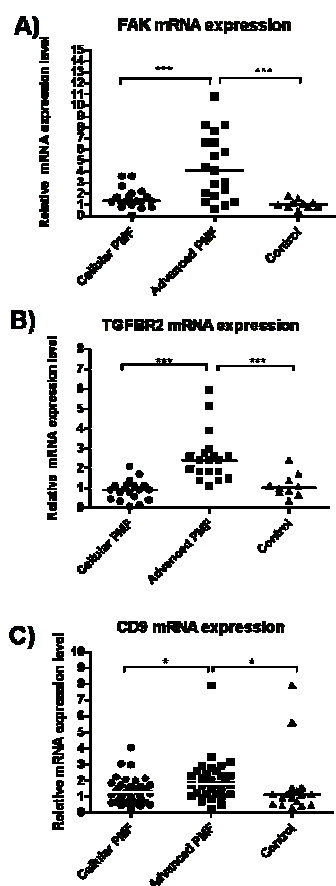
**Figure 1:** Compilation of genes significantly overexpressed in LDA expression analysis.

Point plot gallery showing significant overexpression of 11 target genes in advanced PMF as evidenced by LDA analyses. *SMAD3* mRNA was exclusively increased in ET when compared to controls. Expression levels were displayed relative to the mean of target gene expression in the control group which was arbitrarily set to 1. A missing symbol stands for a case-specific undetectable target gene. Note that LDA analyses were performed as single runs. P values mean \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ . Total LDA results will be completed by review of Table 2.

**Table 3:** Complete results obtained by LDA analyses. Median expression values relative to mean of controls (endogenous control: POLR2A).\* / \*\* significant difference ( $p < 0.05$  /  $p < 0.01$ ) to the control group. (\*) / (\*\*) significant difference ( $p < 0.05$  /  $p < 0.01$ ) to the PMF mf 3 group. n.d. = not detectable

Gene (supplier's assay ID)	PMF mf 0	PMF mf 3	ET	Controls
BMP4-Hs00370078_m1	0,77	3,97	1,15	1,05
NOG-Hs00271352_s1	3,64	1,85	9,57	1,67
BMP7-Hs00233476_m1	4,95	6,59	n.d.	1,47
BMPR1B-Hs00176144_m1	n.d.	n.d.	5,74	1,00
BMP1-Hs00241807_m1	4,06	4,20	6,02	1,00
BMP6-Hs01099594_m1	1,24	11,70	0,40	1,11
BMP2-Hs00154192_m1	1,00	4,25	* 1,51	0,91
BMPR2-Hs00176148_m1	1,64	2,10	1,23	0,98
SMAD3-Hs00706299_s1	3,91	5,07	8,83	* 0,99
SMAD4-Hs00232068_m1	1,38	1,85	0,60	1,29
GAPDH-Hs99999905_m1	0,57	2,40	1,36	1,02
TGFBR1-Hs00610318_m1	3,43	5,64	0,21	2,25
SMAD5-Hs00195437_m1	1,23	4,33	1,38	0,80
SMAD1-Hs00195432_m1	1,05	3,11	0,97	0,95
TGFBRAP1-				
Hs00188614_m1	1,20	2,48	0,96	0,99
MMP1-Hs00899658_m1	7,32	10,36	8,16	1,00
MMP2-Hs00234422_m1	0,85	(*) 6,48	1,14	1,49
MMP13-Hs00233992_m1	0,15	7,67	0,96	1,12
MMP9-Hs00234579_m1	1,16	0,89	0,71	1,10
MMP14-Hs00237119_m1	1,24	7,84	1,00	1,12
THBS1-Hs00962908_m1	2,47	10,71	** 2,73	1,04
TGFBR2-Hs00234253_m1	1,33	2,94	** 1,02	(*) 1,02
TGFB2-Hs00234244_m1	0,97	7,59	2,45	0,87
TGFB3-Hs00234245_m1	1,26	4,38	n.d.	1,07
COL1A2-Hs01028971_m1	0,35	14,43	3,10	1,76
COL4A1-Hs01007469_m1	2,90	4,20	2,17	1,30
MMP11-Hs00968295_m1	3,72	11,92	0,68	1,03
COL18A1-Hs00181017_m1	1,44	1,92	1,77	1,06
LOX-Hs00184700_m1	0,78	(**) 3,58	1,96	1,20
COL3A1-Hs00164103_m1	1,83	24,16	* 1,81	1,62
COL4A2-Hs01098873_m1	2,95	24,54	* 2,96	1,69
COL4A3-Hs01022542_m1	1,10	n.d.	0,36	1,00
FOXP3-Hs00203958_m1	2,14	1,73	3,60	1,23

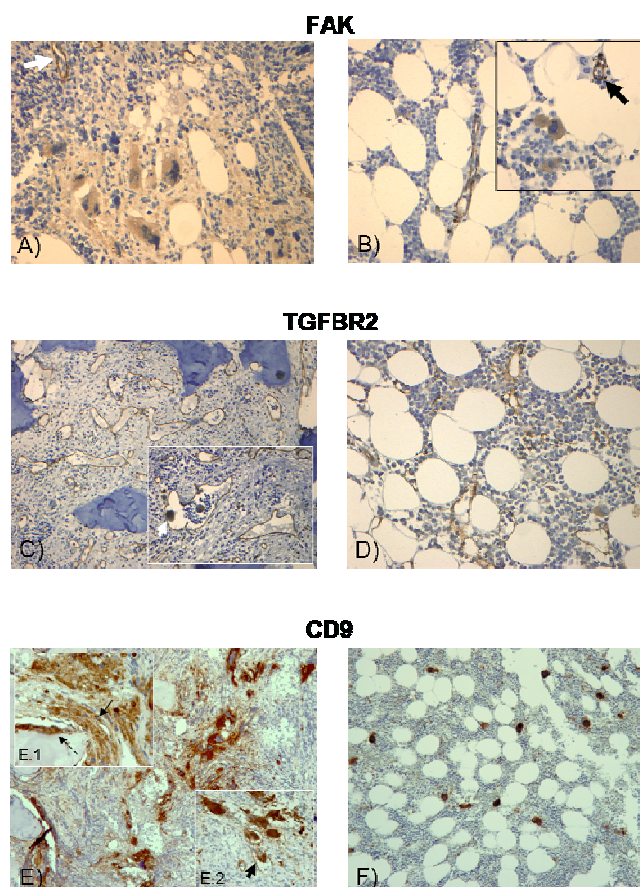
CD9-Hs00233521_m1	1,35	(*)	11,69	*	1,65	1,40
PLOD2-Hs00168688_m1	2,85		10,37		2,53	1,21
TNFRSF11B-						
Hs00171068_m1	0,05		n.d.		n.d.	3,32
TIMP1-Hs99999139_m1	1,41		11,71	**	1,73	1,19
TIMP2-Hs00234278_m1	1,20		2,55		0,58	1,07
SERPINE1-Hs01126606_m1	4,53		37,11		0,17	0,99
PLAT-Hs00263492_m1	1,05		11,69		1,25	1,06
PLAUR-Hs00182181_m1	1,37		1,20		0,45	1,05
EDN1-Hs00174961_m1	1,54		4,49		n.d.	1,21
POLR2A-Hs00172187_m1	1,00		1,00		1,00	1,00
TGFB1-Hs00171257_m1	1,91		3,92	*	0,95	(*) 1,14
GUSB-Hs99999908_m1	1,33		2,87		1,74	1,20
PTK2-Hs00178587_m1	2,31		5,98	*	1,47	1,16
IL6-Hs00985639_m1	1,18		1,06		n.d.	1,00
GREM1-Hs00171951_m1	n.d.		9,87		n.d.	2,07



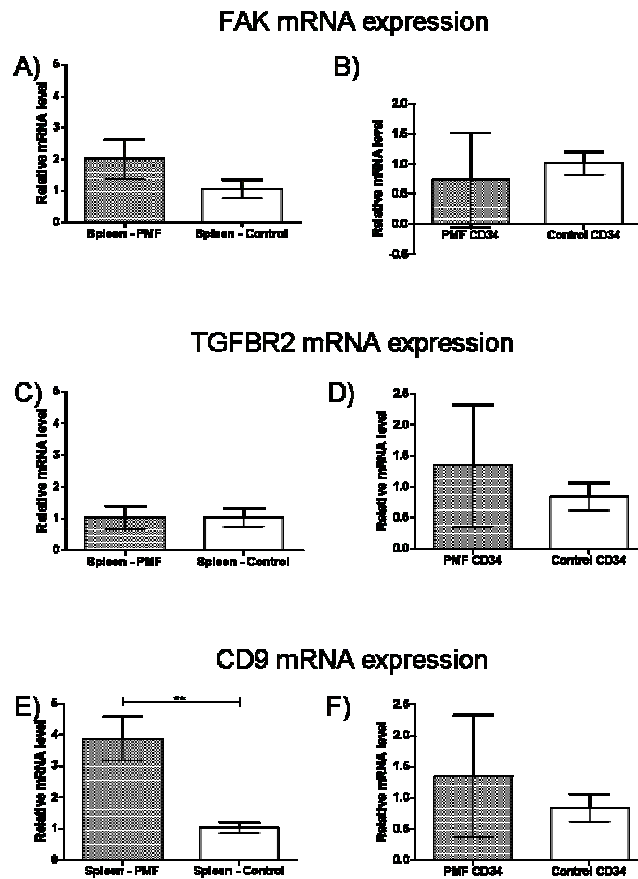
**Figure 2:** Re-evaluation of *FAK* (Figure 2 A), *TGFB2* (Figure 2 B) and *CD9* (Figure 2 C) confirmed overexpression in advanced PMF stages. Note that mean expression level in controls was set to 1. Horizontal bars represent the median of expression.

**Table 4:** Target gene expression by bone marrow cells in PMF and control hematopoiesis are shown as x-fold. Median values, (range) and number of cases (n) under investigation are displayed. Note that number of cases under investigation for *FAK*, *TGFBR2* and *CD9* differed due to limited sample volumes.

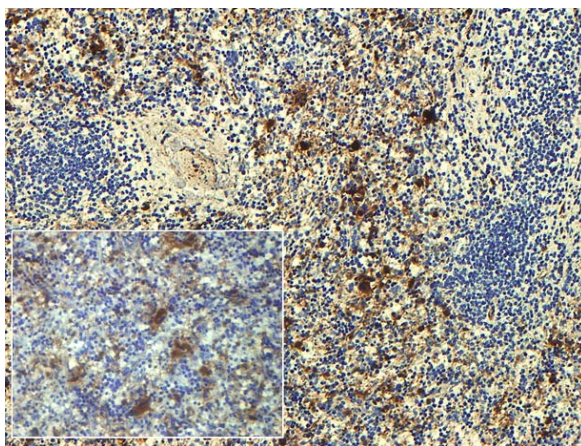
	Cellular PMF	Advanced PMF	Control
<i>FAK</i>	1.4 (0.05 – 3.6) n = 19	4.1 (0.6 – 10.9) n = 19	1.0 (0.4 – 1.8) n = 10
<i>TGFBR2</i>	1.0 (0.1 – 2.1) n = 19	2.4 (1.1 – 6.0) n = 19	1.0 (0.3 – 2.4) n = 10
<i>CD9</i>	1.2 (0.3 – 4.1) n = 37	1.7 (0.2 – 8.0) n = 33	1.1 (0.3 – 8.0) n = 17



**Figure 3:** Immunohistochemistry for FAK in PMF (A) and control (B, insert B) stained endothelial cells and megakaryocytes. TGFBR2 strongly marked the extended sinusoids in PMF (C, insert in C) but also sinusoids in controls (D). Megakaryocytes located in bone marrow sinusoids retained TGFBR2 expression demonstrable in PMF bone marrow (C, white arrow in insert) and controls. CD9 strongly labelled atypically sized and clustered megakaryocytes and endothelial cells in PMF (Figure E and insert E.1). Fibroblasts were prominently stained in advanced PMF (solid black arrow in insert E.2). Osteoblasts in some areas showed CD9 expression as well (insert 2.E, dotted black arrow).



**Figure 4:** The mRNA expression of FAK, TGFBR2 and CD9 in spleen (Figure 4 A, C, E, respectively) and CD34<sup>+</sup> cells (Figure 4 B, D, F, respectively) of PMF and controls. Bar charts illustrate the mean level of expression +/- standard deviation. Mean expression in controls was set to 1. \*\* =  $p < 0.001$ .



**Figure 5:** CD9 protein expression in EMH demonstrable in a spleen of a PMF patient. Besides endothelial cells and some immature progenitors megakaryocytes were predominantly labelled (Figure 5, insert).

**Muth, M., Büsche, G., Bock, O., Hussein, K. and Kreipe, H., Aberrant proplatelet formation in chronic myeloproliferative neoplasms.**

publiziert: Leuk Res, 2010. 34(11): p. 1424-9. doi:10.1016/j.leukres.2010.03.040

**Abstract**

Proplatelets represent pseudopodia of megakaryocytes which extend into bone marrow sinuses to release platelets. Proplatelets were visualized by immunohistochemical and confocal microscopy. In trephines from essential thrombocythaemia (ET, n=10), fibrotic (n=10) and prefibrotic (n=10) primary myelofibrosis (PMF) there was a significant increase of proplatelet density compared with normal bone marrow samples (n=10; p<0.001). Manifest fibrosis exhibited the highest density and volume ratio with significant differences to non-fibrotic PMF (p<0.001) and ET (p<0.001). This study demonstrates that besides megakaryocytic proliferation extensive pseudopodial proplatelet formation provides a hallmark of MPN. Fibrosing differ from non-fibrosing MPN by density and size of aberrant proplatelets.

**Key words:** Proplatelets, primary myelofibrosis, pseudopodia, megakaryocytes, fibrosing and non-fibrosing MPN

## Introduction

Although megakaryocytes have been identified as the source of thrombocytes more than 100 years ago there is still no consensus for how platelets are assembled [1]. Besides the cytoplasmic fragmentation model [2] there is the proplatelet model which is based on long cytoplasmic extensions observed in megakaryocytes in vivo [3] and in vitro [4-5]. Pseudopodial cytoplasmic extensions of megakaryocytes according to this model provide the essential intermediate structure for the generation of platelets. The cytoplasmic extensions can reach 500µm in length and are presumed to get into contact with sinuses for the release of platelets into the blood stream [6]. Proplatelets are usually not obvious by conventional bone marrow histology. They may escape immunohistochemical detection with commonly used megakaryocytic markers (Factor VIII-related antigen, CD42b and CD61) in standard sections of 2-3µm thickness. Consequently, very little is known about the formation of proplatelets in diseases which involve the megakaryocytic lineage, in particular myeloproliferative neoplasms (MPN) [7]. The megakaryocytopoetic development encompasses a series of transformations which give rise to platelets. Each differentiation can be identified by expression of surface proteins. In this study (pro)platelet formation in MPN was visualized in situ by immunohistochemical detection of glycoprotein Ib (platelet) alpha polypeptide (GP1BA; CD42). The expression of GPIX, heterodimer complex with GP1B and GPV, in the platelet membrane characterized an early differentiation [8]. MPN in particular primary myelofibrosis (PMF) and essential thrombocythaemia (ET) are characterized by proliferation of atypical megakaryocytes and thrombocytosis. Thrombocytosis results from an exaggerated proliferation of megakaryocytes as well as from an increased production by polyploid megakaryocytes. Normalization of platelet count by anagrelide appears to be chiefly due to reduced size of megakaryocytes but not primarily to a decrease in number [9-10]. Size and ploidy of megakaryocytes may be linked to proplatelet formation but the latter has not been measured in the above mentioned studies on anagrelide probably because these structures could not be visualized in bone marrow biopsies adequately.

In this study proplatelets have been demonstrated in situ in the bone marrow of MPN and an aberrant formation was found in ET and PMF.



## Material and Methods

### Study group

Formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) bone marrow trephines were retrieved from the bone marrow registry of the Institute of Pathology, Hannover Medical School. The PMF cases were diagnosed according to the WHO criteria 2008 and were classified according to the degree of myelofibrosis as previously described [11-12]. Accordingly, PMF showing no or only minute amounts of interstitial reticulin were graded as myelofibrosis (mf) 0 or 1, respectively. Cases with extended sinusoids and demonstrable collagen fibre deposition or additionally osteosclerosis and bone apposition were classified as mf2 and mf 3, respectively.

The cases under study comprised 20 PMF (mf0/1, n=10; mf 2/3, n=10), 10 ET and 10 control cases (normal hematopoiesis in line with age). All cases were analysed for JAK2 and MPL mutation as described [13]. Among PMF cases none revealed a MPL<sup>W515L</sup> and 14 a JAK2<sup>V617F</sup> mutation (Table 1). Clinical data are shown in Table 1.

Bone marrow trephines of the control group (n = 10) were clinically indicated due to suspicious blood counts or in order to exclude bone marrow infiltration by peripheral lymphoma. Histomorphological evaluation showed no evidence for a haematological disease or infiltration by malignant cells. Control cases were judged as “normal haematopoiesis in line with age”.

### Immunohistochemistry

The immunohistochemistry was performed using the ZytoChem-Plus HRP Polymer-Kit and visualization was performed with a DAB Substrate Kit High Contrast kit (both: Zytomed Systems GmbH, Berlin, Germany) and by counterstaining with haematoxylin. Bone marrow sections (3µm) were deparaffinised in xylol including incubation with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 10 min. Following pre-treatment in a pressure cooker (3 min, 125°C, in 10 mmol/l pH 6.0 citrate buffer) sections were incubated for 1 hour with a monoclonal mouse anti-human CD42b antibody (1:100 dilution, clone MM2/174, NCL-CD42b, Novocastra™ Laboratories, UK). Endogenous controls were used as positive and negative controls. Counterstaining was accomplished with haematoxylin. A fine granular staining of platelets and megakaryocytes is always found on 42b positive staining.

### **Double-immunofluorescence staining**

For double-immunofluorescence staining FFPE sections (5-6µm) were deparaffinised including incubation in 3.0 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 min) and pre-treatment in a pressure cooker (3 min, 125°C, in 10 mmol/l pH 6.0 citrate buffer) prior to 1 hour incubation with the primary antibody (monoclonal mouse anti-human CD42b antibody; 1:100 dilution, rabbit polyclonal anti-human CD34 antibody, clone H-140, sc-9095, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, California, USA; 1:100 dilution, monoclonal mouse anti-human CD68 antibody, clone PG-M1, M0876, dako Deutschland GmbH, Hamburg, Germany). Visualization was performed with incubation of the secondary antibody (1:100 dilution, Cy<sup>TM</sup>2-conjugated AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment Donkey Anti Mouse IgG (H+L), 715-226-150, dianova, Hamburg, Germany; 1:100 dilution, Cy<sup>TM</sup>3-conjugated AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment Donkey Anti Rabbit IgG (H+L), 711-166-152, dianova, Hamburg, Germany) for 30 minutes. Following application of the first antibody set, the protocol was proceeded by application of the second antibody set. Nuclear counterstaining was achieved by staining with Hoechst blue. The positive control was the detection of a granular staining of platelets and megakaryocytes. An isotype control monoclonal/ polyclonal antibody (1:100 dilution, negative control for mouse IgG<sub>1</sub> Ab-1, clone NCG01, DLN-05791, dianova, Hamburg, Germany; 1:100 dilution, negative control for rabbit IgG Ab-1, DLN-13121, dianova, Hamburg, Germany) was used as negative control in lieu of the primary antibody.

### **Antibody combinations**

The CD42b antibody was combined with CD34. The second combination was CD42b and CD68. In all double staining experiments the secondary antibody for CD42b was Cy<sup>TM</sup>2-conjugated AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment Donkey Anti Mouse IgG (H+L). For the diversify antibody Cy<sup>TM</sup>3-conjugated AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment Donkey Anti Rabbit IgG (H+L) or Cy<sup>TM</sup>3-conjugated AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment Donkey Anti Mouse IgG (H+L) was used.

### **Confocal laser-scan microscopy (CLSM)**

Bone marrow sections stained by double-immunofluorescence were investigated by using a confocal laser scanning microscope (Leica DM IRB with a TCS SP2 AOBS scan head, Leica, Heidelberg, Germany provided by the core facility for laser microscopy at the Hannover Medical School; MHH). The microscope is equipped

with a 405nm laser for excitation of blue dyes, a 543nm laser for red dyes and a 488nm laser for excitation of green dyes. Images were recorded in a resolution of a 40x objective and analysed using Leica Confocal Software (LCS-Lite 2.61; Leica, Heidelberg, Germany) to advertise the fluorescence intensity and foci of platelets under well-defined parameters (area, pixel number).

### **Quantification**

Quantification of proplatelets was done by two approaches on biopsy section of standardized thickness. In one approach the numerical density of megakaryocytes and proplatelets was measured according to the point-sampling method by dividing a biopsy section (3 $\mu$ m) into 50 fields of equal size and projection of a measuring square of  $1,2 \times 10^{-1} \text{mm}^2$  in area (measuring ocular; x1000 magnification) in the centre of each field. Proplatelets intersected by the left or lower margins of the square were counted [14].

The second approach was based on fluorescence measurement using the confocal microscope and sections of 5-6 $\mu$ m in thickness. Images were quantified via the Quantify Mode of the Leica Confocal Software (LCS-Lite 2.61; Leica, Heidelberg, Germany). The Histogram function was used to graphically display the fluorescence intensity. The histogram is calculated from the data record of each image. The program is measuring total fluorescence in the image depends on the number of pixels, area size, zoom, detection pinhole and laser intensity. These parameters were well-defined (pixel number: 262144; area size:  $87177.05 \mu\text{m}^2$ ; zoom: 1.27; detection pinhole: 1 Airy unit; laser intensity: 998 Volt for Cy2). The program measures the brightness of the individual pixels on a scale from 0 to 255. This corresponds to the grey value scale. The total intensity is calculated by the sum of the intensity stages, in each case multiplied by the number of pixels of this intensity. The program refers the total intensity to the number of pixels to receive an average intensity for each biopsy under the defined parameters [15]. In these measurements CD42b was analysed and all megakaryocytes were excluded from evaluation because of the size.

## Statistics

Results of point-sampling method and fluorescence measurement were statistically analyzed with Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) by applying the one-way analysis of variance test followed by Bonferroni's post-test.

## Results

### Proplatelets are visualized in-situ by CD42b

In sections from normal bone marrow proplatelets appeared as small round or elongated structures measuring about 1-2 $\mu$ m (Fig. 1A). They were not uniformly distributed over the marrow but occurred in clusters mostly in the vicinity of megakaryocytes. Using confocal microscopy and a three dimensional projection longitudinal processes could be demonstrated (Fig. 1B). The CD42b labelled dendritic processes were not homogeneously broad but delicate thread-like projections interchanged with bulging nodular areas (Fig. 1B). The latter were preferably detected by conventional immunohistochemistry, which only occasionally revealed longitudinal dendritic processes (Fig. 1A), conveying the impression of interstitial deposits of single thrombocytes. By double staining with CD34 it became obvious that the vast majority of proplatelets were lying outside of blood vessels (Supplement 1). To exclude that the CD42b labelled subcellular structures were due to an intramedullary decay of megakaryocytes and represented merely cytoplasmic remnants double staining with CD68 was performed in order to look for phagocytic removal of potential debris. No co-localization of CD68 positive macrophages and CD42b labelled proplatelets could be found indicating that the cytoplasmic projection belonged to viable megakaryocytes (Supplement 2).

### Exaggerated proplatelet formation in ET and PMF

In comparison to normal hematopoiesis (Fig. 1A, B) a considerable higher number of proplatelets was found in ET and pre-fibrotic PMF (Fig. 2A, B; 2C, D, respectively). When manifest fibrosis was obvious a further increase could be noted with wider areas of the bone marrow occupied by a dense meshwork of proplatelets extending in the vicinity of atypical megakaryocytes (Fig. 2E, F). When fluorescence of nuclear-free cytoplasmic extensions labelled by CD42b was measured by confocal microscopy a significant increase was seen in fibrotic PMF in comparison to normal hematopoiesis ( $p < 0.001$ ), prefibrotic PMF ( $p < 0.05$ ) and ET ( $p < 0.05$ ). The latter also

differed significantly from normal hematopoiesis ( $p < 0.001$ ) but not from each other (Fig. 3). These differences were confirmed when the morphometric method of point sampling was applied to assess the numerical density of proplatelets (Fig. 4). In this analysis there was a tendency for higher counts in prefibrotic PMF when compared to ET which, however, did not reach the level of significance. Significant differences were only seen when the volume ratio was determined (data not shown) but this has to be confirmed by larger series.

## Discussion

In recent years compelling evidence could be provided that platelets are released from long and branching cytoplasmic protrusions of megakaryocytes named proplatelets [16, 6]. Only very little is known about the pathology of proplatelet formation in diseases affecting megakaryocyte proliferation and differentiation, in particular ET and PMF. The reason for this deficit in knowledge was the invisibility of proplatelets in conventional bone marrow smears and the inability to visualize them perfectly in bone marrow histology. Up to now proplatelets could only be demonstrated in-situ by electron microscopy [3]. Consequently, proplatelets did not receive mention in any of the monographs on bone marrow histology of MPN (chronic myeloproliferative diseases) [17]. Glycoprotein Ib, alpha polypeptide (CD42b) is a platelet specific surface membrane glycoprotein which functions as a receptor for von Willebrand factor [18]. Because proplatelets also express CD42b in high levels it was used in this study to visualize the usually unapparent cytoplasmic projections of megakaryocytes.

Due to tissue sectioning proplatelets which extend over several 100 $\mu$ m are only partly represented in CD42b immunohistochemistry (Fig. 1). Besides, cross-sections of platelets could not be excluded in conventional immunostaining. Only the relative size distinguishes proplatelets and platelets. However, their three dimensional structure becomes evident by confocal laser scanning microscopy which revealed a longitudinal extension of interstitial CD42 labelled structures (Fig. 1B). In previous studies on PMF the cytoplasmic projections of megakaryocytes demonstrated by electron microscopy were considered to represent amoeboid cytokinesis [19]. In this study we could show that numerous proplatelets in high density can be found between hematopoietic cells not only in the vicinity of sinuses, arguing in favour of the proplatelet model and providing evidence against a beginning megakaryocytic

migration into the sinuses as proposed by Thiele and co-workers [19]. Although we could demonstrate by confocal laser scanning microscopy that the subcellular corpuscular structures which were labelled by CD42 mostly represented bulgy parts of thread-like projections and hence proplatelets, we cannot exclude that at least some of the round CD42 positive structures have to be considered as mature platelets which have already been shed from the megakaryocytic projections. Provided that some of these structures represent mature platelets double staining with CD34 indicated that these deposits were located interstitially and not intravascular. The failure to demonstrate phagocytosis of these deposits by CD68 positive macrophages (supplementary figures) can not rule out that extra vascular shedding of thrombocytes takes place in the bone marrow. It might be that the CD42 antigen is rapidly destroyed after phagocytic ingestion of thrombocytes. Furthermore, there are no studies which have investigated the fate of prematurely shed platelets within the bone marrow. Whether macrophage activation triggered by increased phagocytosis of prematurely shed thrombocytes might provide a link to fibroblast stimulation within the bone marrow has to be considered an open question. Although we were not able to demonstrate thrombocyte phagocytosis by CD42/CD68 double staining, it is tempting to speculate, that an exaggerated proplatelet generation in PMF increases the risk of premature platelet release within the bone marrow interstitium and hence fibroblast activation by cytokines.

Essential thrombocythaemia and PMF show different clinical courses but they share identical mutations such as JAK2<sup>V617F</sup> and MPL<sup>W515L</sup> and exhibit a considerable overlap of pathohistological features of the bone marrow [20]. Up to now the most reliable feature to discriminate PMF and ET is the demonstration of an increased content of reticulin and collagen fibres in the bone marrow [17]. In this study we could show that fibrotic PMF and ET do also differ from each other by the amount of proplatelets which can be observed in the bone marrow although again there is considerable overlap between both diseases (Fig. 4). The finding that cellular PMF and ET did not differ from each other with regard to proplatelet formation lends indirect support to the concept that both diseases represent rather a continuum than separate entities and that the fibrotic potential in MPN needs improved instruments to become predictable.

Proplatelets grow from the megakaryocyte cell body at an average rate of 0.85µm/min whereby not polymerization of microtubules provide the driving force for

elongation but ATP dependent dynein-facilitated microtubule sliding [21]. Cytoskeletal dynamics during platelet biogenesis are only partly understood. It has been shown that receptor tyrosine kinases have the capacity to induce cell motility [22]. Signal-transducing proteins involved in linking growth factors to cytokinesis comprise PI-5-P-4-kinase  $\alpha$ , Rho-like GTPases and Wiskott-Aldrich syndrome (WASp) family proteins [22] and could also play a role in thrombopoiesis [23]. It has been shown that the formation of proplatelets appears to be regulated via the thrombopoietin receptor (MPL) and ligand binding [24]. A considerable portion of the myeloproliferative neoplasms are caused by clonal mutations of tyrosine kinase or receptor genes such as BCR-ABL, JAK2<sup>V617F</sup>, and MPL<sup>W515L</sup> [25-26]. It appears likely that these molecular alterations which underlie PMF and ET interfere with the ATP dependent cytoskeletal modifications which occur during proplatelet formation. This could provide an explanation for the strikingly enhanced number of proplatelets in the bone marrow of ET and PMF. This theory is not yet supported by data and must be examined in further studies. Currently we can not elucidate whether the exaggerated proplatelet formation in PMF represents a cause or consequence of bone marrow fibrosis.

Starting with imatinib a new generation of tyrosine kinase inhibitors has proven to be of high benefit in the therapy of MPN. Tyrosine kinase inhibitors are also tested in clinical studies on PMF and ET [27]. Exaggerated proplatelet formation in PMF and ET will provide an additional tool to study in situ the effect of novel therapies on the proliferation and differentiation of neoplastic megakaryocytes.

## References

1. Schulze, H. & Shivdasani, R.A.: Molecular mechanisms of megakaryocyte differentiation. *Semin Thromb Hemost* 2004,30:389-398.
2. Pennington, D. & Streatfield, K. and Roxburgh, AE.: Megakaryocytes and the heterogeneity or circulating platelets. *British Journal of Haematology* 1976,34:639-653.
3. Becker, R.P. & De Bruyn, P.P.: The transmural passage of blood cells into myeloid sinusoids and the entry of platelets into the sinusoidal circulation; a scanning electron microscopic investigation. *Am J Anat* 1976,145:183-205.

4. Choi, E.S., Nichol, J.L., Hokom, M.M., Hornkohl, A.C. & Hunt, P.: Platelets generated in vitro from proplatelet-displaying human megakaryocytes are functional. *Blood* 1995,85:402-413.
5. Italiano, J.E.J., Lecine, P., Shivdasani, R.A. & Hartwig, J.H.: Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J Cell Biol* 1999,147:1299-1312.
6. Junt, T., Schulze, H., Chen, Z., Massberg, S., Goerge, T., Krueger, A., Wagner, D.D., Graf, T., Italiano, J.E.J., Shivdasani, R.A. et al.: Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science* 2007,317:1767-1770.
7. Thiele, J., Titius, B.R., Kvasnicka, H.M., Rechmeier, W. & Fischer, R.: Megakaryopoiesis in chronic myeloproliferative disorders: immunohistochemical evaluation of endoreduplicative activity by PCNA-staining reaction. *Anal Cell Pathol* 1994,7:63-75.
8. Deutsch, V.R. and Tomer, A.: Megakaryocyte development and platelet production. *Br J Haematol* 2006,134:453-466.
9. Solberg, L.A.J., Tefferi, A., Oles, K.J., Tarach, J.S., Pettit, R.M., Forstrom, L.A. & Silverstein, M.N.: The effects of anagrelide on human megakaryocytopoiesis. *Br J Haematol* 1997,99:174-180.
10. Thiele, J., Kvasnicka, H.M. & Schmitt-Graeff, A.: Effects of anagrelide on megakaryopoiesis and platelet production. *Semin Thromb Hemost* 2006,32:352-361.
11. Thiele, J., Kvasnicka, H.M., Facchetti, F., Franco, V., van der Walt, J. & Orazi, A.: European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. *Haematologica* 2005,90:1128-1132.
12. Buhr, T., Büsche, G., Choritz, H., Länger, F. & Kreipe, H.: Evolution of myelofibrosis in chronic idiopathic myelofibrosis as evidenced in sequential bone marrow biopsy specimens. *Am J Clin Pathol* 2003,119:152-158.
13. 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* 2008,172:951-960.
14. Büsche, G., Georgii, A., Kreipe HH.: Diagnosis and quantification of bone marrow fibrosis are significantly biased by the pre-staining processing of bone marrow biopsies. *Histopathology* 2006, 48(2):133-48.

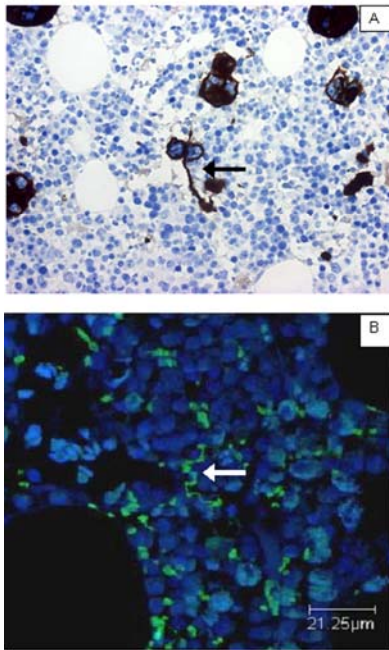


15. User manual: True Confocal Scanner Leica TCS SP II. Version 1.4, May 2000; Leica Microsystems Heidelberg GmbH
16. Patel, S.R., Hartwig, J.H. & Italiano, J.E.J.: The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J Clin Invest* 2005,115:3348-3354.
17. Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H., Thiele, J. and Vardiman, J.W.: WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 2008, Lyon, IARC:.
18. Andrews, R.K., Gardiner, E.E., Shen, Y., Whisstock, J.C. & Berndt, M.C.: Glycoprotein Ib-IX-V. *Int J Biochem Cell Biol* 2003,35:1170-1174.
19. Thiele, J., Kvasnicka, H.M., Amend, T. & Fischer, R.: Megakaryocytes and sinus walls in primary osteomyelofibrosis: transendothelial migration as revealed by three-dimensional reconstruction of serial sections following sequential double-immunostaining. *Virchows Arch* 1994,424:383-387.
20. Wilkins, B.S., Erber, W.N., Bareford, D., Buck, G., Wheatley, K., East, C.L., Paul, B., Harrison, C.N., Green, A.R. & Campbell, P.J.: Bone marrow pathology in essential thrombocythemia: interobserver reliability and utility for identifying disease subtypes. *Blood* 2008,111:60-70.
21. Patel, S.R., Richardson, J.L., Schulze, H., Kahle, E., Galjart, N., Drabek, K., Shivdasani, R.A., Hartwig, J.H. & Italiano, J.E.J.: Differential roles of microtubule assembly and sliding in proplatelet formation by megakaryocytes. *Blood* 2005,106:4076-4085.
22. Wang, W., Goswami, S., Sahai, E., Wyckoff, J.B., Segall, J.E. & Condeelis, J.S.: Tumor cells caught in the act of invading: their strategy for enhanced cell motility. *Trends Cell Biol* 2005,15:138-145.
23. Schulze, H., Korpál, M., Hurov, J., Kim, S., Zhang, J., Cantley, L.C., Graf, T. & Shivdasani, R.A.: Characterization of the megakaryocyte demarcation membrane system and its role in thrombopoiesis. *Blood* 2006,107:3868-3875.
24. Vitrat, N., Cohen-Solal, K., Norol, F., Guichard, J., Cramer, E., Vainchenker, W., Wendling, F. & Debili, N.: Compared effects of Mpl ligand and other cytokines on human MK differentiation. *Stem Cells* 1998,16 Suppl 2:37-51.
25. Tefferi, A. & Vardiman, J.W.: Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia* 2008,22:14-22.

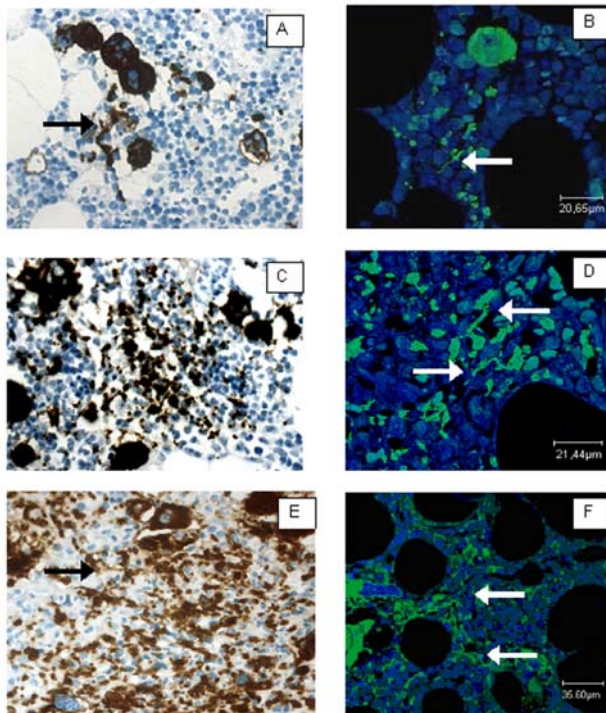
26. Chaligné, R., James, C., Tonetti, C., Besancenot, R., Le Couédic, J.P., Fava, F., Mazurier, F., Godin, I., Maloum, K., Larbret, F. et al.: Evidence for MPL W515L/K mutations in hematopoietic stem cells in primitive myelofibrosis. *Blood* 2007,110:3735-3743.
27. Atallah, E. & Verstovsek, S.: Prospect of JAK2 inhibitor therapy in myeloproliferative neoplasms. *Expert Rev Anticancer Ther* 2009,9:663-670.

**Table 1:** JAK2 (V617F) mutation status and clinical data. The clinical data are given as means with range in brackets.

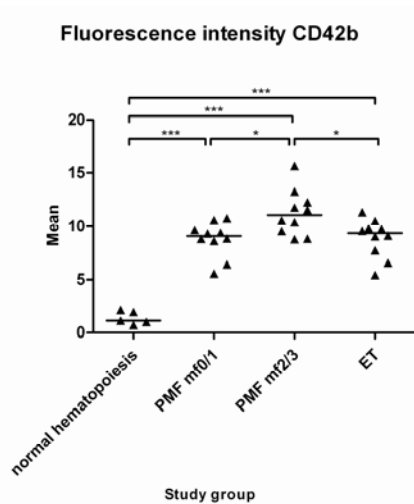
	Control group	PMF mf 0/1	PMF mf 2/3	ET
Group size	n=10	n=10	n=10	n=10
JAK2 (V617F), n = Mutant allele burden (%)	None	8 (15.0 - 75.3)	6 (30.8 - 79.0)	4 (11.7 - 28.5)
MPL (W515L/K)	None	none	none	none
Erythrocytes [ $10^6/\mu\text{l}$ ]	4.6 (4.4 - 4.9)	4.7 (3.6 - 5.6)	3.5 (2.3 - 4.7)	4.5 (3.5 - 5.0)
Hemoglobin [g/dl]	15.0 (13.4 - 19.7)	13.3 (10.3 - 15.7)	9.4 (7.4 - 14.0)	13.9 (11.8 - 15.4)
Hematocrit [%]	41.6 (39.6 - 45.3)	38.3 (31.6 - 47.0)	30.7 (19.8 - 43.0)	41.5 (35.4 - 44.2)
Leukocytes [ $10^3/\mu\text{l}$ ]	5.7 (3.0 - 8.6)	13.7 (6.7 - 21.4)	13.0 (3.0 - 22.2)	8.8 (6.7 - 10.2)
Platelets [ $10^3/\mu\text{l}$ ]	243 (130 - 298)	635 (161 - 1394)	498 (294 - 1081)	782 (630 - 1012)
Sex [m/f]	6 / 4	4 / 6	7 / 3	3 / 7
Age [yrs.]	50 (28 - 71)	70 (54 - 83)	70 (67 - 74)	55 (26 - 74)



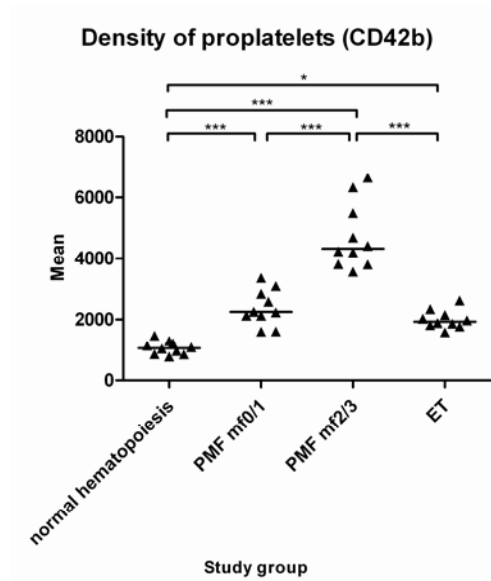
**Figure 1:** Immunohistochemistry for CD42b in normal hematopoiesis shows few proplatelets with occasionally dendritic shape (A) (brown staining), (x200). Counterstaining was accomplished with hematoxylin. Three dimensional structures become better apparent in Confocal laser microscopy (B). CD42b positivity is shown by green staining. Nuclear counterstaining was achieved by staining with Hoechst blue. (CD42b; x400; Leica DM IRB with a TCS SP2 AOBS scan head, Leica, Heidelberg, Germany). The arrows indicate at the CD42b positive proplatelets with occasionally dendritic shape.



**Figure 2 A-F:** Immunohistochemistry for CD42b in ET (A, B), prefibrotic PMF mf0 (C, D) and fibrotic PMF (E, F). Confocal laser microscopy reveals dendritic processes (B, D, F; green staining) whereas in conventional immunohistochemistry predominantly cross sections are seen (brown staining) which increase in density in fibrotic PMF (CD42b; x400)



**Figure 3:** Fluorescence intensity of CD42b staining was measured by confocal microscopy (Leica DM IRB with a TCS SP2 AOBS scan head, Leica, Heidelberg, Germany). Nucleated megakaryocytes were excluded from the analysis in order to evaluate predominantly proplatelets. Significant differences emerged between pre-fibrotic PMF (mf0/1) and fibrotic PMF (mf2/3) as well as with regard to ET. P values mean \* =  $p < 0.05$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ .



**Figure 4:** Density of CD42b labelled proplatelets in normal hematopoiesis, pre-fibrotic PMF (mf0/1), fibrotic PMF (mf2/3) and ET as determined by the point sampling method. There is a significantly higher number of proplatelets in fibrotic PMF than in pre-fibrotic PMF and ET. The difference between ET and pre-fibrotic PMF did only reach borderline significance in this analysis (\* =  $p < 0.05$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ ).

**Muth, M., Engelhardt, B.M., Kröger, N., Hussein, K., Schlué, J., Büsche, G., Kreipe, H.H. and Bock, O., Thrombospondin-1 (TSP-1) in primary myelofibrosis (PMF) - a megakaryocyte-derived biomarker which largely discriminates PMF from essential thrombocythemia.**

im Druck Ann Hematol, 2010. DOI: 10.1007/s00277-010-1024-z

### **Abstract**

Primary myelofibrosis (PMF) is a chronic myeloproliferative neoplasm showing aberrant bone marrow remodelling with increased angiogenesis, progressive matrix accumulation and fibrosis development. Thrombospondins (TSP) are factors sharing pro-fibrotic and anti-angiogenic properties and have not been addressed in PMF before.

We investigated the expression of TSP-1 and TSP-2 in PMF related to the stage of myelofibrosis (n = 51) and in individual follow-up biopsies by real-time PCR, immunohistochemistry and confocal laser scanning microscopy (CLSM).

TSP-1 was significantly overexpressed ( $p < 0.05$ ) in all stages of PMF when compared to a series of essential thrombocythemia (ET) and controls. Individual follow-up biopsies showed involvement of TSP-1 during progressive myelofibrosis. TSP-2 was barely detectable but 40% of cases with advanced myelofibrosis showed a strong expression. Megakaryocytes and interstitial proplatelet formations were shown to be the relevant source for TSP-1 in PMF. Stroma cells like endothelial cells and fibroblasts showed no TSP-1 labelling when double-immunofluorescence staining and CLSM were applied.

Based on its dual function TSP-1 in PMF is likely to be a mediator within a pro-fibrotic environment which discriminates from ET cases. On the other hand TSP-1 is a factor acting (ineffectively) against exaggerated angiogenesis. Both features suggest TSP-1 to be a biomarker for monitoring a PMF targeted therapy.

**Keywords:** biomarker, megakaryocytes, primary myelofibrosis, thrombospondins

## Introduction

Primary myelofibrosis (PMF) is a chronic myeloproliferative neoplasm with features like clustering of atypical and enlarged megakaryocytes, exaggerated formation of new vessels, abnormal progenitor cell trafficking, and the high risk to develop manifest myelofibrosis [1].

Megakaryocytes are known to harbour large amounts of different biologically active factors [2]. Megakaryocytes in PMF are clonal and apparently responsible for a majority of the reactive changes demonstrable in the aberrant bone marrow architecture [3]. The bone marrow in PMF is thought to be pervaded by numerous megakaryocyte-derived growth factors and cytokines leading to a reactive pro-angiogenic and pro-fibrotic environment [4].

Thrombospondins (TSP) were identified in thrombin-stimulated platelets and are expressed by a variety of cells such as endothelial cells, fibroblasts and smooth muscle cells [5]. TSP are so-called matricellular proteins, i.e. they can interact with cell surface receptors and with components of the extracellular matrix thereby mediating cell-matrix interactions [6]. TSP-1 and -2 are trimers of about 145 kDa and belong to one subgroup. TSP-3,-4,-5 are much smaller with about 100 kDa in size. The latter are not fully investigated yet and their roles might be distinct from TSP-1 and TSP-2.

An important pro-angiogenic factor in PMF is VEGF [7, 8] whereas factors with anti-angiogenic properties in PMF have not been investigated yet. Two members of the TSP family, i.e. TSP-1 and TSP-2, are mediators of an anti-angiogenic response. TSP-1 was shown to prevent the formation of new vessels by inhibition of VEGF and stromal cell derived factor 1 (SDF-1), [9]. However, there is some experimental evidence suggesting that TSP-1 can also promote angiogenesis *in vitro*. This promotion could be correlated with the action of active matrix-metalloproteinase 9 (MMP-9) and might depend on its concentration and the *in vitro* model used [10].

Interestingly, TSP-1 is also known as an activator of TGF $\beta$ -1 which is the most relevant inducer of fibroblast activation and matrix synthesis in the fibrotic response and in PMF [11, 12]. TSP-1 also inhibits the activity of matrix-metalloproteinases (MMPs) which are primarily involved in proteolysis of collagens and other matrix components. From this point of view, any aberrant expression could contribute to a particular hallmark in PMF, i.e. increased angiogenesis in case of TSP-1 down-regulation and development of myelofibrosis when TSP-1 action is abrogated.

TSP are also involved in proper megakaryocyte development and platelet function, i.e. TSP-2 deficiency was shown to impair the connection of megakaryocyte proplatelet formations with bone marrow sinuses which led to exaggerated interstitial fragmentation [13]. This study revealed that TSP-2 in megakaryocytes was almost entirely the result of an uptake from the bone marrow microenvironment rather than *de novo* synthesis.

We were interested in the expression level and cellular sources of TSP-1 and TSP-2 in PMF and aimed to get insights in the role of TSP in PMF-related changes of the bone marrow architecture. In addition, TSP expression in essential thrombocythemia (ET) as a MPN with very low risk of fibrosis development should be compared with PMF and controls.

## **Material and Methods**

### **Bone marrow study group**

Formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) bone marrow trephines with PMF (n = 51), ET (n = 10), chronic myelomonocytic leukemia (CMML; n = 11) and chronic myelogenous leukemia (CML; n = 10) diagnosed according to the World Health Organization (WHO) criteria 2008 [14] were retrieved from the bone marrow registry of the Institute of Pathology, Hannover Medical School. Three PMF groups were established according to the presence and degree of myelofibrosis (MF) as determined by silver impregnation (Gomori) according standard procedures [15]. Accordingly, PMF cases were assigned to a group of hypercellular, prefibrotic PMF (MF0, n = 20), a group showing demonstrable increase of reticulin fibres (MF1, n = 12), cases with advanced myelofibrosis and osteosclerosis (MF2/3, n = 19). Individual PMF follow-up biopsies (n = 5, up to 4 core biopsies per case, median: 3 biopsies) ranging from 1 to 7 years (median 3 years) were also analyzed. Criteria of selection for follow-up biopsies was that the first diagnostic biopsy should either show no fibrosis (MF 0, n = 3) or already demonstrable myelofibrosis (MF 2-3, n = 2).

Biopsies of the control group (n = 12) were clinically indicated to exclude an involvement by peripheral lymphoma (n = 7), metastasis of small cell lung carcinoma (n = 1) or because of splenomegaly (n = 1), Budd-Chiari syndrome (n = 1) or leukocytopenia (n = 2). All biopsies showed no evidence for a neoplasm or any other disease and were diagnosed as “haematopoiesis in line with age”.



Quantification of potential mutant allele burden of *JAK2* (V617F) and *MPL* (W515L/K) in PMF was performed using Pyrosequencing® assays as described [16]. CML cases all showed presence of BCR-ABL fusion gene. Clinical parameter of patients and controls including molecular status of *JAK2* and *MPL* are shown in Table 1.

### Real-time RT-PCR

RNA extracted from bone marrow core biopsies [17] was transcribed into the complementary DNA by means of the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Real-time RT-PCR was performed on an ABI PRISM 7500 Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using the individual TaqMan Gene Expression Assays for *thrombospondin 1* (*THBS-1*, Hs00962908\_m1, 59bp amplicon), *thrombospondin 2* (*THBS-2*, Hs01568065\_m1, 63bp amplicon) and the reference genes  $\beta$ -*GUS* ( $\beta$ -*Glucuronidase*, *GUSB*, Hs99999908\_m1, 81bp amplicon) and *RNA polymerase 2A* (*POLR2A*: Hs00172187\_m1, 61bp amplicon); all assays were purchased from Applied Biosystems, Foster City, CA, USA.

### Statistics

The sample- and detector-specific evaluation of amplification curves of the ABI PRISM 7500 Fast Real-time PCR System were statistically analyzed with Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) by applying the nonparametric Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test. P values  $\leq 0.05$  were displayed as statistically significant.

### Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed using the ZytoChem-Plus HRP Polymer-Kit and visualization was performed with the DAB Substrate Kit High Contrast kit (both Zytomed Systems GmbH, Berlin, Germany). Counterstaining was accomplished with haematoxylin. Bone marrow sections (2-3 $\mu$ m) were deparaffinised in xylol including incubation with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 10 min, pre-treated in a pressure cooker (3 min, 125°C, in 10 mmol/l pH 6.0 citrate buffer) and incubated for 1 hour with a monoclonal mouse anti-human Thrombospondin 1 antibody (1:100 dilution, [6], ab1823, abcam, Cambridge, UK) and a monoclonal mouse anti-human Thrombospondin-2 antibody (1:200 dilution, MAB1635, R&D systems). Kidney tissue was used as the TSP-1

positive control. TSP-2 stained colon carcinoma cells in a hepatic metastasis which was used as the positive control.

### **Double-immunofluorescence staining**

For double-immunofluorescence staining FFPE sections (2-3µm) were processed as shown for conventional immunohistochemistry with the TSP-1 antibody and by application of a CD105/Endoglin antibody (1:50 dilution, RB-9291-P, Thermo Scientific, Fremont, CA, USA). Visualization was achieved by incubation of the secondary antibody for 30 minutes (1:100 dilution, Cy<sup>TM</sup>2-conjugated AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment Donkey Anti Mouse IgG (H+L), 715-226-150, dianova, Hamburg, Germany; 1:100 dilution, Cy<sup>TM</sup>3-conjugated AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment Donkey Anti Rabbit IgG (H+L), 711-166-152, dianova, Hamburg, Germany). Nuclear counterstaining was achieved by staining with Hoechst blue. An isotype control monoclonal/ polyclonal antibody (1:100 dilution, negative control for mouse IgG<sub>1</sub> Ab-1, clone NCG01, DLN-05791, dianova, Hamburg, Germany; 1:100 dilution, negative control for rabbit IgG Ab-1, DLN-13121, dianova, Hamburg, Germany) was used as negative control in lieu of the primary antibody.

### **Confocal laser-scan microscopy (CLSM)**

Bone marrow sections were investigated by using a confocal laser scanning microscope (Leica DM IRB with a TCS SP2 AOBS scan head, Leica, Heidelberg, Germany, provided by the core facility for laser microscopy at the Hannover Medical School; MHH). The microscope is equipped with a 405nm laser for excitation of blue dyes, a 543nm laser for red dyes and a 488nm laser for excitation of green dyes. Images were recorded in a resolution of a 40x objective and analysed by using the Leica Confocal Software (LCS-Lite 2.61; Leica, Heidelberg, Germany).

## **Results**

### **Overexpression of TSP-1 in all stages of disease**

TSP-1 mRNA was overexpressed in all stages of disease independently of the degree of myelofibrosis. Cases showing no demonstrable fibre increase overexpressed TSP-1 by up to 39.0-fold (median 4.0, range 0.8 – 39.0), PMF with increase of reticulin (MF1) showed overexpression by up to 48.0-fold (median 3.9, range 0.6 – 48.0). PMF with manifest myelofibrosis showed TSP-1 overexpression by

up to 32.0-fold (median 3.7, range 0.6 – 31.7). All MF stages in PMF showed significantly higher TSP-1 mRNA ( $p < 0.05$ ) compared to haematopoiesis in line with age (median 1.2, range 0.2 – 6.0), Figure 1. An underlying correlation of TSP-1 expression with the molecular status, i.e. presence of JAK2 (V617F) and MPL (W515L) could not be found. Apart from some outliers CMML (median 1.5, range 0.6 – 6.3) and CML (median 2.5, range 0.3 – 8.6) showed no demonstrable TSP-1 overexpression. There was also no significant difference compared to haematopoiesis in line with age.

### **TSP-2 is overexpressed in advanced PMF**

TSP-2 mRNA was overexpressed only in PMF cases in the advanced stage ( $n = 15$ , median 9.1, range 1.4 – 84.0) compared to hypercellular, prefibrotic PMF ( $n = 16$ , median 2.1, range 0.1 – 4.9,  $p < 0.01$ ), ET ( $n = 9$ , median 1.2, range 0.2 – 6.9,  $p < 0.01$ ) and control cases ( $n = 9$ , median 1.3, range 0.1 – 6.0,  $p < 0.01$ ), Figure 2. All in all the absolute expression level of TSP-2 (displayed in threshold cycles by real-time PCR) was rather weak in PMF and controls. No correlation of TSP-2 expression with the presence of JAK2 (V617F) and MPL (W515L) could be demonstrated.

We also tested CML and CMML for TSP-2 mRNA expression. However, the yield of detectable signals was low, i.e. only 20% of the cases showed a notable signal. We therefore resigned from further investigation and illustration of results of TSP-2 mRNA in CML and CMML (data not shown).

### **Individual courses in PMF showed involvement of TSP-1 in progressive myelofibrosis**

We monitored the expression level of TSP-1 mRNA in 5 individual courses of PMF showing progressive remodeling of the bone marrow, i.e. changes in the degree of myelofibrosis. All courses showed considerable TSP-1 dynamics during development of myelofibrosis (#3, #4, #5) or ongoing matrix remodeling (#2), respectively (Figure 3). Follow-up #1 started with an exaggerated TSP-1 overexpression of 29-fold at MF 0 and showed a 12-fold overexpression when MF 2 was demonstrable. Of note, this case rapidly evolved to fibrosis within 1 year. #5 showed an increase of up to 5-fold but in the end of only 2-fold during development of MF 1 in the 7 year follow-up.

All other courses lastly retained TSP-1 overexpression of up to 3-fold (#2) and 13-fold (#3, #4, respectively) when compared to the control group.

### **Clinical correlates showed the association of increased TSP-1 mRNA level with higher platelet counts in advanced PMF**

Depending on the degree of myelofibrosis PMF cases with TSP-1 mRNA expression level above the median (+) were separated from cases which expressed TSP-1 similar to the median or below (=). In advanced PMF high TSP-1 mRNA level were found to be associated with likewise higher platelet counts (median 366, range 241 - 1348 in the + group versus 161, range 94 - 427 in the = group). Apart from higher outliers the + groups in other mf degrees (mf 0, median 978, range 587 – 1936; mf 1, median 605, range 373 - 1275) showed no such demonstrable difference when compared to the respective = group (mf 0, median 968, range 605 – 1305; mf 1, median 573, range 108 – 697). As expected PMF mf 0 showed significantly higher platelet counts than PMF mf 2/3 did ( $p < 0.001$ ) but this only hold true for the subgroup with similar or lower TSP-1 mRNA level (=) but not for the + group, Figure 4.

### **The expression of TSP-1 in PMF is restricted to megakaryocytes, proplatelet formations and platelet deposits**

Immunohistochemistry showed that the entire megakaryocytic lineage was strongly immunoreactive for TSP-1 in PMF. In contrast to normal bone marrow which also showed TSP-1 positive megakaryocytes adjacent to sinusoids and endothelial cells (Figure 5 E) PMF displayed high numbers of interstitially located TSP-1 positive megakaryocytes and platelet deposits (Figure 5 A). Of note, long pseudopodia and large proplatelet formations of PMF megakaryocytes were nicely demonstrable by TSP-1 staining (Figure 5 C). ET showed TSP-1 positive megakaryocytes but failed to exhibit likewise positive proplatelet formations and deposition (Figure 5 D). No TSP-1 labeling was demonstrable in endothelial cells and in fibroblasts in areas of matrix accumulation in PMF (Figure 5 A + B, respectively).

Double-immunofluorescence staining using the TSP-1 antibody and a CD105/endothelin antibody specific for endothelial cells confirmed that TSP-1 and CD105/endothelin did not co-localize in endothelial cells (Figure 6). TSP-1 was

exclusively demonstrable in megakaryocytes and their progenies. CD105/endothelin stained the exaggerated angiogenesis in PMF.

TSP-2 protein expression was heterogeneous with regard to staining pattern and intensity. TSP-2 staining in PMF and controls showed megakaryocytes which exhibited a weak labeling and others which were unlabelled. Since this pattern was demonstrable on the same slide staining failures can be excluded. A prominent difference as shown for TSP-1 staining was not demonstrable by TSP-2 immunohistochemistry (therefore not shown).

## Discussion

Megakaryocytes and platelets normally produce large amounts of pro-angiogenic factors allowing proliferation of endothelial cells *in vitro* and *in vivo*. However, platelets also produce factors capable for counteraction against the formation of new vessels such as platelet-factor 4 or thrombospondins, i.e. most notably TSP-1. A physiologically fine tuned pro- and anti-angiogenic balance apparently ensures the homeostasis essential for proper vascularization.

TSPs were shown to exhibit potent anti-angiogenic properties, i.e. cells deficient in TSP-1 and -2 stimulate angiogenesis to a much greater extent than their normal counterparts [9]. The onset of angiogenesis in cancer often involves down-regulation of endogenous TSP-1 by ras mutated cancer cells and also in adjacent non-transformed fibroblasts but not in endothelial cells [18].

Studies with TSP-1 knock out mice revealed that after myelosuppression these animals quickly recovered from thrombocytopenia compared to wild-type animals. This fact might be attributable to the concomitantly increased angiogenesis and vessel density in the bone marrow which presented a 2-fold higher number of megakaryocytes in the knock out model. Subsequently, platelet numbers increased more rapidly and thrombopoiesis was restored also more quickly. Another study using TSP-2 knock out mice also showed that the pro-angiogenic effects in this model were mediated by enhanced MMP-9 action [19].

A hallmark in bone marrow pathology of PMF is the population of enlarged and clustered megakaryocytes most likely responsible for progressive myelofibrosis and exaggerated angiogenesis. The latter is already overt in early prefibrotic stages and apparently contributes to an easy escape of progenitor cells into the periphery to colonize distant organs such as spleen.

We hypothesized that TSP might be aberrantly expressed in PMF, i.e. decreased expression could explain a contribution to 2 typical PMF features, the high number of megakaryocytes and the high vessel density in PMF bone marrow.

On the other side, TSP-1 was shown to activate latent TGF $\beta$ -1 [20], the most effective pro-fibrotic factor involved in the development of myelofibrosis and other fibrotic states [21]. In addition, TSP-1 up-regulates TIMP-1 [22], the tissue inhibitor of metalloproteinases, whose overexpression might favor matrix accumulation and fibrosis.

We recently found by an explorative low density array profiling that TSP-1 (THBS1) was overexpressed in total bone marrow cells of advanced stage PMF [23]. The interesting action profile attracted us to study the TSP in PMF in more detail.

In the present study, TSP-1 was significantly overexpressed by bone marrow cells in PMF independently of the stage of disease, i.e. the degree of myelofibrosis. This feature discriminated from ET cases which also showed megakaryocytes increased in size and numbers but lacked up-regulated TSP-1.

To test for TSP-1 in other MPN or associated MPN/MDS, we selected CML and CMML cases. Apart from some outliers neither CML nor CMML showed demonstrable higher or lower levels when compared to PMF, ET and controls. The overall stronger TSP-1 mRNA expression in CML might be attributable to the increase of (micro-) megakaryocytes demonstrable in some of these cases.

When we looked for clinical parameters and TSP-1 mRNA expression level in PMF subgroups we found that interestingly in advanced stages those cases with high TSP-1 mRNA expression (labeled as “+” in Figure 4) also had higher platelet counts. As expected PMF mf 0 showed significantly higher platelet counts than advanced stages did. However, this only hold true for the “=” subgroup of mf 2/3 cases with only moderately increased TSP-1 mRNA level.

TSP-1 protein was exclusively present in megakaryocytes in PMF including large proplatelet formations and platelet aggregates within the bone marrow interstitium. These proplatelet formations in our study group showed no association with vessels or endothelial gaps. This accumulation apart from vessels suggests a potential key role in myelofibrosis development because of the likelihood that due to fragmentation high amounts of pro-fibrotic factors could accumulate in the bone marrow as well. By contrast, a sufficient anti-angiogenic effect through TSP-1 is hard to imagine because exaggerated angiogenesis is overt in all stages and TSP-1 is apparently not acting

on endothelial cells, at least TSP-1 was not detectable by 2 different morphological and staining approaches. By double-immunofluorescence labeling TSP-1 was only present in the megakaryocytes and progenies such as large proplatelet formations but not in endothelial cells (CD105 positive). TSP-1 positive proplatelets are in good agreement with a previous study which detected TSP-1 in the demarcation membrane of thrombin-stimulated human megakaryocytes [24]. The demarcation membrane is the intracellular precursor formation of pseudopodia which later mediate the continuity with the extracellular space and also delivery of platelets [25]. Interestingly, in a previous study with mice knocked out for TSP-2 these animals failed to show a proper interaction of megakaryocytic pseudopodia and bone marrow sinuses to deliver proplatelets and platelets [13]. In our study TSP-2 mRNA was only barely detectable except for some high outliers in advanced PMF. TSP-2 protein detection was only demonstrable in some megakaryocytes in both PMF and normal haematopoiesis but technical issues can not be excluded with certainty as the reason for this heterogeneity. However, it was found that megakaryocytes *in vitro* show an up-take of extracellular TSP-2 but no intracellular *de novo* synthesis [13]. If so, TSP-2 positive megakaryocytes in PMF and controls are biologically different in their current state of TSP-2 up-take and heterogeneous staining pattern was not artificial. Nevertheless, TSP-2 in our study did not sufficiently reveal its secrets in PMF pathology.

In summary, the abundance of TSP-1 in PMF has presumably 3 relevant issues:

1. A pro-fibrotic effect is likely, and explainable by a megakaryocytic-derived local accumulation with subsequent activation of latent TGF $\beta$ -1, increased matrix synthesis and inhibition of MMP activity.
2. The strictly morphological based diagnosis of hypercellular, prefibrotic PMF versus ET could be supported by TSP-1 expression analysis when larger cohorts will be successfully tested for reliability of this marker in the diagnostic setting,
3. The proposed but functionally complex effect of TSP-1 on endothelial cells might be aberrant or insufficient in PMF due to overweight of other pro-angiogenic factors. However, TSP-1 could nevertheless be an excellent indicator of increased angiogenesis. Accordingly, our data fit to the recent observation that in tumor bearing mice TSP-1 is obviously a biomarker for the increased tumor angiogenesis indicating the individuals attempt to counteract against new vessel formation [26]. We conclude that TSP-1 is a promising factor in PMF useful to be considered as a biomarker for monitoring potentially targeted therapy.

## Acknowledgements

The authors are indebted to Ms. Sabine Schröter for her skillful technical assistance. The funding and grant support by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (BO1954/1-2; O.B., H.K.) and the Bundesministerium für Bildung und Forschung – (O.B.) is gratefully acknowledged.

## References

1. Tefferi, A. (2005) Pathogenesis of myelofibrosis with myeloid metaplasia. *J Clin Oncol.* 23(33):8520-30. doi: 10.1200/JCO.2004.00.9316
2. Ciurea, S.O., Merchant, D., Mahmud, N., Ishii, T., Zhao, Y., Hu, W., Bruno, E., Barosi, G., Xu, M., Hoffman, R. (2007) Pivotal contributions of megakaryocytes to the biology of idiopathic myelofibrosis. *Blood* 110(3):986-93. doi: 10.1182/blood-2006-12-064626.
3. Lataillade, J.J., Pierre-Louis, O., Hasselbalch, H.C., Uzan, G., Jasmin, C., Martyre, M.C., Le Bousse-Kerdiles, M.C. (2008) Does primary myelofibrosis involve a defective stem cell niche? From concept to evidence. *Blood* 112(8):3026-35. doi: 10.1182/blood-2008-06-158386.
4. Kuter, D.J., Bain, B., Mufti, G., Bagg, A., Hasserjian, R.P. (2007) Bone marrow fibrosis: pathophysiology and clinical significance of increased bone marrow stromal fibres. *Br J Haematol* 139(3):351-62. doi: 10.1111/j.1365-2141.2007.06807.x
5. Bornstein, P. (2001) Thrombospondins as extracellular modulators of cell function. *J Clin Invest* 107(8):929-34. doi: 10.1172/JCI12749.
6. Bornstein, P. (2009) Thrombospondins function as regulators of angiogenesis. *J Cell Commun Signal* 3(3-4):189–200 doi: 10.1007/s12079-009-0060-8.
7. Gianelli, U., Vener, C., Raviele, P.R., Savi, F., Somalvico, F., Calori, R., Iurlo, A., Radaelli, F., Fermo, E., Bucciarelli, P., Bori, S., Coggi, G., Deliliers, G.L. (2007) VEGF expression correlates with microvessel density in Philadelphia chromosome-negative chronic myeloproliferative disorders. *Am J Clin Pathol.* 128(6):966-73. doi: 10.1309/FP0N3LC8MBJUFFA6
8. Steurer, M., Zoller, H., Augustin, F., Fong, D., Heiss, S., Strasser-Weippl, K., Gastl, G., Tzankov, A. (2007) Increased angiogenesis in chronic idiopathic myelofibrosis: vascular endothelial growth factor as a prominent angiogenic factor. *Hum Pathol* 38(7):1057-64. doi: 10.1016/j.humpath.2006.12.011



9. Kopp, H.G., Hooper, A.T., Broekman, M.J., Avecilla, S.T., Petit, I., Luo, M., Milde, T., Ramos, C.A., Zhang, F., Kopp, T., Bornstein, P., Jin, D.K., Marcus, A.J. and Rafii, S. (2006) Thrombospondins deployed by thrombopoietic cells determine angiogenic switch and extent of revascularization. *J Clin Invest* 116(12):3277-91. doi: 10.1172/JCI29314.
10. Qian, X., Wang, T.N., Rothman, V.L., Nicosia, R.F., Tuszynski, G.P. (1997) Thrombospondin-1 modulates angiogenesis in vitro by up-regulation of matrix metalloproteinase-9 in endothelial cells. *Exp Cell Res* 235(2):403-12. doi:10.1006/excr.1997.3681
11. Wynn, T.A. (2008) Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 214(2):199-210. doi: 10.1002/path.2277
12. Chagraoui, H., Komura, E., Tulliez, M., Giraudier, S., Vainchenker, W., Wendling, F. (2002) Prominent role of TGF-beta 1 in thrombopoietin-induced myelofibrosis in mice. *Blood* 100(10):3495-503. doi: 10.1182/blood-2002-04-1133.
13. Kyriakides, T.R., Rojnuckarin, P., Reidy, M.A., Hankenson, K.D., Papayannopoulou, T., Kaushansky, K., Bornstein, P. (2003) Megakaryocytes require thrombospondin-2 for normal platelet formation and function. *Blood* 101(10):3915-23.
14. Tefferi, A., Vardiman, J.W. (2008) Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia* 22(1):14-22. doi: 10.1038/sj.leu.2404955
15. Thiele, J., Kvasnicka, H.M., Facchetti, F., Franco, V., van der Walt, J., Orazi, A. (2005) European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. *Haematologica* 90(8):1128-32.
16. Bock, O., Neuse, J., Hussein, K., Brakensiek, K., Buesche, G., Buhr, T., Wiese, B., Kreipe, H. (2006) Aberrant collagenase expression in chronic idiopathic myelofibrosis is related to the stage of disease but not to the JAK2 mutation status. *Am J Pathol* 169(2):471-81. doi: 10.2353/ajpath.2006.060110.
17. Bock, O., Schlue, J., Lehmann, U., von Wasielewski, R., Langer, F., Kreipe, H. (2002) Megakaryocytes from chronic myeloproliferative disorders show enhanced nuclear bFGF expression. *Blood* 100(6):2274-5.
18. Kalas, W., Yu, J.L., Milsom, C., Rosenfeld, J., Benezra, R., Bornstein, P. and Rak, J. (2005) Oncogenes and Angiogenesis: down-regulation of thrombospondin-1 in normal fibroblasts exposed to factors from cancer cells harboring mutant ras. *Cancer Res* 65(19):8878-86.

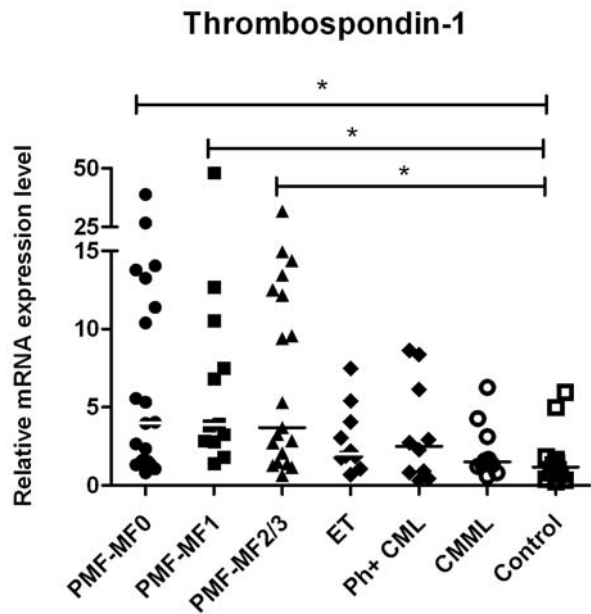
19. Krady, M.M., Zeng, J., Yu, J., MacLauchlan, S., Skokos, E.A., Tian, W., Bornstein, P., Sessa, W.C., Kyriakides, T.R. (2008) Thrombospondin-2 modulates extracellular matrix remodeling during physiological angiogenesis. *Am J Pathol* 173(3):879-91. doi: 10.2353/ajpath.2008.080128.
20. Ribeiro, S.M., Poczatek, M., Schultz-Cherry, S., Villain, M., Murphy-Ullrich, J.E. (1999) The activation sequence of thrombospondin-1 interacts with the latency-associated peptide to regulate activation of latent transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 274(19):13586-93. doi: 10.1074/jbc.274.19.13586
21. Wynn, T.A. (2007) Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest* 117(3):524-9. doi: 10.1172/JCI31487.
22. John, A.S., Hu, X., Rothman, V.L., Tuszynski, G.P. (2009) Thrombospondin-1 (TSP-1) up-regulates tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) production in human tumor cells: exploring the functional significance in tumor cell invasion. *Exp Mol Pathol* 87(3):184-8. doi:10.1016/j.yexmp.2009.09.002
23. Bock, O., Muth, M., Theophile, K., Winter, M., Hussein, K., Busche, G., Kroger, N., Kreipe, H. (2009) Identification of new target molecules PTK2, TGFBR2 and CD9 overexpressed during advanced bone marrow remodelling in primary myelofibrosis. *Br J Haematol* 146(5):510-20. doi: 10.1111/j.1365-2141.2009.07808.x
24. Cramer, E.M., Masse, J.M., Caen, J.P., Garcia, I., Breton-Gorius, J., Debili, N., Vainchenker, W. (1993) Effect of thrombin on maturing human megakaryocytes. *Am J Pathol* 143(5):1498-508.
25. Schulze, H., Korpai, M., Hurov, J., Kim, S.W., Zhang, J., Cantley, L.C., Graf, T. and Shivdasani, R.A. (2006) Characterization of the megakaryocyte demarcation membrane system and its role in thrombopoiesis. *Blood* 107(10):3868-75. doi: 10.1182/blood-2005-07-2755.
26. Zaslavsky, A., Baek, K.H., Lynch, R.C., Short, S., Grillo, J., Folkman, J., Italiano, J.E. Jr., Ryeom, S. (2010) Platelet-derived thrombospondin-1 (TSP-1) is a critical negative regulator and potential biomarker of angiogenesis. *Blood* in press, doi: 10.1182/blood-2009-09-242065.

**Table 1:** Study group – clinical and molecular status

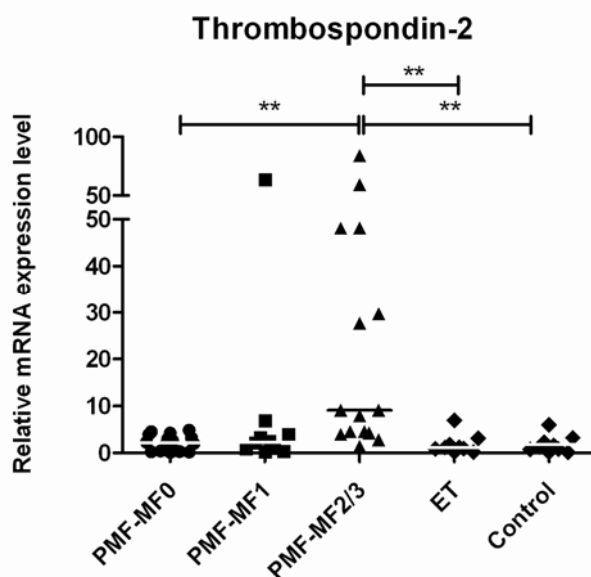
	PMF MF 0	PMF MF 1	PMF MF 2/3	ET	Ph <sup>+</sup> -CML <sup>#</sup>	CMML	Control group
Group size	20	12	19	10	10	11	12
JAK2 (V617F) frequency	n = 10 (50%)	n = 9 (75%)	n = 13 (68%)	n = 4 (40%)	n.d.	n.d.	none
JAK2 (V617F) mutant allele burden in % (median, range)	29.4 (14.8-47.1)	33.7 (7.1-63.3)	53 (33.8-79.3)	18.7 (11.7-28.5)	-	-	-
MPL (W515L) frequency	n = 1 (33.9)	none	n = 3 (97.2, 47.1, 45.3)	none	n.d.	n.d.	none
MPL mutant allele burden (%)							
Erythrocytes (10 <sup>6</sup> /μL)	4.6 (3.2-6.5)	4.6 (2.8-7.2)	3.9 (2.5-5.5)	3.5 (2.3-4.7)	4.3 (2.6-5.5)	3.4 (2.3-4.3)	4.2 (3.1-4.8)
Hemoglobin (g/d L)	13.7 (10.3-16.8)	11.7 (8.6-14.6)	11 (7-15)	9.4 (7.4-14)	12.6 (6.8-16.2)	10.9 (7.4-12.6)	13.5 (13-14.3)
Hematocrit (%)	41.3 (31.1-50.8)	38 (28.2-51)	32.5 (22-44.6)	30.7 (19.8-43)	36.8 (20.8-46.7)	32.4 (21.6-38.8)	40 (38.7-41.3)
Leukocytes (10 <sup>3</sup> /μL)	10.6 (5-20)	11.2 (5.2-16.2)	14.9 (5-40)	13 (3-22.2)	37.4 (11.5-83.7)	8 (4-18)	6.3 (3.5-7.9)
Platelets (10 <sup>3</sup> /μL)	962.6 (587-1936)	590 (108-1275)	320.5 (11.8-1348)	498 (294-1081)	572 (296-1500)	157 (85-243)	243.4 (58-352)
Splenomegaly* (yes/no/not)	7/10/3	6/4/2	14/2/3	-/-/10	1/-/9	3/1/7	1/5/6
Gender (M/F)	8/12	7/5	12/7	7/3	6/4	7/4	5/7
Age (y)	68 (47-81)	68 (48-78)	72 (48-88)	70 (67-74)	55 (17-90)	66 (39-80)	53 (23-73)

F = Female; M = male; y = years; \* = defined as clinically palpable.

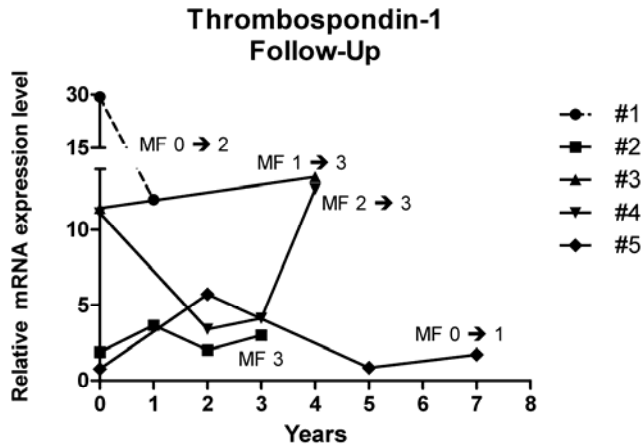
Clinical data are given as mean with range in brackets. JAK2 (V617F) is given as median. MPL (W515K) was not detectable in the study group. # = BCR-ABL positive as determined by multiplex RT-PCR.



**Figure 1:** TSP-1 mRNA was significantly overexpressed in all stages of PMF (MF0, MF1, MF2-3) when compared with control bone marrow. Horizontal black bars represent median of expression. Expression level in the control group was arbitrarily set to 1. \*  $p < 0.05$ .

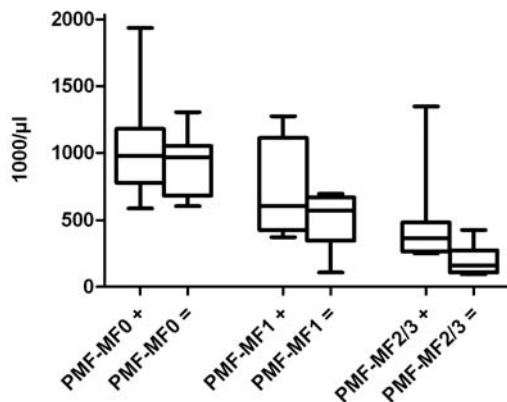


**Figure 2:** TSP-2 mRNA was overexpressed in the advanced stage of PMF (MF2-3) when compared to PMF-MF0 (\*\*  $p < 0.01$ ), ET (\*\*  $p < 0.01$ ) and the control group (\*\*  $p < 0.01$ ). Horizontal white or black bars represent median of expression. The expression level in the control group was arbitrarily set to 1.

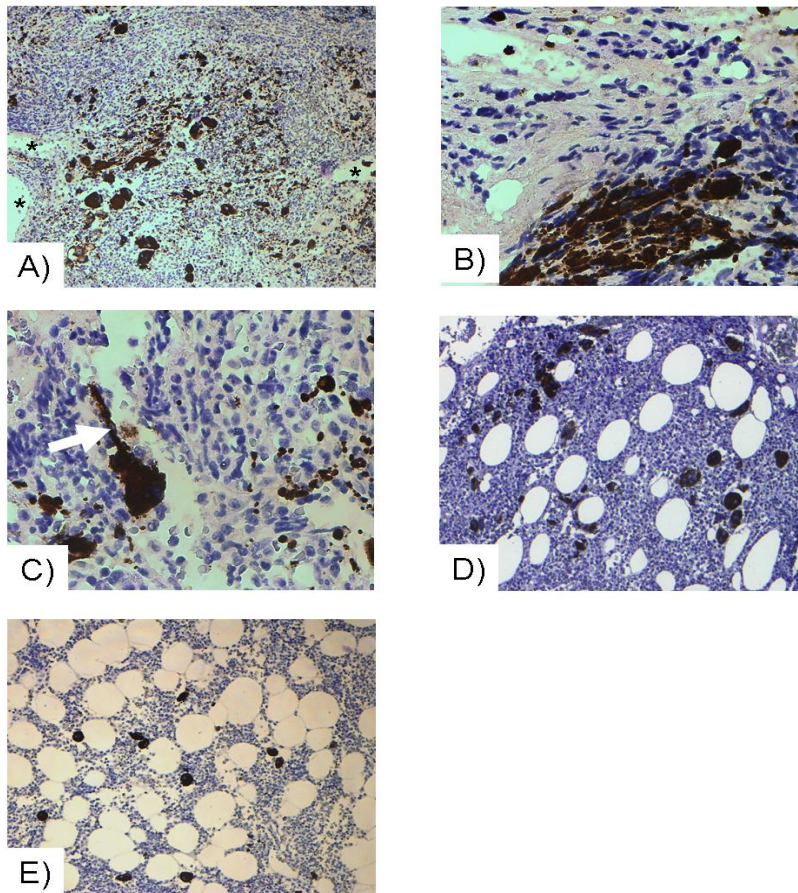


**Figure 3:** Follow-ups of TSP-1 mRNA level in PMF during individual courses of disease. MF dynamics are indicated by the arrow. Initial TSP-1 mRNA level at time point of diagnosis was calculated relative to the mean expression level in the control group (Figure 1). Different symbols represent individual follow-ups ranging from 1 to 7 years.

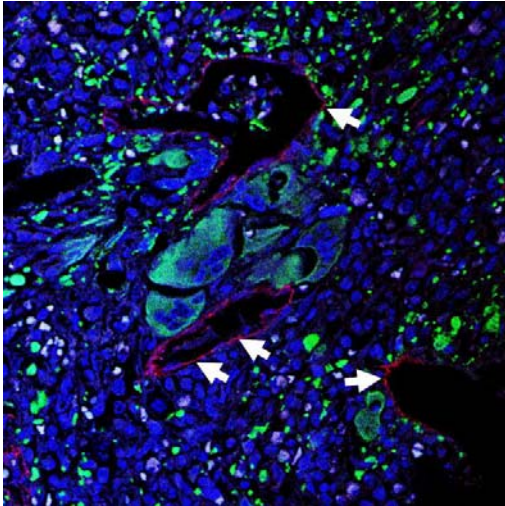
#### Platelet counts in PMF related to TSP-1 mRNA level



**Figure 4:** PMF cases with TSP-1 mRNA level above median were labeled as (+) and those with TSP-1 mRNA level similar or below the median as (=). Based on the degree of myelofibrosis the 2 groups (+, =) were tested for a potential relation of platelet counts and TSP-1 mRNA level. Advanced PMF cases with higher TSP-1 mRNA level also had higher platelet counts.



**Figure 5:** Immunohistochemistry (DAB brown) with a monoclonal antibody against TSP-1 showed labeling of normal megakaryocytes in control bone marrow (5 E). In PMF clustered megakaryocytes (5 A, \* indicate sinuses) like streamed megakaryocytes and large deposits of interstitially located proplatelets (5 B) showed strong staining. TSP-1 positive pseudopodia and long megakaryocytic protrusions (5 C, white arrow) were exclusively demonstrable in PMF bone marrows. ET showed marked TSP-1 labeling in megakaryocytes but lacked notable deposition of proplatelets and pseudopodia formation (5 D). Stroma cells such as fibroblasts and endothelial cells showed no TSP-1 reactivity in all slides under investigation.



**Figure 6:** Merged figure from confocal laser scanning microscopy and double-immunofluorescence staining revealed TSP-1 (green) restricted to megakaryocytes and platelets and CD105/endothelin (red) restricted to endothelium. No TSP-1 could be detected in endothelial cells.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Stamenkovic, I., Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol*, 2003. 200(4): p. 448-64.
2. Ayad, S., Boot-Hanford, R., Humphries, M., Kadler, K. and Shuttleworth, C., *The Extracellular Matrix (Facts Book)*. Harcourt Brace & Company, 1998.
3. Eder, M. and Gedigk, P., *Lehrbuch der Allgemeinen Pathologie und der Pathologischen Anatomie*. Springer, 1977.
4. Wynn, T.A., Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest*, 2007. 117(3): p. 524-9.
5. Berdel, W.E., Böhm, M., Classen, M., Diehl, V., Kochsiek, K. and Schmiegel, W., *Innere Medizin*. Urban & Fischer, 2004.
6. Riede, U.-N., Werner, M. and Schäfer, H.-E., *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Thieme, 2004.
7. Robson, M.C., Steed, D.L. and Franz, M.G., Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Curr Probl Surg*, 2001. 38(2): p. 72-140.
8. Broughton, G., 2nd, Janis, J.E. and Attinger, C.E., The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg*, 2006. 117(7 Suppl): p. 12S-34S.
9. Lawrence, W.T., Physiology of the acute wound. *Clin Plast Surg*, 1998. 25(3): p. 321-40.
10. Monaco, J.L. and Lawrence, W.T., Acute wound healing an overview. *Clin Plast Surg*, 2003. 30(1): p. 1-12.
11. Pool, J.G., Normal hemostatic mechanisms: a review. *Am J Med Technol*, 1977. 43(8): p. 776-80.
12. Skover, G.R., Cellular and biochemical dynamics of wound repair. Wound environment in collagen regeneration. *Clin Podiatr Med Surg*, 1991. 8(4): p. 723-56.
13. Pierce, G.F., Mustoe, T.A., Altrock, B.W., Deuel, T.F. and Thomason, A., Role of platelet-derived growth factor in wound healing. *J Cell Biochem*, 1991. 45(4): p. 319-26.
14. Hart, J., Inflammation. 1: Its role in the healing of acute wounds. *J Wound Care*, 2002. 11(6): p. 205-9.
15. Robson, M.C., Wound infection. A failure of wound healing caused by an imbalance of bacteria. *Surg Clin North Am*, 1997. 77(3): p. 637-50.



16. Hunt, T.K., The physiology of wound healing. *Ann Emerg Med*, 1988. 17(12): p. 1265-73.
17. Sieggreen, M.Y., Healing of physical wounds. *Nurs Clin North Am*, 1987. 22(2): p. 439-47.
18. Broughton, G., 2nd, Janis, J.E. and Attinger, C.E., Wound healing: an overview. *Plast Reconstr Surg*, 2006. 117(7 Suppl): p. 1e-S-32e-S.
19. Diegelmann, R.F. and Evans, M.C., Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci*, 2004. 9: p. 283-9.
20. Hunt, T.K., Hopf, H. and Hussain, Z., Physiology of wound healing. *Adv Skin Wound Care*, 2000. 13(2 Suppl): p. 6-11.
21. Witte, M.B. and Barbul, A., General principles of wound healing. *Surg Clin North Am*, 1997. 77(3): p. 509-28.
22. Ramasastry, S.S., Acute wounds. *Clin Plast Surg*, 2005. 32(2): p. 195-208.
23. Goldman, R., Growth factors and chronic wound healing: past, present, and future. *Adv Skin Wound Care*, 2004. 17(1): p. 24-35.
24. Greenhalgh, D.G., The role of apoptosis in wound healing. *Int J Biochem Cell Biol*, 1998. 30(9): p. 1019-30.
25. Baum, C.L. and Arpey, C.J., Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatol Surg*, 2005. 31(6): p. 674-86; discussion 686.
26. Clark, R.A., Regulation of fibroplasia in cutaneous wound repair. *Am J Med Sci*, 1993. 306(1): p. 42-8.
27. Servold, S.A., Growth factor impact on wound healing. *Clin Podiatr Med Surg*, 1991. 8(4): p. 937-53.
28. Ribatti, D., Vacca, A., Roncali, L. and Dammacco, F., Angiogenesis under normal and pathological conditions. *Haematologica*, 1991. 76(4): p. 311-20.
29. Risau, W., Angiogenic growth factors. *Prog Growth Factor Res*, 1990. 2(1): p. 71-9.
30. Holly, S.P., Larson, M.K. and Parise, L.V., Multiple roles of integrins in cell motility. *Exp Cell Res*, 2000. 261(1): p. 69-74.
31. Mulder, G.D. and Vande Berg, J.S., Cellular senescence and matrix metalloproteinase activity in chronic wounds. Relevance to debridement and new technologies. *J Am Podiatr Med Assoc*, 2002. 92(1): p. 34-7.

32. Toy, L.W., Matrix metalloproteinases: their function in tissue repair. *J Wound Care*, 2005. 14(1): p. 20-2.
33. Pierce, G.F., Vande Berg, J., Rudolph, R., Tarpley, J. and Mustoe, T.A., Platelet-derived growth factor-BB and transforming growth factor beta 1 selectively modulate glycosaminoglycans, collagen, and myofibroblasts in excisional wounds. *Am J Pathol*, 1991. 138(3): p. 629-46.
34. Ganz, T., Macrophage function. *New Horiz*, 1993. 1(1): p. 23-7.
35. O'Kane, S., Wound remodelling and scarring. *J Wound Care*, 2002. 11(8): p. 296-9.
36. Pardo, A. and Selman, M., Matrix metalloproteases in aberrant fibrotic tissue remodeling. *Proc Am Thorac Soc*, 2006. 3(4): p. 383-8.
37. Rosenbloom, J., Castro, S.V. and Jimenez, S.A., Narrative review: fibrotic diseases: cellular and molecular mechanisms and novel therapies. *Ann Intern Med*, 2010. 152(3): p. 159-66.
38. Wick, G., Backovic, A., Rabensteiner, E., Plank, N., Schwentner, C. and Sgonc, R., The immunology of fibrosis: innate and adaptive responses. *Trends Immunol*, 2010. 31(3): p. 110-19.
39. Bataller, R. and Brenner, D.A., Liver fibrosis. *J Clin Invest*, 2005. 115(2): p. 209-18.
40. Tsukada, S., Parsons, C.J. and Rippe, R.A., Mechanisms of liver fibrosis. *Clin Chim Acta*, 2006. 364(1-2): p. 33-60.
41. Afshar, K. and Sharma, O.P., Interstitial lung disease: trials and tribulations. *Curr Opin Pulm Med*, 2008. 14(5): p. 427-33.
42. Gross, T.J. and Hunninghake, G.W., Idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*, 2001. 345(7): p. 517-25.
43. Kim, D.S., Collard, H.R. and King, T.E., Jr., Classification and natural history of the idiopathic interstitial pneumonias. *Proc Am Thorac Soc*, 2006. 3(4): p. 285-92.
44. Zisman, D.A., Keane, M.P., Belperio, J.A., Strieter, R.M. and Lynch, J.P., 3rd, Pulmonary fibrosis. *Methods Mol Med*, 2005. 117: p. 3-44.
45. Schnaper, H.W., Renal fibrosis. *Methods Mol Med*, 2005. 117: p. 45-68.
46. Schnaper, H.W. and Kopp, J.B., Renal fibrosis. *Front Biosci*, 2003. 8: p. e68-86.

47. Freese, P., Svalander, C.T., Molne, J., Norden, G. and Nyberg, G., Chronic allograft nephropathy--biopsy findings and outcome. *Nephrol Dial Transplant*, 2001. 16(12): p. 2401-6.
48. White, J.M., Creamer, D., du Vivier, A.W., Pagliuca, A., Ho, A.Y., Devereux, S., Salisbury, J.R. and Mufti, G.J., Sclerodermatous graft-versus-host disease: clinical spectrum and therapeutic challenges. *Br J Dermatol*, 2007. 156(5): p. 1032-8.
49. Solez, K., Colvin, R.B., Racusen, L.C., Haas, M., Sis, B., Mengel, M., Halloran, P.F., Baldwin, W., Banfi, G., Collins, A.B., Cosio, F., David, D.S., Drachenberg, C., Einecke, G., Fogo, A.B., Gibson, I.W., Glotz, D., Iskandar, S.S., Kraus, E., Lerut, E., Mannon, R.B., Mihatsch, M., Nankivell, B.J., Nickleleit, V., Papadimitriou, J.C., Randhawa, P., Regele, H., Renaudin, K., Roberts, I., Seron, D., Smith, R.N. and Valente, M., Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant*, 2008. 8(4): p. 753-60.
50. Hauber, H.P. and Blaukovitsch, M., Current and Future Treatment Options in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2010.
51. Li, Z.H., Peng, S.C., Kang, J., Hou, X.M. and Yu, R.J., [Effect of corticosteroids upon the prognosis of idiopathic pulmonary fibrosis.]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2010. 90(12): p. 804-7.
52. Schmeding, M., Heidenhain, C., Neuhaus, R., Neuhaus, P. and Neumann, U.P., Liver Transplantation for Alcohol-Related Cirrhosis: A Single Centre Long-Term Clinical and Histological Follow-Up. *Dig Dis Sci*, 2010.
53. Krams, M., Frahm, S.O., Kellner, U. and Mawrin, C., *Kurzlehrbuch Pathologie*. Thieme Verlag, 2010.
54. Kaushansky, K., Lineage-specific hematopoietic growth factors. *N Engl J Med*, 2006. 354(19): p. 2034-45.
55. Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N. and Mitchell, R.N., *Robbins Basic Pathology* 8th edition. Saunders, 2007.
56. Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H., Thiele, J. and Vardiman, J.W., *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, Fourth Edition. World Health Organisation, 2008.
57. Deininger, M., Buchdunger, E. and Druker, B.J., The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood*, 2005. 105(7): p. 2640-53.

58. Druker, B.J., Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. *Blood*, 2008. 112(13): p. 4808-17.
59. Nowell, P.C. and Hungerford, D.A., A minute chromosome in human granulocytic leukemia. *Science*, 1960. 132(1497).
60. Bennett, M. and Stroncek, D.F., Recent advances in the bcr-abl negative chronic myeloproliferative diseases. *J Transl Med*, 2006. 4: p. 41.
61. Baxter, E.J., Scott, L.M., Campbell, P.J., East, C., Fourouclas, N., Swanton, S., Vassiliou, G.S., Bench, A.J., Boyd, E.M., Curtin, N., Scott, M.A., Erber, W.N. and Green, A.R., Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*, 2005. 365(9464): p. 1054-61.
62. James, C., Ugo, V., Le Couedic, J.P., Staerk, J., Delhommeau, F., Lacout, C., Garcon, L., Raslova, H., Berger, R., Bennaceur-Griscelli, A., Villeval, J.L., Constantinescu, S.N., Casadevall, N. and Vainchenker, W., A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*, 2005. 434(7037): p. 1144-8.
63. Kralovics, R., Passamonti, F., Buser, A.S., Teo, S.S., Tiedt, R., Passweg, J.R., Tichelli, A., Cazzola, M. and Skoda, R.C., A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*, 2005. 352(17): p. 1779-90.
64. Levine, R.L., Wadleigh, M., Cools, J., Ebert, B.L., Wernig, G., Huntly, B.J., Boggon, T.J., Wlodarska, I., Clark, J.J., Moore, S., Adelsperger, J., Koo, S., Lee, J.C., Gabriel, S., Mercher, T., D'Andrea, A., Frohling, S., Dohner, K., Marynen, P., Vandenberghe, P., Mesa, R.A., Tefferi, A., Griffin, J.D., Eck, M.J., Sellers, W.R., Meyerson, M., Golub, T.R., Lee, S.J. and Gilliland, D.G., Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*, 2005. 7(4): p. 387-97.
65. Zhao, R., Xing, S., Li, Z., Fu, X., Li, Q., Krantz, S.B. and Zhao, Z.J., Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. *J Biol Chem*, 2005. 280(24): p. 22788-92.
66. Ihle, J.N., Cytokine receptor signalling. *Nature*, 1995. 377(6550): p. 591-4.
67. Lee, T.S., Ma, W., Zhang, X., Giles, F., Kantarjian, H. and Albitar, M., Mechanisms of constitutive activation of Janus kinase 2-V617F revealed at the atomic level through molecular dynamics simulations. *Cancer*, 2009. 115(8): p. 1692-700.

68. Campbell, P.J., Somatic and germline genetics at the JAK2 locus. *Nat Genet*, 2009. 41(4): p. 385-6.
69. Pikman, Y., Lee, B.H., Mercher, T., McDowell, E., Ebert, B.L., Gozo, M., Cuker, A., Wernig, G., Moore, S., Galinsky, I., DeAngelo, D.J., Clark, J.J., Lee, S.J., Golub, T.R., Wadleigh, M., Gilliland, D.G. and Levine, R.L., MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med*, 2006. 3(7): p. e270.
70. Pardanani, A.D., Levine, R.L., Lasho, T., Pikman, Y., Mesa, R.A., Wadleigh, M., Steensma, D.P., Elliott, M.A., Wolanskyj, A.P., Hogan, W.J., McClure, R.F., Litzow, M.R., Gilliland, D.G. and Tefferi, A., MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood*, 2006. 108(10): p. 3472-6.
71. Kilpivaara, O. and Levine, R.L., JAK2 and MPL mutations in myeloproliferative neoplasms: discovery and science. *Leukemia*, 2008. 22(10): p. 1813-7.
72. Vannucchi, A.M., Antonioli, E., Guglielmelli, P., Pardanani, A. and Tefferi, A., Clinical correlates of JAK2V617F presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: a critical reappraisal. *Leukemia*, 2008. 22(7): p. 1299-307.
73. Parsons, D.W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J.C., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I.M., Gallia, G.L., Olivi, A., McLendon, R., Rasheed, B.A., Keir, S., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Busam, D.A., Tekleab, H., Diaz, L.A., Jr., Hartigan, J., Smith, D.R., Strausberg, R.L., Marie, S.K., Shinjo, S.M., Yan, H., Riggins, G.J., Bigner, D.D., Karchin, R., Papadopoulos, N., Parmigiani, G., Vogelstein, B., Velculescu, V.E. and Kinzler, K.W., An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*, 2008. 321(5897): p. 1807-12.
74. Yan, H., Parsons, D.W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B.A., Yuan, W., Kos, I., Batinic-Haberle, I., Jones, S., Riggins, G.J., Friedman, H., Friedman, A., Reardon, D., Herndon, J., Kinzler, K.W., Velculescu, V.E., Vogelstein, B. and Bigner, D.D., IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med*, 2009. 360(8): p. 765-73.
75. Mardis, E.R., Ding, L., Dooling, D.J., Larson, D.E., McLellan, M.D., Chen, K., Koboldt, D.C., Fulton, R.S., Delehaunty, K.D., McGrath, S.D., Fulton, L.A., Locke, D.P., Magrini, V.J., Abbott, R.M., Vickery, T.L., Reed, J.S., Robinson, J.S., Wylie, T., Smith, S.M., Carmichael, L., Eldred, J.M., Harris, C.C., Walker, J., Peck, J.B., Du, F., Dukes, A.F., Sanderson, G.E., Brummett, A.M., Clark, E., McMichael, J.F., Meyer, R.J., Schindler, J.K., Pohl, C.S., Wallis, J.W., Shi, X., Lin, L., Schmidt, H., Tang, Y.,

- Haippek, C., Wiechert, M.E., Ivy, J.V., Kalicki, J., Elliott, G., Ries, R.E., Payton, J.E., Westervelt, P., Tomasson, M.H., Watson, M.A., Baty, J., Heath, S., Shannon, W.D., Nagarajan, R., Link, D.C., Walter, M.J., Graubert, T.A., DiPersio, J.F., Wilson, R.K. and Ley, T.J., Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med*, 2009. 361(11): p. 1058-66.
76. Pardanani, A., Lasho, T.L., Finke, C.M., Mai, M., McClure, R.F. and Tefferi, A., IDH1 and IDH2 mutation analysis in chronic- and blast-phase myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*, 2010. 24(6): p. 1146-51.
77. Tefferi, A., Lasho, T.L., Abdel-Wahab, O., Guglielmelli, P., Patel, J., Caramazza, D., Pieri, L., Finke, C.M., Kilpivaara, O., Wadleigh, M., Mai, M., McClure, R.F., Gilliland, D.G., Levine, R.L., Pardanani, A. and Vannucchi, A.M., IDH1 and IDH2 mutation studies in 1473 patients with chronic-, fibrotic- or blast-phase essential thrombocythemia, polycythemia vera or myelofibrosis. *Leukemia*, 2010.
78. Thiele, J., Kvasnicka, H.M., Facchetti, F., Franco, V., van der Walt, J. and Orazi, A., European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. *Haematologica*, 2005. 90(8): p. 1128-32.
79. Gianelli, U., Vener, C., Raviele, P.R., Savi, F., Somalvico, F., Calori, R., Iurlo, A., Radaelli, F., Fermo, E., Bucciarelli, P., Bori, S., Coggi, G. and Deliliers, G.L., VEGF expression correlates with microvessel density in Philadelphia chromosome-negative chronic myeloproliferative disorders. *Am J Clin Pathol*, 2007. 128(6): p. 966-73.
80. Xu, M., Bruno, E., Chao, J., Huang, S., Finazzi, G., Fruchtman, S.M., Popat, U., Prchal, J.T., Barosi, G. and Hoffman, R., Constitutive mobilization of CD34+ cells into the peripheral blood in idiopathic myelofibrosis may be due to the action of a number of proteases. *Blood*, 2005. 105(11): p. 4508-15.
81. Kvasnicka, H.M. and Thiele, J., Classification of Ph-negative chronic myeloproliferative disorders--morphology as the yardstick of classification. *Pathobiology*, 2007. 74(2): p. 63-71.
82. Lataillade, J.J., Pierre-Louis, O., Hasselbalch, H.C., Uzan, G., Jasmin, C., Martyre, M.C. and Le Bousse-Kerdiles, M.C., Does primary myelofibrosis involve a defective stem cell niche? From concept to evidence. *Blood*, 2008. 112(8): p. 3026-35.

83. Le Bousse-Kerdiles, M.C. and Martyre, M.C., Involvement of the fibrogenic cytokines, TGF-beta and bFGF, in the pathogenesis of idiopathic myelofibrosis. *Pathol Biol (Paris)*, 2001. 49(2): p. 153-7.
84. Tefferi, A., Myelofibrosis with myeloid metaplasia. *N Engl J Med*, 2000. 342(17): p. 1255-65.
85. Bock, O., Loch, G., Schade, U., Busche, G., Wasielewski, R., Wiese, B. and Kreipe, H., Osteosclerosis in advanced chronic idiopathic myelofibrosis is associated with endothelial overexpression of osteoprotegerin. *Br J Haematol*, 2005. 130(1): p. 76-82.
86. Thiele, J. and Kvasnicka, H.M., 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(4): p. 226-32.
87. Spivak, J.L., Barosi, G., Tognoni, G., Barbui, T., Finazzi, G., Marchioli, R. and Marchetti, M., Chronic myeloproliferative disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2003: p. 200-24.
88. Mesa, R.A., Silverstein, M.N., Jacobsen, S.J., Wollan, P.C. and Tefferi, A., Population-based incidence and survival figures in essential thrombocythemia and agnogenic myeloid metaplasia: an Olmsted County Study, 1976-1995. *Am J Hematol*, 1999. 61(1): p. 10-5.
89. Rollison, D.E., Howlader, N., Smith, M.T., Strom, S.S., Merritt, W.D., Ries, L.A., Edwards, B.K. and List, A.F., 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(1): p. 45-52.
90. Tefferi, A., Pathogenesis of myelofibrosis with myeloid metaplasia. *J Clin Oncol*, 2005. 23(33): p. 8520-30.
91. Dingli, D., Mesa, R.A. and Tefferi, A., Myelofibrosis with myeloid metaplasia: new developments in pathogenesis and treatment. *Intern Med*, 2004. 43(7): p. 540-7.
92. Abdel-Wahab, O.I. and Levine, R.L., Primary myelofibrosis: update on definition, pathogenesis, and treatment. *Annu Rev Med*, 2009. 60: p. 233-45.
93. Kroger, N., Thiele, J., Zander, A., Schwerdtfeger, R., Kobbe, G., Bornhauser, M., Bethge, W., Schubert, J., de Witte, T. and Kvasnicka, H.M., Rapid regression of bone marrow fibrosis after dose-reduced allogeneic stem cell transplantation in patients with primary myelofibrosis. *Exp Hematol*, 2007. 35(11): p. 1719-22.

94. Cervantes, F., Passamonti, F. and Barosi, G., Life expectancy and prognostic factors in the classic BCR/ABL-negative myeloproliferative disorders. *Leukemia*, 2008. 22(5): p. 905-14.
95. Junt, T., Schulze, H., Chen, Z., Massberg, S., Goerge, T., Krueger, A., Wagner, D.D., Graf, T., Italiano, J.E., Jr., Shivdasani, R.A. and von Andrian, U.H., Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science*, 2007. 317(5845): p. 1767-70.
96. Schulze, H. and Shivdasani, R.A., Mechanisms of thrombopoiesis. *J Thromb Haemost*, 2005. 3(8): p. 1717-24.
97. Thiele, J., Titius, B.R., Kvasnicka, H.M., Rechmeier, W. and Fischer, R., Megakaryopoiesis in chronic myeloproliferative disorders: immunohistochemical evaluation of endoreduplicative activity by PCNA-staining reaction. *Anal Cell Pathol*, 1994. 7(1): p. 63-75.
98. Bock, O., Neuse, J., Hussein, K., Brakensiek, K., Buesche, G., Buhr, T., Wiese, B. and 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(2): p. 471-81.
99. Visse, R. and Nagase, H., Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*, 2003. 92(8): p. 827-39.
100. Bergers, G., Brekken, R., McMahon, G., Vu, T.H., Itoh, T., Tamaki, K., Tanzawa, K., Thorpe, P., Itohara, S., Werb, Z. and Hanahan, D., Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol*, 2000. 2(10): p. 737-44.
101. Brooks, P.C., Silletti, S., von Schalscha, T.L., Friedlander, M. and Cheresch, D.A., Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity. *Cell*, 1998. 92(3): p. 391-400.
102. Chun, T.H., Sabeh, F., Ota, I., Murphy, H., McDonagh, K.T., Holmbeck, K., Birkedal-Hansen, H., Allen, E.D. and Weiss, S.J., MT1-MMP-dependent neovessel formation within the confines of the three-dimensional extracellular matrix. *J Cell Biol*, 2004. 167(4): p. 757-67.
103. Mesa, R.A., Hanson, C.A., Rajkumar, S.V., Schroeder, G. and Tefferi, A., Evaluation and clinical correlations of bone marrow angiogenesis in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood*, 2000. 96(10): p. 3374-80.



104. Hopkins, D.R., Keles, S. and Greenspan, D.S., The bone morphogenetic protein 1/Tolloid-like metalloproteinases. *Matrix Biol*, 2007. 26(7): p. 508-23.
105. Ge, G. and Greenspan, D.S., BMP1 controls TGFbeta1 activation via cleavage of latent TGFbeta-binding protein. *J Cell Biol*, 2006. 175(1): p. 111-20.
106. Laplante, P., Raymond, M.A., Labelle, A., Abe, J., Iozzo, R.V. and Hebert, M.J., Perlecan proteolysis induces an alpha2beta1 integrin- and Src family kinase-dependent anti-apoptotic pathway in fibroblasts in the absence of focal adhesion kinase activation. *J Biol Chem*, 2006. 281(41): p. 30383-92.
107. Garimella, R., Kacena, M.A., Tague, S.E., Wang, J., Horowitz, M.C. and Anderson, H.C., Expression of bone morphogenetic proteins and their receptors in the bone marrow megakaryocytes of GATA-1(low) mice: a possible role in osteosclerosis. *J Histochem Cytochem*, 2007. 55(7): p. 745-52.
108. Friedman, M.S., Long, M.W. and Hankenson, K.D., Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells is regulated by bone morphogenetic protein-6. *J Cell Biochem*, 2006. 98(3): p. 538-54.
109. Gitelman, S.E., Kobrin, M.S., Ye, J.Q., Lopez, A.R., Lee, A. and Derynck, R., Recombinant Vgr-1/BMP-6-expressing tumors induce fibrosis and endochondral bone formation in vivo. *J Cell Biol*, 1994. 126(6): p. 1595-609.
110. Kuter, D.J., Bain, B., Mufti, G., Bagg, A. and Hasserjian, R.P., Bone marrow fibrosis: pathophysiology and clinical significance of increased bone marrow stromal fibres. *Br J Haematol*, 2007. 139(3): p. 351-62.
111. Bock, O., Hoftmann, J., Theophile, K., Hussein, K., Wiese, B., Schlue, J. and 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(4): p. 951-60.
112. Bock, O., Muth, M., Theophile, K., Winter, M., Hussein, K., Busche, G., Kroger, N. and 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(5): p. 510-20.
113. Feng, X.H. and Derynck, R., Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2005. 21: p. 659-93.
114. Lebrin, F., Deckers, M., Bertolino, P. and Ten Dijke, P., TGF-beta receptor function in the endothelium. *Cardiovasc Res*, 2005. 65(3): p. 599-608.

115. ten Dijke, P., Goumans, M.J. and Pardali, E., Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. *Angiogenesis*, 2008. 11(1): p. 79-89.
116. Carcamo, J., Zentella, A. and Massague, J., Disruption of transforming growth factor beta signaling by a mutation that prevents transphosphorylation within the receptor complex. *Mol Cell Biol*, 1995. 15(3): p. 1573-81.
117. Goumans, M.J., Valdimarsdottir, G., Itoh, S., Rosendahl, A., Sideras, P. and ten Dijke, P., Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO J*, 2002. 21(7): p. 1743-53.
118. Goumans, M.J., Liu, Z. and ten Dijke, P., TGF-beta signaling in vascular biology and dysfunction. *Cell Res*, 2009. 19(1): p. 116-27.
119. Barbara, N.P., Wrana, J.L. and Letarte, M., Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Biol Chem*, 1999. 274(2): p. 584-94.
120. Ponzoni, M., Savage, D.G., Ferreri, A.J., Pruneri, G., Viale, G., Servida, P., Bertolini, F. and Orazi, A., Chronic idiopathic myelofibrosis: independent prognostic importance of bone marrow microvascular density evaluated by CD105 (endoglin) immunostaining. *Mod Pathol*, 2004. 17(12): p. 1513-20.
121. Steurer, M., Zoller, H., Augustin, F., Fong, D., Heiss, S., Strasser-Weippl, K., Gastl, G. and Tzankov, A., Increased angiogenesis in chronic idiopathic myelofibrosis: vascular endothelial growth factor as a prominent angiogenic factor. *Hum Pathol*, 2007. 38(7): p. 1057-64.
122. Rooke, H.M., Vitas, M.R., Crosier, P.S. and Crosier, K.E., The TGF-beta type II receptor in chronic myeloid leukemia: analysis of microsatellite regions and gene expression. *Leukemia*, 1999. 13(4): p. 535-41.
123. Glodek, A.M., Le, Y., Dykxhoorn, D.M., Park, S.Y., Mostoslavsky, G., Mulligan, R., Lieberman, J., Beggs, H.E., Honczarenko, M. and Silberstein, L.E., Focal adhesion kinase is required for CXCL12-induced chemotactic and pro-adhesive responses in hematopoietic precursor cells. *Leukemia*, 2007. 21(8): p. 1723-32.
124. Bokel, C. and Brown, N.H., Integrins in development: moving on, responding to, and sticking to the extracellular matrix. *Dev Cell*, 2002. 3(3): p. 311-21.
125. Giancotti, F.G. and Ruoslahti, E., Integrin signaling. *Science*, 1999. 285(5430): p. 1028-32.
126. Hynes, R.O., Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 1992. 69(1): p. 11-25.

127. Horwitz, A.F., Integrins and health. *Sci Am*, 1997. 276(5): p. 68-75.
128. Richardson, A. and Parsons, J.T., Signal transduction through integrins: a central role for focal adhesion kinase? *Bioessays*, 1995. 17(3): p. 229-36.
129. Romer, L.H., McLean, N., Turner, C.E. and Burridge, K., Tyrosine kinase activity, cytoskeletal organization, and motility in human vascular endothelial cells. *Mol Biol Cell*, 1994. 5(3): p. 349-61.
130. Furuta, Y., Ilic, D., Kanazawa, S., Takeda, N., Yamamoto, T. and Aizawa, S., Mesodermal defect in late phase of gastrulation by a targeted mutation of focal adhesion kinase, FAK. *Oncogene*, 1995. 11(10): p. 1989-95.
131. Kornberg, L.J., Focal adhesion kinase and its potential involvement in tumor invasion and metastasis. *Head Neck*, 1998. 20(8): p. 745-52.
132. Gotlieb, A.I. and Spector, W., Migration into an in vitro experimental wound: a comparison of porcine aortic endothelial and smooth muscle cells and the effect of culture irradiation. *Am J Pathol*, 1981. 103(2): p. 271-82.
133. Herman, I.M., Molecular mechanisms regulating the vascular endothelial cell motile response to injury. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1993. 22 Suppl 4: p. S25-36.
134. Hayashida, T., Wu, M.H., Pierce, A., Poncelet, A.C., Varga, J. and Schnaper, H.W., MAP-kinase activity necessary for TGFbeta1-stimulated mesangial cell type I collagen expression requires adhesion-dependent phosphorylation of FAK tyrosine 397. *J Cell Sci*, 2007. 120(Pt 23): p. 4230-40.
135. Carmona, G., Gottig, S., Orlandi, A., Scheele, J., Bauerle, T., Jugold, M., Kiessling, F., Henschler, R., Zeiher, A.M., Dimmeler, S. and Chavakis, E., Role of the small GTPase Rap1 for integrin activity regulation in endothelial cells and angiogenesis. *Blood*, 2009. 113(2): p. 488-97.
136. Lundberg, L.G., Lerner, R., Sundelin, P., Rogers, R., Folkman, J. and Palmblad, J., Bone marrow in polycythemia vera, chronic myelocytic leukemia, and myelofibrosis has an increased vascularity. *Am J Pathol*, 2000. 157(1): p. 15-9.
137. Nakamura, Y., Handa, K., Iwamoto, R., Tsukamoto, T., Takahasi, M. and Mekada, E., Immunohistochemical distribution of CD9, heparin binding epidermal growth factor-like growth factor, and integrin alpha3beta1 in normal human tissues. *J Histochem Cytochem*, 2001. 49(4): p. 439-44.
138. Higashihara, M., Takahata, K., Yatomi, Y., Nakahara, K. and Kurokawa, K., Purification and partial characterization of CD9 antigen of human platelets. *FEBS Lett*, 1990. 264(2): p. 270-4.

139. Kaprielian, Z., Cho, K.O., Hadjiargyrou, M. and Patterson, P.H., CD9, a major platelet cell surface glycoprotein, is a ROCA antigen and is expressed in the nervous system. *J Neurosci*, 1995. 15(1 Pt 2): p. 562-73.
140. Ko, E.M., Lee, I.Y., Cheon, I.S., Kim, J., Choi, J.S., Hwang, J.Y., Cho, J.S., Lee, D.H., Kang, D., Kim, S.H. and Choe, J., Monoclonal antibody to CD9 inhibits platelet-induced human endothelial cell proliferation. *Mol Cells*, 2006. 22(1): p. 70-7.
141. Barosi, G., Viarengo, G., Pecci, A., Rosti, V., Piaggio, G., Marchetti, M. and Frassoni, F., Diagnostic and clinical relevance of the number of circulating CD34(+) cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood*, 2001. 98(12): p. 3249-55.
142. De Bruyne, E., Andersen, T.L., De Raeve, H., Van Valckenborgh, E., Caers, J., Van Camp, B., Delaisse, J.M., Van Riet, I. and Vanderkerken, K., Endothelial cell-driven regulation of CD9 or motility-related protein-1 expression in multiple myeloma cells within the murine 5T33MM model and myeloma patients. *Leukemia*, 2006. 20(10): p. 1870-9.
143. Shaw, A.R., Domanska, A., Mak, A., Gilchrist, A., Dobler, K., Visser, L., Poppema, S., Fliegel, L., Letarte, M. and Willett, B.J., Ectopic expression of human and feline CD9 in a human B cell line confers beta 1 integrin-dependent motility on fibronectin and laminin substrates and enhanced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*, 1995. 270(41): p. 24092-9.
144. Guglielmelli, P., Zini, R., Bogani, C., Salati, S., Pancrazzi, A., Bianchi, E., Mannelli, F., Ferrari, S., Le Bousse-Kerdiles, M.C., Bosi, A., Barosi, G., Migliaccio, A.R., Manfredini, R. and Vannucchi, A.M., Molecular profiling of CD34+ cells in idiopathic myelofibrosis identifies a set of disease-associated genes and reveals the clinical significance of Wilms' tumor gene 1 (WT1). *Stem Cells*, 2007. 25(1): p. 165-73.
145. Szalai, G., LaRue, A.C. and Watson, D.K., Molecular mechanisms of megakaryopoiesis. *Cell Mol Life Sci*, 2006. 63(21): p. 2460-76.
146. Lordier, L., Jalil, A., Aurade, F., Larbret, F., Larghero, J., Debili, N., Vainchenker, W. and Chang, Y., Megakaryocyte endomitosis is a failure of late cytokinesis related to defects in the contractile ring and Rho/Rock signaling. *Blood*, 2008. 112(8): p. 3164-74.
147. Becker, R.P. and De Bruyn, P.P., The transmural passage of blood cells into myeloid sinusoids and the entry of platelets into the sinusoidal circulation; a scanning electron microscopic investigation. *Am J Anat*, 1976. 145(2): p. 183-205.

148. Muth, M., Busche, G., Bock, O., Hussein, K. and Kreipe, H., Aberrant proplatelet formation in chronic myeloproliferative neoplasms. *Leuk Res*, 2010. 34(11): p. 1424-9.
149. Lichtenstein, J., *Konfokale Mikroskopie*. Spektrum der Wissenschaft, 1994: p. 78-84.
150. Usermanual, True Confocal Scanner Leica TCS SP II. Version 1.4. Leica Microsystems Heidelberg GmbH, May 2000.
151. Buesche, G., Georgii, A. and Kreipe, H.H., Diagnosis and quantification of bone marrow fibrosis are significantly biased by the pre-staining processing of bone marrow biopsies. *Histopathology*, 2006. 48(2): p. 133-48.
152. Muth, M., Engelhardt, B.M., Kroger, N., Hussein, K., Schlue, J., Busche, G., Kreipe, H.H. and Bock, O., Thrombospondin-1 (TSP-1) in primary myelofibrosis (PMF) - a megakaryocyte-derived biomarker which largely discriminates PMF from essential thrombocythemia. *Ann Hematol*, 2010.
153. Bornstein, P., Thrombospondins as matricellular modulators of cell function. *J Clin Invest*, 2001. 107(8): p. 929-34.
154. Bornstein, P., Thrombospondins function as regulators of angiogenesis. *J Cell Commun Signal*, 2009.
155. Good, D.J., Polverini, P.J., Rastinejad, F., Le Beau, M.M., Lemons, R.S., Frazier, W.A. and Bouck, N.P., A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. 87(17): p. 6624-8.
156. Lawler, J., Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J Cell Mol Med*, 2002. 6(1): p. 1-12.
157. Kopp, H.G., Hooper, A.T., Broekman, M.J., Avecilla, S.T., Petit, I., Luo, M., Milde, T., Ramos, C.A., Zhang, F., Kopp, T., Bornstein, P., Jin, D.K., Marcus, A.J. and Rafii, S., Thrombospondins deployed by thrombopoietic cells determine angiogenic switch and extent of revascularization. *J Clin Invest*, 2006. 116(12): p. 3277-91.
158. Morandi, V., Fauvel-Lafeve, F., Legrand, C. and Legrand, Y.J., Role of thrombospondin in the adhesion of human endothelial cells in primary culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1993. 29A(7): p. 585-91.

159. Nesselroth, S.M., Willis, A.I., Fuse, S., Olson, E.T., Lawler, J., Sumpio, B.E. and Gahtan, V., The C-terminal domain of thrombospondin-1 induces vascular smooth muscle cell chemotaxis. *J Vasc Surg*, 2001. 33(3): p. 595-600.
160. Wang, X.Q. and Frazier, W.A., The thrombospondin receptor CD47 (IAP) modulates and associates with alpha2 beta1 integrin in vascular smooth muscle cells. *Mol Biol Cell*, 1998. 9(4): p. 865-74.
161. Nicosia, R.F. and Tuszynski, G.P., Matrix-bound thrombospondin promotes angiogenesis in vitro. *J Cell Biol*, 1994. 124(1-2): p. 183-93.
162. Chagraoui, H., Komura, E., Tulliez, M., Giraudier, S., Vainchenker, W. and Wendling, F., Prominent role of TGF-beta 1 in thrombopoietin-induced myelofibrosis in mice. *Blood*, 2002. 100(10): p. 3495-503.
163. Wynn, T.A., Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*, 2008. 214(2): p. 199-210.
164. Qian, X., Wang, T.N., Rothman, V.L., Nicosia, R.F. and Tuszynski, G.P., Thrombospondin-1 modulates angiogenesis in vitro by up-regulation of matrix metalloproteinase-9 in endothelial cells. *Exp Cell Res*, 1997. 235(2): p. 403-12.
165. Crawford, S.E., Stellmach, V., Murphy-Ullrich, J.E., Ribeiro, S.M., Lawler, J., Hynes, R.O., Boivin, G.P. and Bouck, N., Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell*, 1998. 93(7): p. 1159-70.
166. Kyriakides, T.R., Rojnuckarin, P., Reidy, M.A., Hankenson, K.D., Papayannopoulou, T., Kaushansky, K. and Bornstein, P., Megakaryocytes require thrombospondin-2 for normal platelet formation and function. *Blood*, 2003. 101(10): p. 3915-23.
167. Cramer, E.M., Masse, J.M., Caen, J.P., Garcia, I., Breton-Gorius, J., Debili, N. and Vainchenker, W., Effect of thrombin on maturing human megakaryocytes. *Am J Pathol*, 1993. 143(5): p. 1498-508.
168. Schulze, H., Korpai, M., Hurov, J., Kim, S.W., Zhang, J., Cantley, L.C., Graf, T. and Shivdasani, R.A., Characterization of the megakaryocyte demarcation membrane system and its role in thrombopoiesis. *Blood*, 2006. 107(10): p. 3868-75.

## **Danksagung**

Für die Überlassung des Themas und der Möglichkeit zur Forschung möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. H.-H. Kreipe und dem Institut für Pathologie der Medizinischen Hochschule Hannover bedanken.

Des Weiteren gilt Herrn Prof. O. Bock mein Dank für die sehr freundliche und engagierte Betreuung der Arbeit während des praktischen Teils und der schriftlichen Ausarbeitung.

Herrn Prof. Dr. A. Ngezahayo und Herrn Prof. Dr. A. Heisterkamp danke ich für die Übernahme des Korreferats bzw. des Prüfungsvorsitzes.

Für die praktische und emotionale Unterstützung möchte ich mich bei Jeanette, Nadine und Henriette bedanken.

Ein besonderer Dank geht an Imke, auf Dich konnte ich mich nicht nur beruflich, sondern auch privat verlassen!

Zudem möchte ich mich bei Oliver für die vielen beruflichen und privaten Gespräche bedanken und dafür, dass wir zusammen Situationen gemeistert haben, an denen ich alleine gescheitert wäre!

Auch bei Becca möchte ich mich für den Rückhalt und die Motivation in den vergangenen Jahren bedanken! Ohne Dich hätte ich häufiger keinen Ausweg gewusst...

Mein größter Dank gilt meiner Familie! Egal, was passiert, ihr drei steht immer hinter mir und ganz gleich was vor uns liegt, ich weiß, dass wir uns immer aufeinander verlassen können und jedes Problem in den Griff bekommen! Ich habe euch sehr lieb und bin froh, euch als meine Familie bezeichnen zu dürfen!

## **Lebenslauf**

### **Promotion**

04.2008 – 04.2011            Institut für Pathologie,  
Medizinischen Hochschule Hannover

### **Studium**

10.2003 – 03.2008            Diplom-Studiengang ‚Biologie‘,  
Universität Bremen  
Abschluss Diplom Biologin (Note: gut)

### **Schule**

1990 – 1994                    Grundschule Ölsburg  
1994 – 1996                    Orientierungsstufe Groß Ilsede  
1996 – 2000                    Realschule Groß Ilsede,  
Abschluss Erweiterter Sekundarabschluss I (Note: 1,4)  
2000 – 2003                    Gymnasium Groß Ilsede  
Juni 2003                        Schulabschluss Allgemeine Hochschulreife,  
Abschluss Abitur (Note: 2,6)



## Publikationsliste

**Diese Dissertation basiert auf den Ergebnissen folgender Publikationen:**

**Muth, M.**, Engelhardt, B.M., Kröger, N., Hussein, K., Schlué, J., Büsche, G., Kreipe, H.H. and Bock, O., Thrombospondin-1 (TSP-1) in primary myelofibrosis (PMF) - a megakaryocyte-derived biomarker which largely discriminates PMF from essential thrombocythemia. *Ann Hematol*, 2010.

**Muth, M.**, Büsche, G., Bock, O., Hussein, K. and Kreipe, H., Aberrant proplatelet formation in chronic myeloproliferative neoplasms. *Leuk Res*, 2010. 34(11): p. 1424-9.

Bock, O., **Muth, M.**, Theophile, K., Winter, M., Hussein, K., Büsche, G., Kröger, N. and 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(5): p. 510-20.

### Weitere Publikationen

Jonigk D., Merk M., Hussein K., Mägel L., Theophile K., **Muth M.**, Lehmann U., Bockmeyer C.L., Mengel M., Gottlieb J., Haverich A., Golpon H, Kreipe H., Länger F. Obliterative airway remodeling: molecular evidence for shared pathways in transplanted and native lungs. *Am J Pathol*, 2010.

Hussein K., Büsche G., **Muth M.**, Göhring G., Kreipe H., Bock O., Expression of myelopoiesis-associated microRNA in bone marrow cells of atypical chronic myeloid leukaemia and chronic myelomonocytic leukaemia. *Ann Hematol*, 2010.

Beuing, C., Soller, J.T., **Muth, M.**, Wagner, S., Dolf, G., Schelling, C., Richter, A., Willenbrock, S., Reimann-Berg, N., Winkler, S., Nolte, I., Bullerdiek, J. and Murua Escobar, H., Genomic characterisation, chromosomal assignment and in vivo localisation of the canine high mobility group A1 (HMGA1) gene. *BMC Genet*, 2008. 9: p. 49.

### Vorträge (nur Erstautorschaft)

**Muth, M.**, Büsche, G., Bock, O., Hussein, K., Kreipe H.H. Aberrant proplatelet formation in chronic myeloproliferative neoplasms. 94. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, Berlin 2010

## **Erklärung**

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

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

Michaela Muth